



HAL
open science

Le rôle de la mécanotransduction dans la plasticité, la progression et la résistance thérapeutique du mélanome

Margaux Lecacheur

► **To cite this version:**

Margaux Lecacheur. Le rôle de la mécanotransduction dans la plasticité, la progression et la résistance thérapeutique du mélanome. Cancer. Université Côte d'Azur, 2021. Français. NNT : 2021COAZ6026 . tel-03607785

HAL Id: tel-03607785

<https://theses.hal.science/tel-03607785>

Submitted on 14 Mar 2022

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

Le rôle de la mécanotransduction dans la
progression, la plasticité et la résistance
thérapeutique du mélanome

Margaux LECACHEUR

Centre méditerranéen de médecine moléculaire (C3M), INSERM

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

Mention : Interaction Moléculaires et
Cellulaires

D'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Sophie TARTARE-DECKERT

Co-encadrée par : Christophe GIRARD

Soutenue le : 10 Décembre 2021

Devant le jury, composé de :

Dr Frédéric BOST, DR CNRS,

Université Côte d'Azur

Dr Sirio DUPONT, Professeur Associé, HDR,
Université de Padoue

Dr Christophe GIRARD, CR CNRS,

Université Côte d'Azur

Dr Julie GUILLERMET-GUIBERT, DR INSERM,
Université Paul Sabatier

Dr Lionel LARUE, DR INSERM,

Université Paris-Saclay

Dr Sophie TARTARE-DECKERT, DR INSERM,
Université Côte d'Azur

Le rôle de la mécanotransduction dans la progression, la plasticité et la résistance thérapeutique du mélanome

COMPOSITION DU JURY :

Président du jury :

Dr Frédéric BOST, Directeur de Recherche CNRS, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Université Côte d'Azur, Nice, France

Rapportrice :

Dr Julie GUILLERMET-GUIBERT, Directrice de Recherche INSERM, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université Paul Sabatier, Toulouse III, Toulouse, France.

Rapporteur :

Dr Lionel LARUE, Directeur de Recherche INSERM, Institut Curie, Université Paris-Saclay, Paris, France.

Examineurs :

Dr Sirio DUPONT, Professeur Associé, HDR, Département de Médecine Moléculaire, Université de Padoue, Padoue, Italie

Dr Christophe GIRARD, Chargé de Recherche CNRS Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Université Côte d'Azur, Nice, France

Directrice de thèse :

Dr Sophie TARTARE-DECKERT, Directeur de Recherche INSERM, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Université Côte d'Azur, Nice, France

RÉSUMÉ

Le mélanome est le cancer cutané le plus agressif à cause de son importante hétérogénéité, son fort potentiel métastatique et sa résistance thérapeutique. Malgré les thérapies actuelles (thérapies ciblant la voie BRAF/MEK et immunothérapies), de nombreux patients sont encore en échec thérapeutique à cause de l'émergence rapide de résistances. L'hétérogénéité intra-tumorale et la plasticité des cellules de mélanomes participent à la résistance thérapeutique. La plasticité des cellules de mélanome correspond à leur capacité à osciller entre différents phénotypes cellulaires, du plus différencié, exprimant le marqueur mélanocytaire MITF, au plus dédifférencié, créant l'hétérogénéité tumorale. Cette plasticité phénotypique peut être induite par les thérapies ciblées. Dans ce contexte, l'acquisition d'un phénotype dédifférencié mésenchymateux a également été décrite comme un mécanisme d'échappement thérapeutique.

La capacité des cellules cancéreuses à disséminer et à résister aux traitements repose sur leur pouvoir d'adaptation à l'écosystème tumoral. Au sein d'une tumeur, la cellule cancéreuse interagit avec un environnement complexe composé de cellules stromales et de la matrice extracellulaire (MEC). La MEC, principalement produite par les fibroblastes, est un réseau dynamique en constant remodelage ayant des propriétés physico-chimiques qui influencent l'architecture des tumeurs. Les cellules cancéreuses sont capables de percevoir la tension matricielle et d'y répondre par un processus appelé mécanotransduction. Plusieurs études ont montré le rôle de la rigidité de la MEC dans la progression et la réponse thérapeutique de différents cancers. Toutefois, l'impact de la rigidité matricielle et le rôle de la mécanotransduction dans la biologie des mélanomes sont peu connus.

Mon projet de thèse a consisté à étudier l'influence des modifications de la rigidité matricielle tumorale dans la progression, la plasticité cellulaire et la résistance des mélanomes aux thérapies ciblées.

Dans un premier temps, j'ai montré que les thérapies ciblant la voie BRAF/MEK stimulent *in vitro* et *in vivo* la production et l'assemblage, par les cellules de mélanome, d'une MEC riche en collagène qui contribue à une rigidification de la tumeur et à l'échappement thérapeutique. Dans un deuxième temps, j'ai analysé la réponse des cellules de mélanome aux changements de rigidité de la MEC, rencontrés par la cellule tumorale au cours de sa progression métastatique et en réponse aux thérapies ciblées.

J'ai pu mettre en évidence que les cellules de mélanome qui présentent un phénotype dédifférencié mésenchymateux développent une mécano-addiction se traduisant par une augmentation de leur prolifération, de leur migration/invasion et de leur résistance thérapeutique sur un support rigide. De façon intéressante, j'ai identifié les récepteurs aux collagènes à domaine discoïdine DDR1 et DDR2 comme responsables de ce mécano-phénotype, via l'activation dépendante du cytosquelette d'actomyosine du mécano-senseur transcriptionnel YAP.

Ces travaux de thèse ont permis de montrer le rôle des DDR dans la mécanotransduction et la progression du mélanome et dévoiler une nouvelle vulnérabilité des cellules tumorales dédifférenciées. A terme, ils pourraient conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le dialogue entre le mélanome et son microenvironnement matriciel.

Mots clés : Mélanome cutané, Mécanostransduction, Résistance thérapeutique, YAP, DDR

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive and deadliest form of skin cancer due to its heterogeneity, high metastatic potential, and therapeutic resistance. Despite existing therapies, including targeted therapies against the BRAF/MEK pathway or immunotherapies, patients may still undergo therapeutic failure. This occurs in part due to the onset of resistance to therapies. Melanoma intra-tumoral heterogeneity and melanoma cell plasticity contribute to therapeutic resistance. Melanoma cell plasticity is the ability of cells to switch between different cell phenotypes. For example, melanoma cells can switch from a differentiated state, where they express the melanocytic marker MITF, to a more dedifferentiated state, thereby creating tumor heterogeneity. This cell plasticity can be induced by targeted therapies. In this context, the acquisition of a dedifferentiated mesenchymal phenotype has also been described as an escape mechanism in response to therapies.

The ability of cells to disseminate and to resist treatment is based on their ability to adapt to their microenvironment. Within the tumor, tumor cells interact with a complex environment composed of stromal cells and extracellular matrix (ECM). The ECM, mainly produced by fibroblasts, is a dynamic web that is constantly remodeled and its physiochemical properties can influence tumor architecture. Tumor cells can sense the tension from the ECM and respond to it by a process called mechanotransduction. Previous studies have shown the role of ECM stiffening in the progression and therapeutic resistance of several solid cancers. However, the role of ECM stiffening and the role of mechanotransduction in melanoma is not fully understood.

My thesis project investigated the influence of ECM stiffening modifications on melanoma progression, plasticity and resistance to targeted therapies.

In the first part of my thesis, results showed that targeted therapies against the BRAF/MEK pathway stimulate *in vitro* and *in vivo* melanoma cells to produce and assemble a collagen rich ECM that contributes to tumor stiffening and therapeutic escape. In the second part of my thesis, we analyzed melanoma cell response to substrate stiffness modifications, which melanoma cells might encounter during disease progression and in response to targeted therapies. We demonstrated that melanoma cells harboring a differentiated mesenchymal-like phenotype are more sensitive to changes in ECM stiffness, as depicted by an increase in their proliferation, migration/invasion and resistance to therapy on a stiff substrate. Interestingly, we identified that the collagen receptors DDR1 and DDR2 are responsible for this mechanophenotype, through the activation of the mechanosensory protein YAP, which was dependent on the actomyosin cytoskeleton.

This work highlights the role of DDR in melanoma mechanotransduction and progression and unveils a novel weakness of dedifferentiated cells. This work could therefore lead to future developments of new therapeutic strategies that target the interaction between melanoma cells and their ECM microenvironment.

Keywords : Skin melanoma, Mechanotransduction, Therapy resistance, DDR, YAP

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je voudrais remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci au Dr **Julie Guillermet-Guibert** et Dr **Lionel Larue** en tant que rapporteurs, au Dr **Sirio Dupont** en tant qu'examinateur, au Dr **Frédéric Bost** en qualité de président du jury, le Dr **Christophe Girard** comme encadrant de ma thèse et le Dr **Sophie Tartare-Deckert** comme directrice de ma thèse.

Merci aux Dr **Richard Tomasini** et Dr **Frédéric Luton** d'avoir participé à mes comités de suivi de thèse, pour les discussions très enrichissantes autour de mon projet, les conseils et les suggestions très pertinentes d'un point de vue expérimental mais également pour aiguiller mon après-thèse.

Merci à **Sophie** de m'avoir acceptée dans ton équipe pour mon stage de Master 1 et puis ma thèse. Merci de m'avoir encadrée et soutenue pendant toute ma thèse. Merci pour ton implication et tes encouragements. Merci pour toutes les discussions scientifiques qui m'ont permis de faire avancer mon projet de thèse et de reprendre confiance en moi dans les moments délicats. Merci également de m'avoir laissé la possibilité de présenter mes travaux à des congrès internationaux. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir aidé à prendre confiance en moi. Je te souhaite bon courage pour la nouvelle aventure qui t'attend et j'espère rester en contact avec toi dans la suite de ma carrière.

Merci à **Christophe** de m'avoir fait confiance et donner la chance de faire mon stage de Master 1 avec toi et ensuite ma thèse. Merci de m'avoir préparé à tous mes différents oraux en ayant eu la patience de m'expliquer et de m'avoir fait découvrir le monde de la mécanotransduction. Tu as su m'expliquer de façon simple plusieurs notions plutôt complexes. Merci de m'avoir appris les expériences et d'avoir appris avec moi celles dont on allait avoir besoin. Merci d'avoir eu de la patience malgré mes petites bêtises de petite Master. Merci de m'avoir ensuite laissé prendre mon indépendance pendant la thèse. Merci de m'avoir accompagné pour certaines collaborations pour mon projet et de m'avoir fait participer à des congrès et workshop en lien avec la thématique de ma thèse. Merci d'avoir discuté avec moi de mes résultats, de m'avoir aidé à les comprendre et de m'avoir aiguillé pour continuer le projet. Comme tu me l'avais promis, je finis ma thèse avec un papier (voire même bientôt 2 🍷). Merci pour ton implication pour que ça puisse arriver. Merci pour tous tes conseils et ton soutien au cours de mon master et de ma thèse grâce auxquels j'ai pu en arriver là.

Merci à **Marcel** pour les discussions scientifiques passionnées toujours riches en nouvelles hypothèses et idées d'expérience.

Merci à **Ilna** pour toute ton aide et les discussions qu'on a pu avoir depuis mon stage de Master 1. Je me souviens de la première fois que je t'ai rencontré au labo, c'était à mon deuxième jour de stage pour m'apprendre à faire des hydrogels et c'était aussi ma première fois en culture. On peut dire que je ne pouvais pas avoir un professeur plus efficace pour apprendre les bonnes pratiques. Merci pour ta patience d'avoir essayé de m'apprendre à faire les manips comme toi. Merci d'avoir supporté mes bêtises, parfois plusieurs fois les mêmes. J'admire ton côté perfectionniste qui fait que tu reproduis parfaitement un geste même quand tu ne l'aimes pas (les manips souris) ou pour faire à l'identique des petits croissants au nutella ou pour décorer la table pour le repas de Noël de l'équipe. Merci pour les pauses « eau » et le tour pour discuter et prendre l'air. Merci de m'avoir poussé à venir faire du sport avec toi pour décompresser du labo. Merci de m'avoir attendu le midi quand je finissais en culture à 12h05 (oui je sais c'est pas vrai xD). Tes efforts ont porté leurs fruits et maintenant j'ai faim à 11h45 😊. Merci de m'avoir aidé pour les idées et les manips de mon projet, par exemple en me donnant un jour des cellules que tu allais jeter et qui a fait démarrer mon projet de thèse. Merci pour ton soutien à tout moment. Merci d'avoir écouté mes histoires et de le faire encore maintenant. Avec tous les moments passés au labo et en dehors, je peux dire que tu es vraiment devenue une amie. Je te souhaite beaucoup de réussite pour ton post-doc outre Atlantique et j'espère vraiment qu'on pourra retravailler ensemble.

Merci à **Serena** pour ta passion pour la recherche, qui est très vite contagieuse à ton contact. Thank you a lot for exchanging your new hypothesis and listening to mine. Thank you for answering my scientific and non-scientific questions very late in the night. I really like laughing with you. Especially, when we worked together during our first mice experiment (maybe a little bit because of something else). Thank you for sharing with me your passion with cats and many others 😊. Thank you for the good moments in the lab and also outside the lab. Thank you for your kindness and your support at any time and hour of the day. I wish you all the best for your post-doc and I hope we will stay in contact.

Merci à **Christopher**, pour ton enthousiasme depuis nos stages de Master dans l'équipe. On a découvert l'équipe et la joie des western blots ensemble. Merci pour ta passion dans tous les domaines de la science, pas seulement la biologie, les FRC et YAP. Merci pour tous les échanges et les bons moments au labo et en dehors. Merci de m'avoir fait partager tes voyages dans presque tous les pays du monde, il t'en manque plus beaucoup 😊. Merci d'avoir pu partager avec toi les moments où on a fait découvrir la biologie et le mélanome aux enfants et à leurs parents. Je te souhaite bon courage pour la suite de ta carrière de jeune chercheur.

Merci à **Alexandrine** pour ton soutien et ton aide depuis ton arrivée en Master 2 dans l'équipe. Une arrivée censée être temporaire mais qui s'est poursuivie avec une thèse et heureusement d'ailleurs ! Merci pour tous les moments de fou rire passés au labo. Merci pour les moments où tu m'as écouté et soutenu, où tu m'as posé les bonnes questions pour me faire réfléchir sur ce que je ressentais. Merci de m'avoir supportée et soutenue dans les différents moments de ma thèse. J'admire ton courage, ta détermination et le fait que tu ne ménages pas tes efforts. Je pense que tu iras loin dans le monde la recherche et je te souhaite bon courage pour la continuation de ta thèse.

C'est difficile de parler de Alexandrine sans parler de Pierric (et inversement). Merci à toi **Pierric** pour ta bonne humeur (la plupart du temps 😊). Merci pour les discussions et le partage de tes anecdotes marrantes pendant la culture. Je me souviens encore de l'histoire de la cellule. Merci pour les idées de coin de rivière qu'il faut que j'aie découvrir. Merci pour les discussions scientifiques sur nos sujets de thèse qui ont quelques points communs. Je te souhaite bon courage pour la fin de la thèse, tu y es presque. Je te souhaite aussi bonne chance pour la suite après la thèse. Merci pour les concerts en culture (avec Alexandrine). Merci pour vos revisites des chansons françaises, anglaises, de Noël, de Pâques, ... version labo. J'attends votre album avec impatience ! J'ai passé énormément de bons moments au labo (et en dehors) avec vous et je vous en remercie.

Merci à **Océane**, même si on s'est connu peu de mois avant la fin de ma thèse. Tu es pleine d'enthousiasme et de motivation et ça fait plaisir à voir. Tu as l'air autonome et débrouillarde et je pense que tu ne feras qu'une bouchée de l'aventure de la thèse qui t'attend. J'espère pouvoir rester en contact avec toi pour suivre tes avancées dans la thèse mais aussi pour d'autres moments hors travail.

Merci **Lauren** pour tes organisations super carré pour les repas sushi de l'équipe, les anniversaires et les commandes. Merci pour les moments d'échange pendant les repas du midi et merci de m'avoir écouté mes histoires. Je te souhaite pleins de bonheur pour ton nouveau départ.

Thank you **Ana** for your wise advices and for listening to me. Thank you for exchanging about my side project. Thank you for all the discussions about non-scientific topics, you always find a nice topic to discuss during lunchtime.

Merci à **Caroline** pour ton soutien et je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse.

Merci à **Fred** de m'avoir appris à utiliser le FACS, même si j'ai appris qu'il ne fallait pas l'utiliser après 18h. Merci pour tes notes d'humour et les discussions très sympas qu'on a pu avoir.

Merci à **Mickael** pour les discussions et les échanges scientifiques. Le fait que je sois plus au bureau à la fin de ma thèse a permis qu'on discute plus et c'était très sympa.

Merci à **Virginie** pour tes conseils et les discussions. Merci d'avoir supporté mon étalage de feuilles vers ton bureau et d'avoir arroser ma plante au début de ma thèse.

Merci également à différentes personnes du C3M en dehors de l'équipe. Merci à **Marie** et **Maéva**, responsables de la plateforme imagerie avec lesquelles j'ai passé beaucoup de temps à échanger sur des manips de microscopie ou les problèmes de microscope. Merci pour votre aide pour l'acquisition et les analyses d'images. Merci aux personnes de l'animalerie pour leur aide pour les expériences. Merci à **Stephan Clavel**, **Nathalie Mazure** et **Sandrine Marchetti** pour votre aide et vos conseils quand j'ai essayé de commencer un projet sur le métabolisme et les mitochondries. Merci également au personnel de la gestion (Philippe, Marie, Carole) et également au personnel de la laverie.

En dehors du C3M, merci à **Sabrina Pisano** pour les expériences d'AFM. Merci également à **Cédric Gaggioli** de m'avoir accueilli pour mon stage de Master 2 et de m'avoir fait découvrir le monde des fibroblastes et de la culture en 3D. Merci pour les échanges et pour ton expertise.

Merci à mes amis (**Marie, Fabien, Fadia, Olivia, Elisa, Baptiste, Sol, Vincent, Miguel, Lou, Prune, Laya, Phoebe**) pour votre immense soutien et les bons moments passés ensemble.

Enfin, je remercie ma famille : ma **maman**, mon **papa** et mon **frère Kilian** pour votre énorme soutien et pour m'avoir supporté pendant tous les bons et les moins bons moments de ma thèse et bien avant. Mille mercis !

SOMMAIRE

RÉSUMÉ	2
ABSTRACT	4
REMERCIEMENTS	6
SOMMAIRE	11
ABREVIATIONS	15
TABLE DES ILLUSTRATIONS	23
INTRODUCTION	26
Chapitre 1 : Le microenvironnement tumoral	28
I. Les principaux constituants du microenvironnement tumoral	30
A. Les cellules d'origine hématopoïétique	30
a) Les cellules de la lignée lymphoïde	30
b) Les cellules de la lignée myéloïde	31
B. Les fibres nerveuses	33
C. Les cellules d'origine mésenchymateuse	33
a) Les cellules souches mésenchymateuses	33
b) Les cellules endothéliales	33
c) Les péricytes	34
d) Les fibroblastes	34
D. Les composants non cellulaires du microenvironnement	40
a) Les composants non matriciels	41
b) La matrice extracellulaire (MEC)	42
Chapitre 2 : La mécanotransduction	56
I. Définition et rôles physiologiques	56
II. Les différents types de forces	58
a) Forces hémodynamiques	59
b) Forces de contact cellule-cellule	59
c) Forces appliquées par le support	59
III. Méthodes de mesure des forces	60
IV. Modèles d'étude de la mécanotransduction	61
a) Hydrogels de protéines matricielles	61
b) Matrices dérivées de cellules	61
c) Hydrogels synthétiques	62
V. Les principaux acteurs de la mécanotransduction	63
A. Les récepteurs extracellulaires impliqués dans la perception des signaux mécaniques	64
a) Les intégrines	64
b) Les récepteurs à domaine discoïdine	68
c) Autres récepteurs mécanosenseurs	73
B. Les acteurs intracellulaires des voies de la mécanotransduction	74
a) Le cytosquelette sert d'intermédiaire entre les récepteurs et le noyau	74
b) Le noyau peut sentir les forces mécaniques et y répondre	84
c) Les coactivateurs transcriptionnels YAP/TAZ	87
d) Le cofacteur transcriptionnel MRTF	94
VI. Rôle de la rigidité de la MEC dans les cancers	97
A. Effet sur la prolifération cellulaire	97
B. Conséquence sur l'angiogenèse	97
C. Impact sur la modulation du système immunitaire	98
D. Conséquence sur l'invasion et la dissémination métastatique	98
E. Impact sur la résistance thérapeutique	99
VII. Ciblage des principaux acteurs de la mécanotransduction	100

A.	Ciblage de la MEC	101
a)	Inhibition de la transformation des fibroblastes en CAF	101
b)	Inhibition de la réticulation du collagène et de sa synthèse.....	102
c)	Inhibition de l'hyaluronane	103
B.	Ciblage des voies de la mécanotransduction	103
a)	Voie des intégrines/FAK.....	103
b)	Voie des Récepteurs à Domaine Discoïdine	104
c)	Voie des Rho GTPase/ROCK	105
d)	Voie YAP/TAZ	106
e)	Voie MRTF	107
Chapitre 3 :	Le mélanome cutané	108
I.	La peau, un organe mécanosenseur	108
A.	L'épiderme.....	109
B.	Le derme	109
C.	L'hypoderme.....	110
II.	Le mélanome et les voies de signalisation associées à sa progression	111
A.	Généralités sur le mélanome.....	111
B.	Facteurs de risques.....	113
a)	Les facteurs intrinsèques	113
b)	Les facteurs extrinsèques.....	113
C.	Progression du mélanome	115
a)	Transformation du mélanocyte en mélanome métastatique	115
b)	Mutations initiatrices de la mélanomagenèse.....	115
c)	Voies de signalisation impliquées dans la progression du mélanome	117
D.	Hétérogénéité phénotypique et plasticité cellulaire du mélanome .	125
a)	Le switch phénotypique ou la plasticité phénotypique	126
b)	Marqueurs et caractéristiques du switch phénotypique.....	127
c)	Facteurs d'induction du switch phénotypique.....	130
III.	Les traitements du mélanome	133
A.	Thérapies ciblées	134
a)	Les inhibiteurs de BRAFV600	134
b)	La combothérapie : inhibiteurs de BRAFV600 + inhibiteurs de MEK136	
B.	Immunothérapies.....	137
a)	Les anti-CTLA-4	138
b)	Les anti-PD-1/PD-L1	138
C.	Combinaison Immunothérapies + Thérapies ciblées	139
IV.	Les mécanismes de résistance thérapeutique	139
A.	La résistance thérapeutique intrinsèque.....	139
a)	Résistance aux thérapies ciblées.....	140
b)	Résistance aux immunothérapies	145
c)	Cross-résistance aux thérapies ciblées et immunothérapies	147
B.	La résistance extrinsèque.....	148
a)	Résistance conférée par les facteurs solubles.....	148
b)	Résistance conférée par l'adhérence	150
C.	Cibler le switch phénotypique pour améliorer la réponse thérapeutique	152
OBJECTIFS DE RECHERCHE	153
RÉSULTATS	156
Article 1 :	A feed-forward mechanosignaling loop confers resistance to therapies targeting the MAPK pathway in BRAF mutant melanoma	157

Article 2 : Mechanical activation of the collagen receptors DDR1 and DDR2 promotes mesenchymal-like melanoma cells aggressiveness through actomyosin/YAP pathway	180
I. Contexte.....	180
II. Matériels et Méthodes	181
III. Résultats.....	187
IV. Figures.....	192
DISCUSSION.....	213
I. Les cellules de phénotype dédifférencié sont les plus sensibles aux changements de rigidité du microenvironnement tumoral.....	214
II. La rigidification du stroma tumoral rend les cellules de mélanome de phénotype dédifférencié plus agressives.....	217
III. Les voie de la mécanotransduction contrôlent l'agressivité des cellules de mélanome de phénotype dédifférencié.....	220
CONCLUSION	222
PERSPECTIVES	225
BIBLIOGRAPHIE	233
ANNEXES	282
Annexe I : Matrix Stiffening and EGFR Cooperate to Promote the Collective Invasion of Cancer Cells	283
Annexe II : Targeting DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated melanoma cell adaptation to BRAF-targeted therapy	299
Annexe III : The profibrotic miR-143/145 cluster promotes mesenchymal phenotypic plasticity associated with resistance to targeted therapies in melanoma.....	327
Annexe IV : Invasive dedifferentiated melanoma cells inhibit JAK1-STAT3-driven actomyosin contractility of human fibroblastic reticular cells of the lymph node351	

ABBREVIATIONS

A

ABP : actin-binding protein

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AFM : microscopie à force atomique

AMM : autorisation de mise sur le marché

ARN : acide ribonucléique

α -SMA : α -smooth muscle actin

ATP : adenosine triphosphate

B

Breg : lymphocyte B régulateur

C

CAF : cancer associated fibroblast

CAM-DR : cell adhesion mediated drug resistance

CAV1 : cavéoline 1

CCL : chemokine C-C motif ligand

CDK : cyclin dependant kinase

CDM : cell-derived matrix

CP4H : prolyl-4-hydroxylase

CSM : cellule souche mésenchymateuse

CXCL1 : C-X-C motif chemokine ligand 1

D

DC : dendritic cell

DDR : discoidin domain receptor

DPEN : diphényléthylènediamine

DUB : déubiquitinase

E

EDNRB : endothelin receptor type B

EGF : epidermal growth factor

EGFR : epidermal growth factor receptor

EM-DR : environment mediated drug resistance

EMT : epithelial to mesenchymal transition

ERK : extracellular signal-regulated kinase

F

FAK : focal adhesion kinase

FAP α : fibroblast activated protein α

FGF : fibroblast growth factor

FGFR : fibroblast growth factor receptor

FI : filament intermédiaire

FLNA : filamine A

FRC : fibroblast reticular cell

FSP1 : fibroblast specific protein 1

G

GAG : glycosaminoglycane

GAP : GTPases-activating proteins

GDI : GDP dissociation inhibitor

GEF : guanine nucleotide exchange factors

GPCR : G protein-coupled receptor

GPR77 : G protein-coupled receptor 77

GDP : guanosine diphosphate

GTP : guanosine triphosphate

H

HA : hyaluronic acid

HDM : human double minute

HGF : hepatocyte growth factor

I

ICAM : interCellular Adhesion Molecule

IFN- γ : interféron-gamma

IGF : insulin growth factor

IGFR : insulin growth factor receptor

IL : interleukine

ILK : integrin linked kinase

INCA : institut national du cancer

J

JAK : janus kinase

JNK : jun N-terminal kinase

L

LAIR : Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor

LIF : leukemia inhibitory factor

LINC : linker of nucleoskeleton and cytoplasm

LOX : lysyl oxydase

LOXL : lysyl oxydase like

LPS : lipopolysaccharide

M

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1

MDSC : myeloid derived suppressor cell

MEC : matrice extracellulaire

miR / miARN : micro-ARN

MITF : microphthalmia-associated transcription factor

MKL : megakaryoblastic

MLANA : melan-A

MLC-2 : myosin light chain

MM-DR : matrix mediated drug resistance

MMP : métalloprotéases

MRTF : myocardin related transcription factor

MSC : mesenchymal stem cell

MT : microtubule

N

NCSCL : neural crest stem cell like

NET : neutrophil extracellular trap

NF- κ B : nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cell

NK : natural killer

P

Pa : Pascal

PD-1 : programmed cell death 1

PDGF : platelet derived growth factor

PDGFR : platelet derived growth factor receptor

PD-L1/2 : programmed death ligand $\frac{1}{2}$

PDX : patient derived xenograft

PECAM : platelet endothelial cell adhesion molecule

PEG : polyéthylène glycol

PG : protéoglycanes

PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase

PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PTX3 : long pentraxin 3

R

Rb : Rétinoblastome

RGP : radial growth phase

ROCK : Rho associated protein kinase

RTK : récepteur tyrosine kinase

ROS : reactive oxygen species

S

SDF-1 : stromal cell derived factor 1

SFM-DR : soluble factor mediated drug resistance

SHP-1/2 : Src homology 2 domain-containing phosphatase 1/2

SOX10 : SRY-Box 10

SPARC : secreted protein acidic rich in cysteine

SRF : serum response factor

STAT : signal transducer and activator of transcripteur

T

TAM : tumor associated macrophage

TAN : tumor associated neutrophil

TAZ : transcription coactivator with PDZ-binding motif

TCGA : the cancer genome atlas

TEAD : TEA domain transcription factor

TFAP2 : Transcription Factor AP-2 Alpha

TFM : microscopie à force de traction

TGF β : transforming growth factor β

TH1 : lymphocyte T helper (=auxiliaires) 1

TLR : Toll-like receptor

TNF α : tumor necrosis factor α

Treg : lymphocyte T régulateur

TSP : thrombospondine

U

UV : ultra-violet

V

VCAM-1 : vascular adhesion molecule 1

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEGFR : vascular endothelial growth factor re

VGL4 : vestigial-like family member 4

VGP : vertical growth phase

Y

YAP : yes associated protein

Z

ZEB : Zincfinger E-box-binding homeobox

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Figure 1 : Le microenvironnement tumoral	27
Figure 2 : Rôle des cellules du microenvironnement tumoral dans les propriétés tumorales	29
Figure 3 : Les origines cellulaires possibles des CAF.....	35
Figure 4 : Interactions des CAF avec les différentes cellules stromales et leurs rôles dans la progression tumorale.....	38
Figure 5 : Exemple de composants non-cellulaires du microenvironnement tumoral	40
Tableau 1 Expression de différents marqueurs au sein des 4 populations de CAF	37
Figure 6 : La MEC normal vs tumoral	43
Figure 7 : Les étapes de la formation du collagène mature	45
Tableau 2 : Les différents types de collagène	46
Figure 8 : Structure de la fibronectine et de la laminine	48
Figure 9 : Le rôle de la MEC dans les propriétés tumorales.....	53
Figure 10 : Echelle de rigidité des tissus du corps comparé à celle d'une boîte de pétri.....	56
Figure 11 : Echelle de rigidité des tissus du corps comparé à celle d'une boîte de pétri.....	58
Figure 12 : La mécanotransduction : de la MEC au noyau	63
Figure 13 : Ligands et structures des intégrines	64
Figure 14 : Structure et maturation d'une adhésion focale	66
Figure 15 : Voies de signalisation des intégrines	67
Figure 16 : Structure des DDR	68
Tableau 3 : Les DDR et leurs ligands.....	69
Figure 17 : Voies de signalisation des DDR	72
Figure 18 : Le cytosquelette	74
Tableau 4 : Protéines se liant à l'actine (ABP)	76
Figure 19 : Polymérisation de l'actine	77
Figure 20 : Effet de l'activation des protéines de la famille Rho sur l'organisation de l'actine	78
Figure 21 : La voie Rho/ROCK/MLC2 dans la contraction du cytosquelette d'actine	79
Figure 22 : Structure et assemblage d'un filament intermédiaire	81
Tableau 5 : Les différents filaments intermédiaires	82
Figure 23 : Structure d'une microtubule	83
Figure 24 : Les conséquences des forces subies par le noyau	86
Figure 25 : Le complexe LINC du noyau.....	86
Figure 26 : La voie Hippo.....	87
Figure 27 : Structure de YAP et de TAZ et protéines partenaires	88
Figure 28 : Exemples de différents gènes cibles de YAP/TAZ selon le type cellulaire	90
Figure 29 : Activation de YAP par la rigidité matricielle	91
Figure 30 : Activation de MRTF-A	95
Figure 31 : Ciblage des voies de la mécanotransduction.....	100
Figure 32 : Structure générale de la peau.....	108
Figure 33 : Classement des tumeurs solides par incidence et mortalité en 2018 en France selon le sexe.....	112
Figure 34 : La progression du mélanome et les différentes altérations génétiques associées	114
Figure 35 : Les voies MAP-Kinase.....	120
Figure 36 : La voie MAP-Kinase ERK en physiologie et dans le mélanome	120
Figure 37 : La voie PI3K/AKT en physiologie et dans le mélanome.....	121
Figure 38 : Les différents niveaux d'hétérogénéité tumorale	125
Figure 39 : Le switch phénotypique pendant la progression du mélanome	126
Figure 40 : Le switch phénotypique	127
Figure 41 : Le modèle des 6 différents phénotypes dans le mélanome et leur niveau de résistance thérapeutique.	129
Figure 42 : Les traitements actuels du mélanome	133
Figure 43 : Les différents essais cliniques dans le mélanome pour les immunothérapies et les thérapies ciblées entre 2011 et 2021	135
Figure 44 : Les immunothérapies anti-CTLA-4 et anti-PD-1/PD-L1	137
Figure 45 : Mécanismes de résistances intrinsèques aux thérapies ciblées avec la réactivation de la voie des MAPK ERK et l'activation de la voie PI3K/AKT	140
Figure 46 : Le modèle du rhéostat de MITF et leur niveau de résistance thérapeutique	141
Figure 47 : Mécanismes de résistances aux immunothérapies.....	146
Figure 48 : Les différents types de résistances conférées par le microenvironnement	148

RESULTATS

Tableau 1. Phenotypic state and mutation status of the different melanoma cell lines and short-term patient derived melanoma cells used in the study.....	191
Figure 1. Dedifferentiated melanoma cells display increased sensitivity to collagen stiffening compared to melanocytic cells.....	192
Sup figure 1.....	194
Figure 2. Dedifferentiated melanoma cells display mechano-dependent proliferative and therapy resistance properties.....	196
Sup figure 2.....	198
Figure 3. Collagen stiffening increases differentiated melanoma cells motile and invasive behavior.....	200
Figure 4. Collagen receptors DDR1 and DDR2 mediate melanoma cells mechano-responsiveness.....	202
Sup figure 3	204
Figure 5. Targeting DDR or YAP impairs rigidity induced aggressive behavior of dedifferentiated melanoma cells.....	206
Sup figure 4.....	208
Figure 6. Targeting DDR or YAP sensitizes mechano-addicted melanoma cells to oncogenic pathway inhibition.....	210

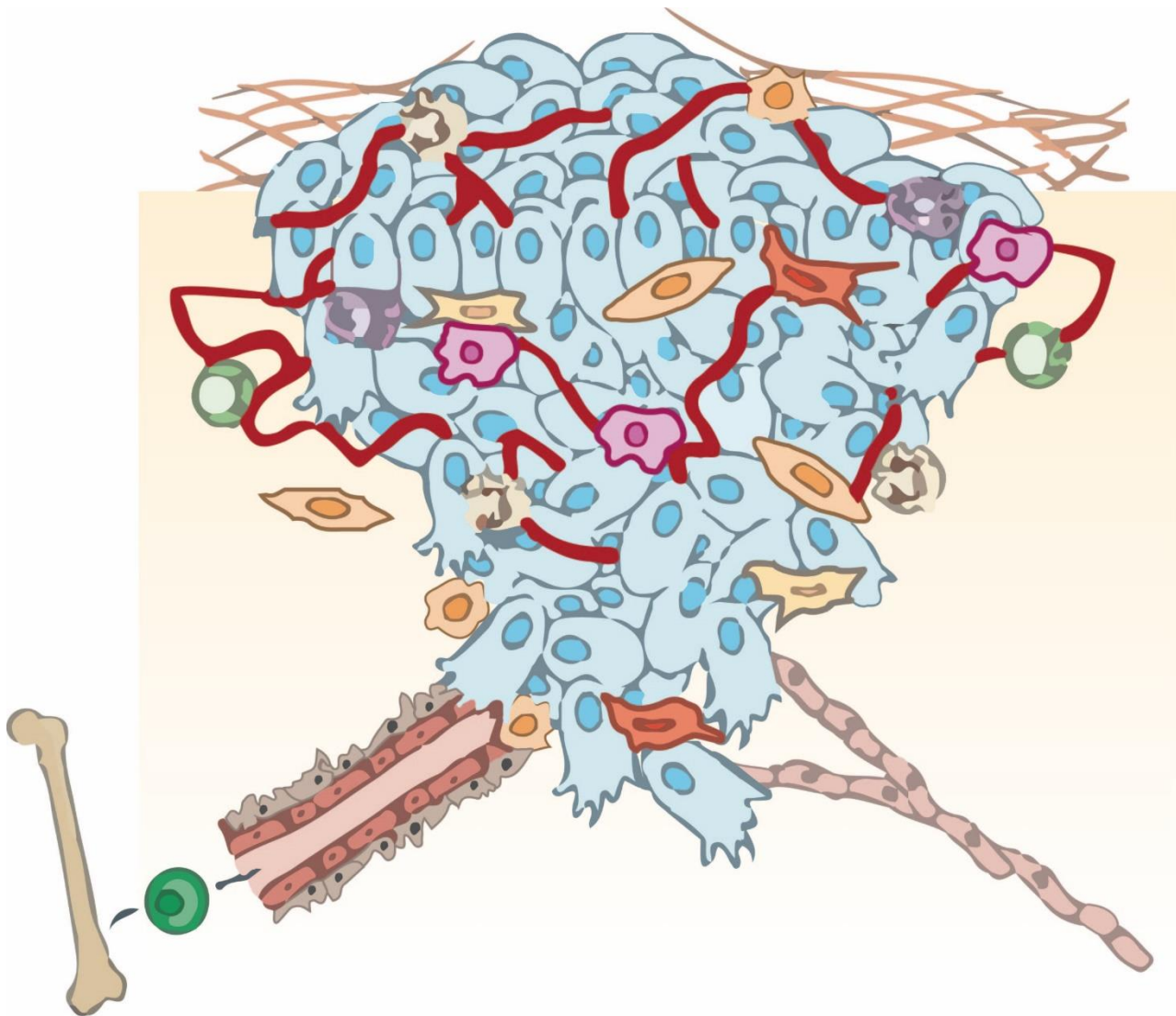
CONCLUSION

Figure de conclusion.....	224
---------------------------	-----

PERSPECTIVES

Figure 1.....	226
Figure 2.....	229
Figure 3.....	231

INTRODUCTION


















 CDMO	 Mastocyte	 Monocyte	 Cellule endothéliale	 Cellule tumorale
 Macrophage	 CMI	 Lymphocyte	 Péricyte	 Cellule endothéliale lymphatique
 Neutrophile	 CSM	 Fibroblaste	 Vaisseau sanguin	 Matrice extracellulaire (MEC)

Figure 1 : Le microenvironnement tumoral

La tumeur est entourée par un microenvironnement complexe comprenant les cellules endothéliales, qui tapissent les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les fibroblastes résidents et les fibroblastes associés aux cancers (CAF) et une grande variété de cellules dérivées de la moelle osseuse comme les macrophages, les lymphocytes, les mastocytes, les neutrophiles. Ce microenvironnement participe au développement tumoral, notamment via la sécrétion de cytokines, de facteurs de croissances ou encore via le remodelage de la matrice extracellulaire.

CDMO : cellules de la moelle épinière ; CMI : cellules myéloïdes immunosuppressives ; MSC : cellules souche mésenchymateuse.

Adapté de (Joyce and Pollard, 2009).

Chapitre 1 :

Le microenvironnement tumoral

Les cancers ne sont pas seulement un amas de cellules cancéreuses. Ils forment un organe complexe dans lequel des cellules saines sont recrutées et sont corrompues par les cellules malignes (figure 1). Les interactions entre les cellules tumorales et les cellules saines créent le microenvironnement tumoral. Les cellules non malignes du microenvironnement aident à la progression tumorale à tous les stades (figure 2). Les communications intercellulaires mettent en jeu un réseau complexe et dynamique de cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, d'enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) et de composants matriciels. Tout cela permet de réguler un grand nombre de perturbations des propriétés chimiques ou biophysiques des tissus tumoraux. L'activité des cellules du microenvironnement ressemble au processus de cicatrisation, même si on retrouve également des cellules immunitaires comme les macrophages dans les tumeurs malgré une absence d'inflammation chronique (Grivennikov et al., 2010; Mantovani et al., 2008).

L'importance du stroma tumoral a été décrite pour la première fois à la fin du XIX^{ème} siècle avec la théorie de « la graine et du sol » de Stephen Paget. Dans sa théorie, il postulait que les métastases d'un type de cancer, « la graine », vont toujours se former dans un site spécifique, « le sol », basé sur ses similarités avec le site primaire de la tumeur. Le Dr Dvorak, en 1986, va ensuite caractériser la tumeur comme « une blessure qui ne guérit jamais » (Dvorak, 1986).

Ces 15 dernières années, le microenvironnement tumoral est sujet à de nombreuses études pour comprendre son rôle dans la progression tumorale et la résistance thérapeutique (figure 2). Les caractéristiques communes des différents microenvironnements tumoraux retrouvés dans des cancers d'origine variée suggèrent que le ciblage des cellules non malignes du microenvironnement ou de leurs interactions avec les cellules cancéreuses pourrait améliorer la prise en charge du patient (Belli et al., 2018; Joyce, 2005; Wang et al., 2017).

Récemment, une étude a montré que le microenvironnement tumoral du cancer du pancréas est divisé en sous parties, qui sont soit riches en fibroblastes, en cellules immunitaires et en cellules tumorales agressives, soit riches en matrice et pauvre en fibroblastes activés et cellules immunitaires pro-tumorales (Grunwald et al., 2021).

Le mélanome possède également son propre microenvironnement tumoral (Villanueva and Herlyn, 2008) qui dépend du lieu de la tumeur primaire. Le microenvironnement du mélanome cutané est desmoplasique, c'est-à-dire constitué de fibroblastes avec une accumulation massive de composants de la MEC tels que de la fibrine, de la fibronectine, des collagènes (I, III, VI, XV, XVIII), de la laminine 7, des ténascines, de l'hyaluronane ou de l'ostéopontine, et myxoïde, à savoir riche en protéoglycanes (Ruiter et al., 2002). Les processus qui ont lieu dans le microenvironnement tumoral du mélanome incluent la protéolyse du collagène et de l'élastine au niveau du front d'invasion, ainsi que l'infiltration de lymphocytes et l'angiogenèse (Labrousse et al., 2004).

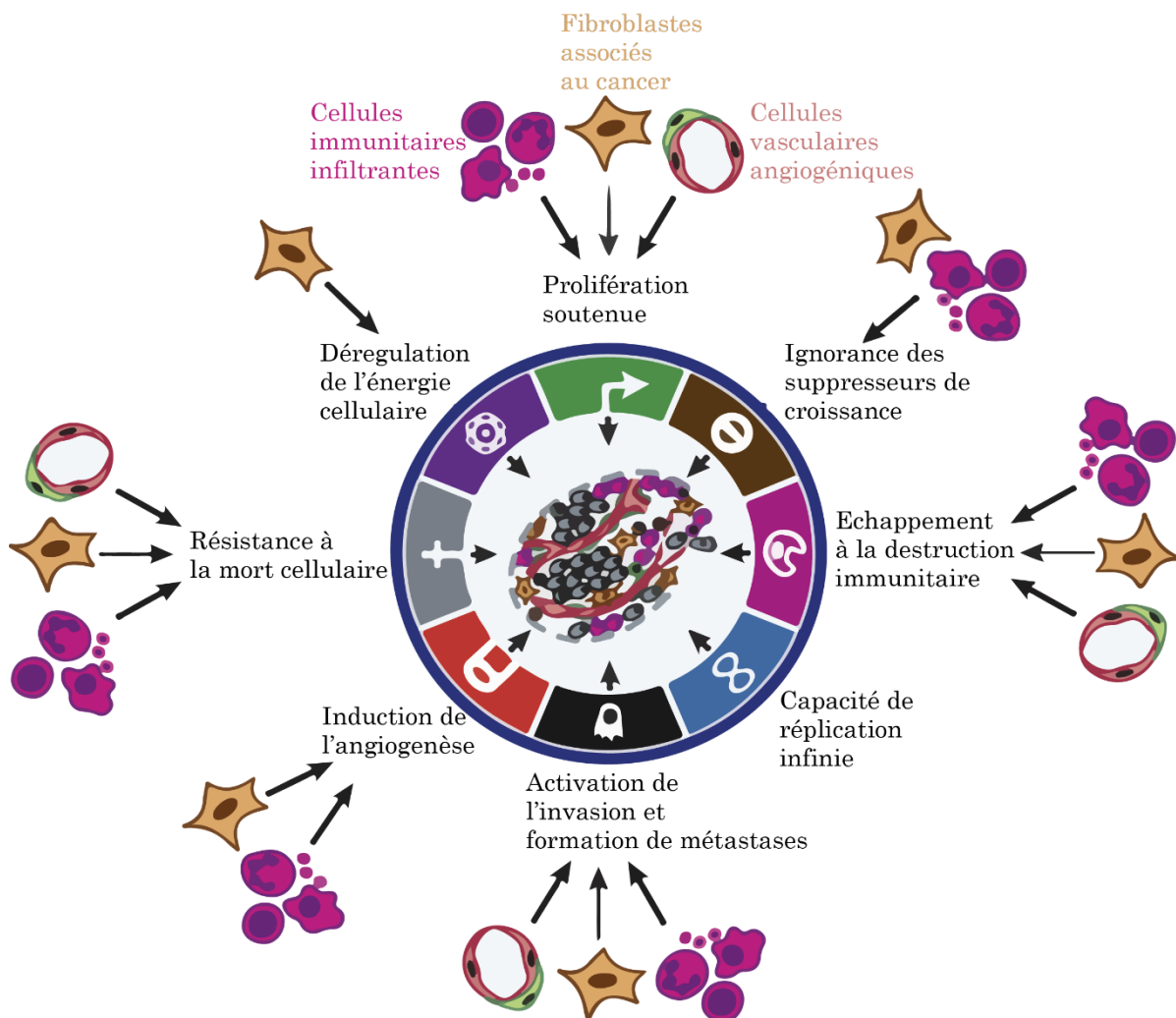


Figure 2 : Rôle des cellules du microenvironnement tumoral dans les propriétés tumorales

Parmi les huit « hallmarks of cancer » (Hanahan and Weinberg, 2011), il y en a sept qui impliquent les cellules stromales du microenvironnement tumoral. Les cellules stromales peuvent être divisées en trois groupes : les cellules immunitaires, les FAC et les cellules endothéliales. Ces différents types cellulaires ont des implications diverses dans les différents « hallmark of cancer ». Leurs implications diffèrent selon le type de tumeur et l'organe de la tumeur primaire.

Adapté de (Hanahan and Coussens, 2012)

I. Les principaux constituants du microenvironnement tumoral

La composition du microenvironnement tumoral peut varier d'une tumeur à une autre mais on retrouve globalement les mêmes types cellulaires et constituants non-cellulaires qui se divisent en trois groupes :

- Les cellules d'origine hématopoïétique
- Les fibres nerveuses
- Les cellules d'origine mésenchymateuse
- Les composants non cellulaires

A. Les cellules d'origine hématopoïétique

Les cellules d'origine hématopoïétique jouent un rôle dans l'inflammation des tumeurs, régulent la réponse immunitaire tumorale et participent à l'angiogenèse, la croissance tumorale ou la dissémination métastatique.

a) Les cellules de la lignée lymphoïde

1. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des cellules du système immunitaire adaptatif qui permettent d'amplifier la réponse immunitaire avec une réponse spécifique à l'antigène et une réponse mémoire, si l'organisme est de nouveau confronté à l'agent infectieux.

Différentes populations de lymphocytes T sont présentes au sein du microenvironnement tumoral. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, capables de tuer les cellules tumorales, sont associés à un bon pronostic pour les patients (Fridman et al., 2012). Les lymphocytes T CD4⁺ favorisent la croissance tumorale (Fridman et al., 2012). Notamment, les lymphocytes T CD4⁺ les plus décrits pour être pro-tumoraux sont les cellules T régulatrices (Treg) (Hsieh et al., 2012). Les Treg produisent de l'IL-10 et du TGFβ (Transforming Growth Factor β) qui inhibent la reconnaissance et la dégradation des cellules tumorales par le système immunitaire (Campbell and Koch, 2011). Ils corrélerent donc avec un mauvais pronostic dans de nombreux types de cancers.

Dans la majorité des cancers, les lymphocytes T n'arrivent pas à éliminer correctement les cellules tumorales (Boon et al., 2006), notamment à cause des différents mécanismes immunosuppresseurs dans le microenvironnement tumoral (Schreiber et al., 2011). L'augmentation de l'expression de PD-1 (programmed cell death 1) à la surface des cellules T ainsi que son interaction avec son ligand PD-L1 à la surface des cellules tumorales ou des cellules dendritiques pourrait expliquer la dysfonction des cellules T. Les immunothérapies ciblent cette interaction et sont utilisées pour les patients en clinique dans le cas du mélanome ou d'autres tumeurs solides (Balar et al., 2017 ; Borghaei et al., 2015 ; Motzer et al., 2015 ; Robert et al., 2014).

2. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont également des cellules du système immunitaire adaptatif. L'infiltration des lymphocytes B dans le microenvironnement est de bon pronostic pour certains cancers du sein ou des ovaires (Coronella et al., 2001 ; Milne et al., 2009). Toutefois, des études pré-cliniques montrent que les lymphocytes B inhibent la réponse cytotoxique des lymphocytes T favorisant leur rôle pro-tumoral dans les carcinomes épithéliaux (de Visser et al., 2005; Qin et al., 1998). De plus, une population de lymphocytes B, appelés B régulateurs (Breg), augmente la progression tumorale et inhibe la réponse immunitaire spécifique contre la tumeur (Mauri and Bosma, 2012; Olkhanud et al., 2011).

Dans le mélanome, la présence de lymphocytes B est marqueur de bon pronostic (Selitsky et al., 2019) et également un marqueur de réponse pour les immunothérapies (Griss et al., 2019). Pourtant les lymphocytes B peuvent aussi être responsables de la résistance thérapeutique dans le mélanome via leur production d'IGF-1 (Somasundaram et al., 2017).

3. Les cellules « Natural Killer »

Les cellules « Natural Killer » (NK) sont un type de lymphocyte cytotoxique du système immunitaire inné. Pour de nombreux cancers comme le cancer colorectal ou le cancer du poumon, la présence de cellules NK est un marqueur de bon pronostic (Tachibana et al., 2005). Pourtant, les cellules NK perdent leur fonction dans le stroma tumoral à cause du TGF β produit par les cellules tumorales et ne sont plus capables d'exercer leur fonction normale qui consiste à tuer les cellules tumorales et (Fridman et al., 2012).

b) Les cellules de la lignée myéloïde

1. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytaires du système immunitaire inné. Lors de la réponse immunitaires, les macrophages vont se différencier en macrophages matures et polarisés en deux sous-groupes. Les macrophages M1 sont impliqués dans la réponse inflammatoire et l'immunité antitumorale tandis que les macrophages M2 exercent plutôt des activités anti-inflammatoires et pro-tumorales. Les macrophages associés à la tumeur (Tumor-associated macrophages, TAM) sont abondants dans beaucoup de cancers et leurs activités sont principalement pro-tumorigènes, suggérant que les TAM proviennent de macrophages M2 (Biswas et al., 2006). Les TAM participent, notamment, à la migration, l'invasion et la formation de métastases ou l'angiogenèse (Condeelis and Pollard, 2006; Lin et al., 2006) et leur présence dans le microenvironnement tumoral est un marqueur de mauvais pronostic (Bingle et al., 2002). Dans le mélanome, les cellules tumorales vont recruter des TAM en sécrétant du MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) ou du VEGF (Koga et al., 2008; Skobe et al., 2001).

2. Les cellules myéloïdes suppressives

Les cellules myéloïdes suppressives (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) sont définies comme une population de cellules immunitaires inhibitrices, immatures, activées par différentes cytokines produites par les tumeurs (Gabrilovich et al., 2012). Ces cellules peuvent se différencier en TAM (Sica and Bronte, 2007), inhiber l'activation des lymphocytes T CD8⁺ (Kusmartsev et al., 2004) ou induire le développement des Treg (Huang et al., 2006) et la polarisation des macrophages en TAM (Sinha et al., 2007). Dans le cas du mélanome, les MDSC sont associés à une augmentation de la résistance aux immunothérapies (Huber et al., 2018).

3. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (Dendritic cells, DC) sont capables de produire et présenter l'antigène lors de la réponse immunitaire. L'infiltration de DC dans la tumeur est un marqueur de mauvais pronostic (Li et al., 2017 ; Treilleux et al., 2004) car ils suppriment la réponse des lymphocytes T CD8⁺ au niveau de la tumeur (Fu and Jiang, 2018) ou stimulent la formation de Treg associée à la progression tumorale (Ito et al., 2007). L'hypoxie et l'inflammation tumorale perturbent aussi la réponse antitumorales des DC du microenvironnement tumoral. D'un autre côté, une stimulation thérapeutique des DC peut leur permettre de promouvoir la réponse immunogène antitumorale (Demoulin et al., 2013). Par exemple, dans un modèle murin de mélanome, l'utilisation d'un agoniste du récepteur TLR7, l'Imiquimod, entraîne le recrutement de DC matures qui vont éliminer les cellules tumorales (Drobits et al., 2012).

4. Les neutrophiles

Les neutrophiles (Tumor-associated neutrophils, TAN) sont le type de granulocytes le plus abondant et font partie du système immunitaire inné. Les neutrophiles favorisent la croissance de la tumeur primaire et ont des effets pro-tumoraux en augmentant l'angiogenèse (Nozawa et al., 2006), la dégradation de la MEC (De Larco et al., 2004) et la suppression immunitaire (Youn and Gabrilovich, 2010). Les TAN peuvent également jouer un rôle dans la formation de métastase, dans le mélanome notamment, où ils se lient aux cellules tumorales pour faciliter leur entrée dans la circulation sanguine et donc leur dissémination (Soler-Cardona et al., 2018). De plus, une étude récente du Dr Albregues a montré, à l'aide d'un modèle murin de métastases pulmonaires de cancer du sein, que les neutrophiles produisaient des filaments de chromatines décondensés appelés NET (neutrophil extracellular traps), qui sont impliqués dans le réveil des cellules tumorales dormantes. (Albregues et al., 2018). A l'inverse, des fonctions antitumorales ont aussi été observées après activation par plusieurs cytokines (Colombo et al., 1992). Dans ces conditions les neutrophiles peuvent éliminer les cellules tumorales (Granot et al., 2011).

B. Les fibres nerveuses

Les fibres nerveuses composants les systèmes nerveux sympathique et parasympathiques participent au maintien de l'homéostasie dans les organes périphériques. C'est le cas par exemple de la prostate qui est très innervée, permettant ainsi sa croissance et sa régénération. Dans un contexte pathologique, il a été montré que certains cancers épithéliaux, dont le cancer de la prostate, sont entourés de nerfs envahis de cellules tumorales, suggérant une voie de dissémination par les fibres nerveuses (Magnon, 2013; Magnon et al., 2013). Une étude a montré que les tumeurs de la prostate sont riches en fibres nerveuses sympathiques. De plus, la destruction chirurgicale ou pharmacologique de ces fibres nerveuses sympathiques entraîne la mort des cellules tumorales. Cela montre que les fibres nerveuses sont essentielles à la survie des cellules tumorales. Les fibres nerveuses ont été ensuite retrouvés dans d'autres types de cancer comme le cancer du sein, du poumon, de la peau, de l'estomac et du pancréas (Magnon, 2020; Peterson et al., 2015 ; Pundavela et al., 2015 ; Stopczynski et al., 2014; Zhao et al., 2014). Ces fibres constituent donc un élément important du microenvironnement tumoral.

C. Les cellules d'origine mésenchymateuse

a) Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (Mesenchymal stem cells, MSC) sont des cellules multipotentes qui peuvent se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes ou d'autres types cellulaires d'origine mésenchymateuse. Les MSC sont retrouvées dans de nombreuses tumeurs primaires. L'ajout de MSC au contact de cellules peu métastatiques de cancer du sein augmente leurs capacités à disséminer aux poumons (Karnoub et al., 2007). En plus de leur fonction sur la transformation maligne, les MSC peuvent se différencier en fibroblastes associés au cancer (CAF) stimulées par la sécrétion de TGF β ou de SDF-1 (stromal cell derived factor 1) par les cellules tumorales (Direkze et al., 2004 ; Quante et al., 2011).

b) Les cellules endothéliales

Le système vasculaire tumoral a une structure anormale avec des vaisseaux sanguins hétérogènes avec des ramifications non structurées et des fuites qui entraînent l'inégalité du flux sanguin, de l'oxygénation et de la distribution des nutriments, ce qui augmente les zones d'hypoxie et facilite la dissémination métastatique (Carmeliet and Jain, 2011). Les cellules endothéliales, en formant le système vasculaire tumoral, sont donc des acteurs importants de la tumorigenèse et de la dissémination métastatique.

De plus, les tumeurs stimulent l'angiogenèse de vaisseaux lymphatiques (Alitalo, 2011). Les cellules endothéliales lymphatiques et les vaisseaux lymphatiques qu'elles forment jouent un rôle important dans l'invasion des cellules tumorales car ces dernières peuvent les emprunter pour leur dissémination. L'augmentation du flux lymphatique qui draine les tumeurs, améliorant ainsi la communication entre la tumeur et le ganglion, peut également provoquer un stress mécanique dans les CAF qui vont ainsi produire une MEC plus rigide qui va altérer la réponse immunitaire antitumorale (Swartz and Lund, 2012).

c) Les péricytes

Les péricytes, ou cellules stromales périvasculaires, sont des composants de la vascularisation tumorale en fournissant un support structural aux vaisseaux sanguins (Armulik et al., 2011). Un faible taux de péricytes couvrant les vaisseaux drainants la tumeur est associé à un mauvais pronostic dans le cancer de la vessie ou le cancer colorectal (O'Keeffe et al., 2008 ; Yonenaga et al., 2005), qui peut s'expliquer par le fait que la déplétion en péricytes entraîne une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins et donc l'augmentation de l'hypoxie et des capacités métastatiques des cellules tumorales (Cooke et al., 2012).

d) Les fibroblastes

Les fibroblastes sont le type cellulaire le plus abondant du derme. En condition physiologique, les fibroblastes sont les cellules qui synthétisent la MEC et participent à la cicatrisation. Les fibroblastes ont une morphologie étoilée ou fusiforme. Ils sont dans un état quiescent et s'activent pour devenir des myofibroblastes lors de la cicatrisation (Darby et al., 2014), dans l'inflammation chronique ou la fibrose tissulaire (Desmouliere et al., 2003; Micallef et al., 2012).

1. Définition

Les fibroblastes associés au cancer (Cancer associated fibroblastes, CAF) sont le type cellulaire sain que l'on retrouve en plus grande proportion dans le microenvironnement tumoral. Lors des premières étapes de la tumorigenèse, les fibroblastes résidents naïfs jouent un rôle antiprolifératif, notamment dans le cancer ovarien ou le mélanome (Schauer et al., 2011 ; Zhou et al., 2016). Une fois recrutés et activés, les fibroblastes deviennent des CAF et acquièrent des propriétés pro-tumorales (Hanahan and Coussens, 2012; Kalluri, 2016). Les CAF possèdent des propriétés morphologiques et fonctionnelles comparables à celles des myofibroblastes mais contrairement à eux, ils n'entrent pas en apoptose et persistent dans le microenvironnement tumoral (Kalluri, 2016). Les CAF sont les principaux producteurs de la MEC tumorale et présentent des propriétés contractiles dues à une activité importante de l'actomyosine, leur permettant de générer des forces de traction entraînant le remodelage et la rigidification de la MEC.

2. Origine

Les CAF proviennent majoritairement du recrutement et de l'activation des fibroblastes résidents. Les cellules tumorales secrètent des cytokines comme le TGF β (Transforming Growth Factor β) ou LIF (leukemia inhibitory factor) ainsi que des facteurs de croissance comme le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) entraînant l'activation des fibroblastes résidents en CAF (Albregues et al., 2014a ; Anderberg et al., 2009). Les CAF peuvent également provenir de MSC de la moelle osseuse en réponse à une stimulation par le TGF β (Quante et al., 2011). Les cellules épithéliales tumorales peuvent se transformer en CAF par un processus de transdifférenciation nommé transition épithélio-mésenchymateuse (epithelial to mesenchymal transition, EMT) (Petersen et al., 2003). Par un processus similaire appelé transition endothélio-mésenchymateuse, les cellules endothéliales peuvent également se transformer en CAF (Zeisberg et al., 2007). De plus, les cellules musculaires lisses, les péricytes et les adipocytes peuvent être des sources de CAF (Crisan et al., 2008; Orimo and Weinberg, 2007 ; Xouri and Christian, 2010; Zhang et al., 2012) (figure 3).

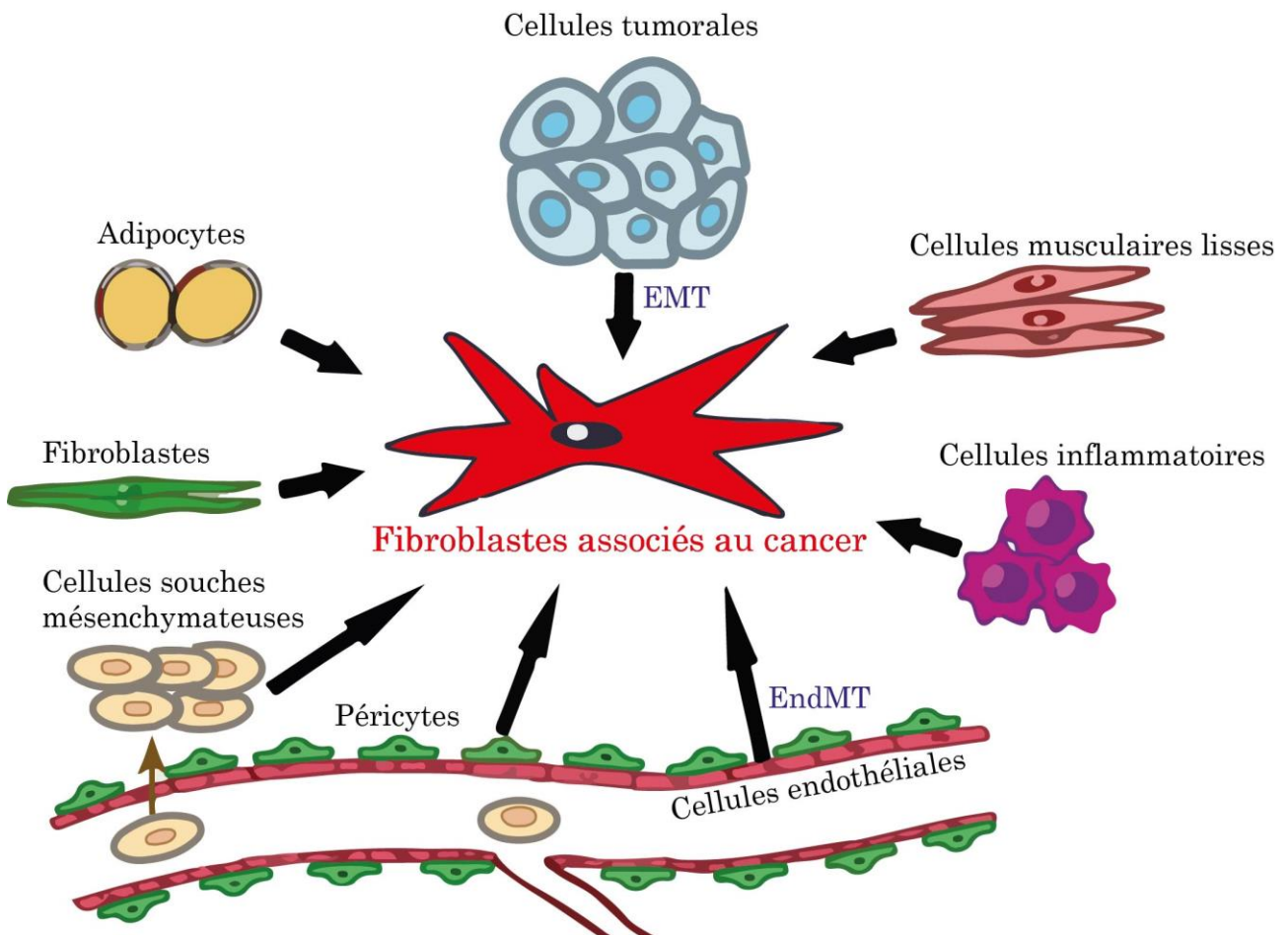


Figure 3 : Les origines cellulaires possibles des CAF

Adapté de (Zhang and Liu, 2013)

3. Caractéristiques phénotypiques et hétérogénéité

Les CAF sont caractérisés par l'expression de différents marqueurs. Ces marqueurs incluent FSP1, appelé aussi S100A4, la vimentine, α -SMA (α -smooth muscle actin), FAP α (fibroblast activation protein), PDGF receptor α ou β (PDGFR α ou PDGFR β), desmine, DDR2 (discoidin domain receptor 2), la ténascine C, le protéoglycane NG2 (neuron-gial antigen 2), SPARC (secreted protein acidic rich in cysteine) et de nombreux autres qui sont listés dans cette revue (Gascard and Tlsty, 2016). Ces marqueurs ne sont pas tous spécifiques au CAF, comme c'est le cas pour FSP1 qui est exprimé aussi par les macrophages (Osterreicher et al., 2011). FAP α est également présent dans une sous-population de cellules immunitaires CD45⁺ (Arnold et al., 2014) et dans les cellules tumorales (Girard et al., 2020; Lecacheur et al., 2020)(*Article 1*). La desmine et PDGFR β sont exprimées par les péricytes (Armulik et al., 2011). Par conséquent, il est nécessaire d'utiliser une combinaison de ces marqueurs pour reconnaître les CAF.

De plus en plus d'études s'intéressent à l'hétérogénéité des CAF qui pourrait être expliquée par leurs origines multiples. Par exemple, Öhlund *et al.* ont montré, dans le cancer du pancréas, qu'il existait 2 populations différentes de CAF : une population positive pour α -SMA, sécrétant peu ou pas de cytokines et chimiokines et présente au niveau du front de l'invasion tumorale ; et une autre population exprimant moins d' α -SMA et sécrétant plus de cytokines pro-inflammatoires (Ohlund et al., 2017). Plus récemment, Grunwald et *al.* ont identifié, en combinant des approches multi-omiques avec des données cliniques, différents sous-types de microenvironnement au sein d'une tumeur. Ainsi, la tumeur peut être composée de sous-types de microenvironnement « déserts », avec des fibroblastes fusiformes, des fibres de MEC matures lâches, de régions « réactives » qui contiennent des fibroblastes plus gros, avec de gros noyaux, peu de composants matriciels et riches en infiltrat immunitaire et des régions avec des niveaux intermédiaires des 2 précédents sous-types. Ces différents sous-types proviennent de fibroblastes ayant pris des voies de différenciation différentes (Grunwald et al., 2021).

Un nouveau sous-type de CAF, exprimant l'enzyme CD10, une métalloprotéase dépendante du Zinc, et GPR77 (G protein-coupled receptor 77) a été identifié dans des tumeurs de cancer du poumon ou du sein par l'équipe du Dr Song. Cette population de CAF favorise la croissance tumorale et la résistance à la chimiothérapie en fournissant une niche protectrice pour les cellules souches cancéreuses (Su et al., 2018).

L'équipe du Dr Mechta-Grigoriou (Costa et al., 2018) a identifié, dans le cancer du sein, 4 sous-populations de CAF caractérisées par les différents marqueurs qu'elles expriment (CD29 ou intégrine $\beta 1$, FAP α , FSP1, α -SMA, PDGFR β et CAV1 (cavéoline 1)) (Table 1). Les populations CAF-S1 et CAF-S4 ont été retrouvées dans les tumeurs tandis que les CAF-S3 sont localisés au niveau juxta-tumoral. La population CAF-S2 se retrouve dans les deux compartiments. La population CAF-S1 joue un rôle important dans l'immunosuppression en attirant les lymphocytes T, en augmentant la survie des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ et en entraînant leur différenciation en cellules CD25⁺ FOXP3⁺. Ces cellules augmentent aussi la capacité des Treg à inhiber la prolifération des cellules T effectrices. La population CAF-S4, que l'on retrouve également dans la tumeur, n'est pas dotée de ses fonctions immunosuppressives.

	CD29	FAP α	FSP1	α SMA	PDGFR β	CAV1
CAF-S1	+ -	+	-/+	+	+ -/+	-
CAF-S2	-	Ø	Ø/-	Ø	Ø	Ø
CAF-S3	+ -	Ø	+ -/+	Ø/-	+ -	Ø/-
CAF-S4	+	Ø	-/+ -	+	-/+ -	Ø/-

Table 1 : Expression de différents marqueurs au sein des 4 populations de CAF
(d'après (Costa et al., 2018))

Cette étude a été complétée par l'analyse de l'hétérogénéité des CAF dans les sites métastatiques, plus particulièrement dans le ganglion lymphatique. Les quatre sous-populations de CAF que l'on retrouve dans la tumeur primaire sont également retrouvées dans le ganglion lymphatique. On y retrouve plus particulièrement les CAF-S1 et CAF-S4 qui présentent des propriétés pro-invasives, en aidant les cellules tumorales à former des métastases. Ces fonctions sont assurées par différents mécanismes régulés par les CAF-S1 et les CAF-S4. Alors que les CAF-S1 stimulent la migration des cellules tumorales en activant l'EMT via SDF-1 et TGF β , les CAF-S4, plus contractiles, induisent l'invasion tridimensionnelle des cellules tumorales par la voie Notch (Pelon et al., 2020).

4. Rôle dans les cancers

Les CAF participent à chacune des étapes de la progression tumorale, de l'initiation tumorale à la formation de métastases distantes du site primaire. Ils participent à la tumorigenèse en remodelant la MEC, en supprimant la réponse immunitaire, en sécrétant des facteurs solubles comme des facteurs de croissance ou des cytokines (figure 4). Le rôle des CAF dans l'initiation tumorale a été mis en évidence par l'étude de l'équipe du Dr Chung dans laquelle ils ont co-injecté des cellules saines de prostate avec des CAF, induisant la formation d'une tumeur (Camps et al., 1990).

Les CAF influencent la prolifération des cellules tumorales par leur sécrétion de cytokines, hormones et facteurs de croissance comme l'HGF (hepatocyte growth factor), l'EGF (epidermal growth factor), le FGF (fibroblast growth factor), le SDF-1, le CCL5 et l'IL-6 (Kalluri, 2016; Kalluri and Zeisberg, 2006; Park et al., 2020) qui présentent des effets mitogènes sur les cellules tumorales (Cirri and Chiarugi, 2011). En sécrétant du SDF-1 et du VEGF, les CAF permettent le recrutement des cellules endothéliales favorisant ainsi l'angiogénèse tumorale (Fukumura et al., 1998 ; Orimo et al., 2005).

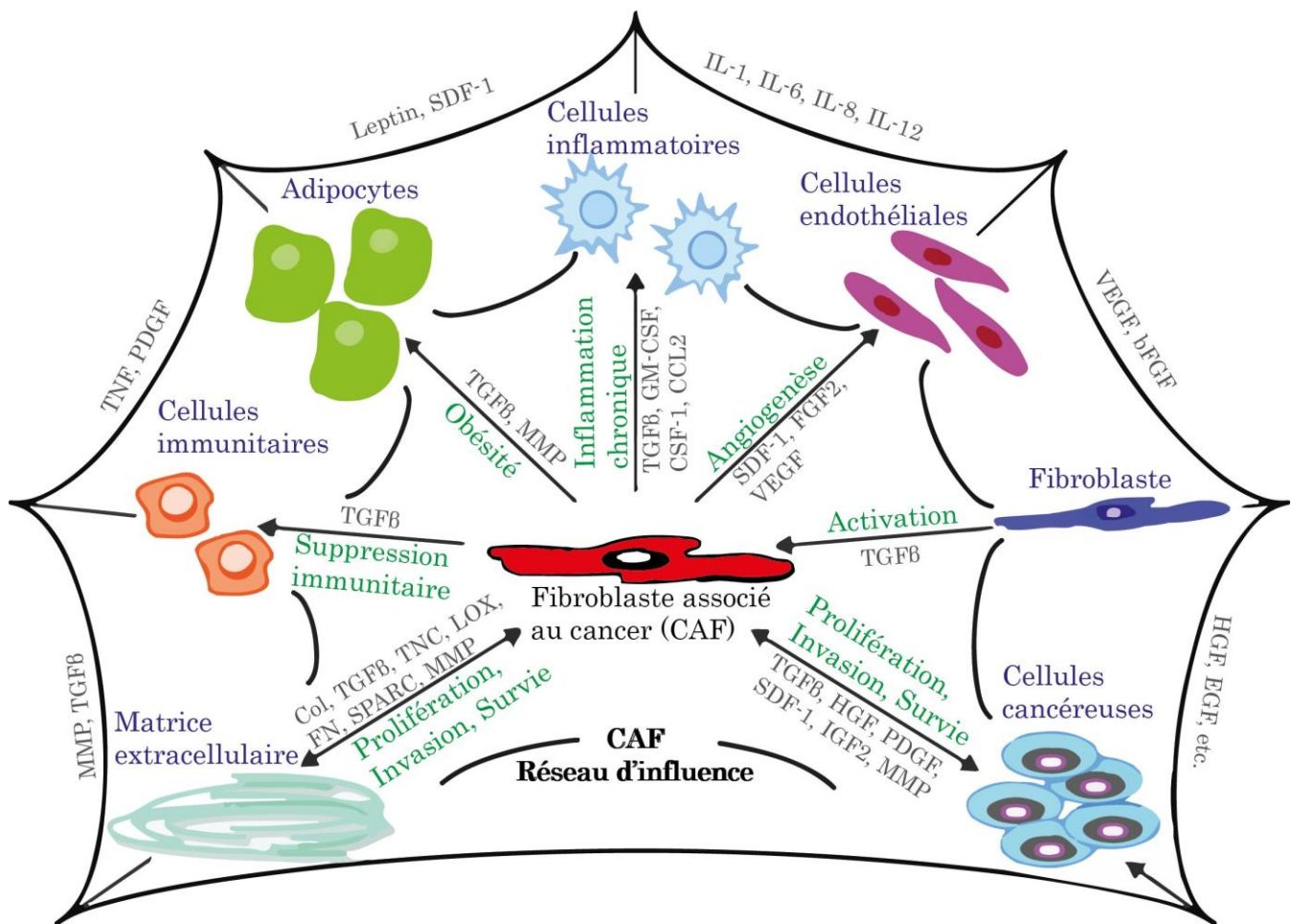


Figure 4 : Interactions des CAF avec les différentes cellules stromales et leurs rôles dans la progression tumorale

Les CAF peuvent promouvoir la tumorigenèse par différents processus comme l'angiogénèse, la prolifération, l'invasion et l'inhibition de la mort cellulaire. Ces effets passent par l'expression et la sécrétion de différentes cytokines, facteurs de croissance, protéases et protéines de la MEC comme SDF-1, FGF2, VEGF, TGFβ, HGF, ténascine-c, LOX ou les MMP). Les CAF influencent également la progression tumorale en interagissant avec les autres cellules stromales comme les adipocytes, les cellules immunitaires et les cellules endothéliales.

Adapté de (Brennen et al., 2012)

Les CAF aident au recrutement et à la modulation des fonctions des cellules immunitaires. Comme précisé précédemment, la population de CAF-S1 a été décrite comme immunosuppressive (Costa et al., 2018). De plus, la sécrétion de CCL2 par les CAF entraîne le recrutement des macrophages favorisant le développement tumoral (Hembruff et al., 2010; Ksiazkiewicz et al., 2010; Silzle et al., 2003). La sécrétion d'IL-6 par les CAF inhibe la maturation des DC et l'activation des cellules T (Park et al., 2004). Le TGF β produit par les CAF a un effet immunomodulateur, en inhibant la prolifération des cellules B et T (Kehrl et al., 1986a; Kehrl et al., 1986b), en inhibant les fonctions des cellules inflammatoires et en entraînant la transformation de cellules T naïves des Treg (Chen et al., 2003).

L'invasion et la dissémination des cellules tumorales peut être aidée par les CAF grâce à des interactions directes avec les cellules tumorales ou à la sécrétion de facteurs de croissance ou au remodelage de la MEC (De Wever et al., 2014).

Les CAF modulent la MEC qu'ils produisent en sécrétant des protéases qui dégradent la MEC, nommées métalloprotéases (MMP), qui aide les cellules tumorales à traverser le tissu adjacent pour s'échapper de la tumeur primaire (Kalluri and Zeisberg, 2006). Les CAF peuvent aussi creuser des chemins d'invasion pour les cellules tumorales (Gaggioli et al., 2007a). Les MMP produites par les CAF peuvent promouvoir de façon directe l'invasion des cellules tumorales, comme MMP3 qui entraîne l'EMT dans les cellules tumorales de cancer du sein en clivant le domaine extracellulaire de la E-Cadhérine qui va être dégradée (Lochter et al., 1997). Dans le mélanome, des évidences, *in vitro*, ont montré l'importance des MMP produites par les CAF dans l'invasion des cellules tumorales (Zhou et al., 2015).

Les CAF sont donc des acteurs majeurs de la progression tumorale dans le microenvironnement car ils participent à la majorité des processus de la tumorigenèse (appelés « hallmarks of cancer » (Hanahan and Weinberg, 2011)) en interagissant, non seulement avec les cellules tumorales, mais également avec les autres cellules du stroma tumoral comme les adipocytes, les cellules immunitaires ou les cellules endothéliales, pour promouvoir la progression tumorale de façon plus agressive (figure 4). De plus, les CAF jouent un rôle important dans la résistance thérapeutique, qui sera détaillé dans le *chapitre 3*.

D. Les composants non cellulaires du microenvironnement

Le phénotype d'une tumeur n'est pas seulement dépendant des caractéristiques internes des cellules tumorales ou des cellules stromales mais il dépend aussi des interactions avec des composants non cellulaires du microenvironnement tumoral qui peuvent être des cytokines, des facteurs de croissance, des métabolites et des composants de la MEC (Jun and Lau, 2011; Koontongkaew, 2013) (figure 5). L'interaction des cellules tumorales avec les cellules stromales augmente la production de ces différents composants pour favoriser la progression tumorale (Patel et al., 2018).

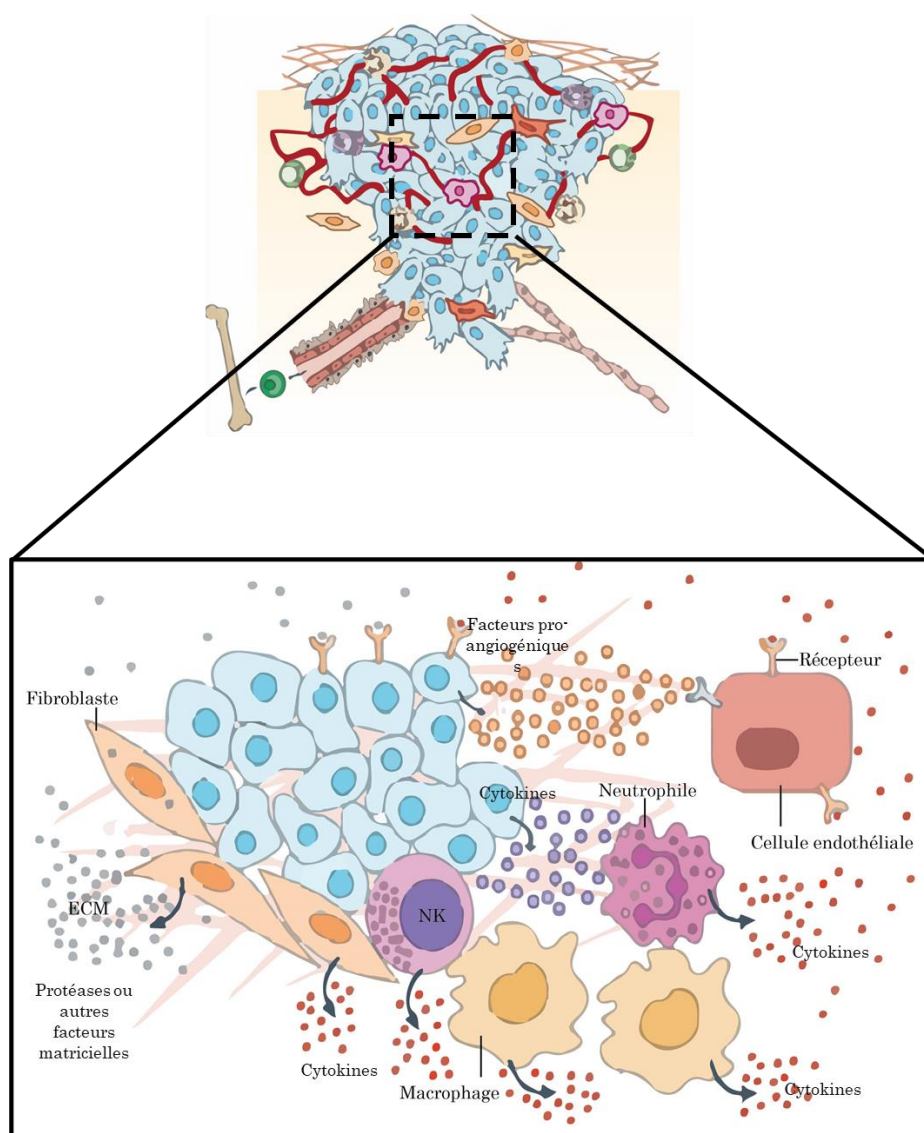


Figure 5 : Exemple de composants non-cellulaires du microenvironnement tumoral

Adapté de (Cavallo et al., 2007)

a) Les composants non matriciels

1. Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance du microenvironnement ont été décrits pour promouvoir la progression tumorale et la formation de métastases. Ils permettent la communication inter-cellulaire entre différentes populations cellulaires, avec chacun leur type de récepteurs spécifiques, et participent à chaque étape du développement tumoral. Le VEGF joue un rôle important dans l'angiogenèse en recrutant les cellules endothéliales (Carmeliet and Jain, 2011). Le HGF, quant à lui, va permettre l'activation de fibroblastes normaux en CAF. (Wu et al., 2013). Le PDGF va également établir une communication avec les CAF ou les macrophages pour créer un microenvironnement tumoral adapté à la progression du cancer (Chu et al., 2014 ; Yang et al., 2016). Le HGF et l'IGF (insulin growth factor) stimule aussi l'EMT pour permettre l'invasion des cellules tumorales (Liu et al., 2017; Wang et al., 2014).

2. Les cytokines

Les différentes cytokines du microenvironnement tumoral sont les interleukines, la famille des TNF, la famille des interférons et la famille des TGF β (Dranoff, 2004; Fernandes et al., 2015). Les cytokines influencent la tumorigenèse en participant à la communication paracrine qui s'établit entre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement tumoral, en favorisant la croissance des cellules tumorales ou en recrutant les cellules du système immunitaire (Dranoff, 2004). Par exemple, l'interleukine IL-6 augmente la survie et la progression tumorale en induisant l'activation de voie de réparation des dommages à l'ADN dans les cellules tumorales (Kumari et al., 2016) tandis que l'IL-35 stimule les macrophages pour qu'ils créent un environnement pro-inflammatoire (Zou et al., 2017).

3. Les métabolites

Les métabolites sont fournis par la circulation sanguine drainant la tumeur. La concentration en métabolites diminue lorsqu'on s'éloigne de l'entrée des vaisseaux entraînant l'apparition de gradients de métabolites dans la tumeur (Schworer et al., 2019). Les CAF produisent des métabolites riches en énergie comme le lactate, les corps cétoniques, les acides gras, la glutamine et d'autres acides aminés dans l'espace extracellulaire, qui participent à la croissance des cellules tumorales (Kalluri, 2016). Le lactate produit par les cellules tumorales diminue la production d'IFN γ par les lymphocytes T et empêche l'activation des cellules NK, promouvant la croissance tumorale (Brand et al., 2016).

b) La matrice extracellulaire (MEC)

La MEC est un réseau complexe de protéines, polysaccharides et d'eau qui comprend des composants non-cellulaires du microenvironnement des organes et des tissus. La MEC est un composant majeur biologiquement actif des tissus qui influence la morphologie cellulaire, le développement tissulaire et l'homéostasie. La MEC régule la disponibilité des facteurs de croissance et cytokines et maintient l'hydratation et le pH du microenvironnement. La MEC fournit des signaux biochimiques et biophysiques nécessaires à la morphologie tissulaire et représente une structure dynamique dans laquelle ses composants sont déposés, dégradés et modifiés (figure 6). Une dérégulation dans un de ces processus de maintien de l'homéostasie de la MEC peut entraîner des pathologies comme la fibrose tissulaire ou le cancer (Muncie and Weaver, 2018).

1. Composition de la MEC

Les composants principaux de la MEC sont des protéines macromoléculaires qui se divisent en quatre classes : les collagènes, les protéoglycanes, les glycoprotéines et les élastines. La matrice est également constituée de protéines matricellulaires, associées à la MEC, de protéines régulatrices de la MEC et de facteurs sécrétés. Le Dr Naba et collaborateurs ont regroupé ces différentes familles de protéines en deux groupes : le « core matrisome » regroupant les protéines structurales et le « extracellular matrix associated proteins » composé des protéines associées à la MEC (Naba et al., 2016).

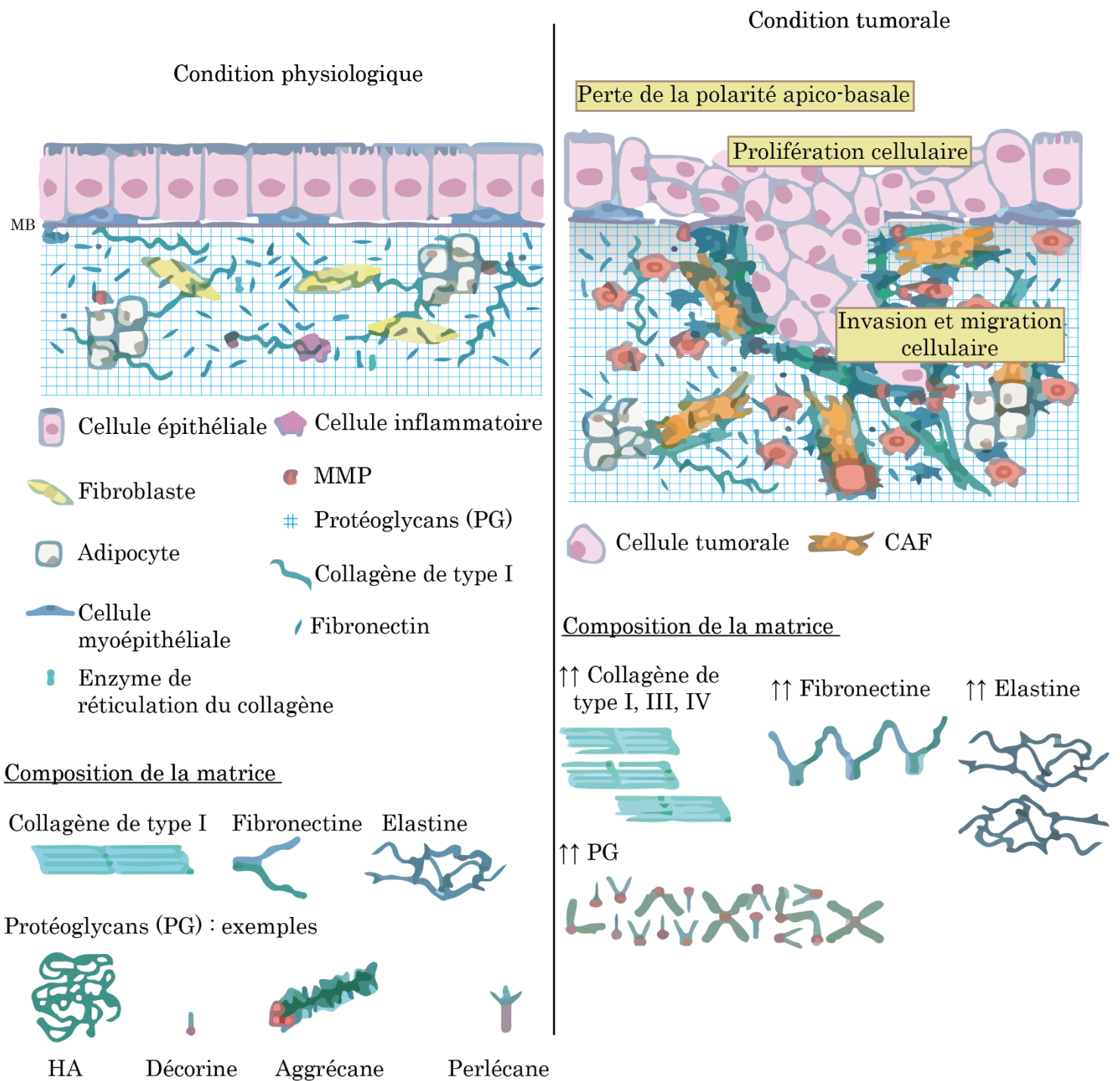


Figure 6 : La MEC normale vs tumorale

La MEC tumorale est très différente la MEC physiologique principalement par sa composition. Les principaux composants de la MEC physiologique sont sécrétés de façon plus importante lors de la tumorigénèse par les CAF. Ces composants sont les collagènes de type I, III et IV, la fibronectine, l'élastine et les protéoglycans (PG). Son organisation est également différente avec l'alignement des fibres de collagènes et de fibronectine. Cet alignement de la MEC entraîne sa rigidification qui favorise la progression tumorale.

Adapté de (Frantz et al., 2010)

i. Collagènes

Les collagènes sont les protéines fibreuses les plus abondantes dans la MEC. Ils sont synthétisés par les fibroblastes. Les collagènes sont formés de 3 hélices de chaîne alpha qui s'assemblent en molécules homo ou hétérotrimériques selon le type de collagène considéré (figure 7). Toutes les combinaisons forment 28 types de collagènes différents. Les collagènes sont classés en sept groupes, selon leur fonction, leur structure et leur homologie de domaine (Theocharis et al., 2016) (Table 2). Les collagènes fibrillaires sont le type le plus fréquent et s'assemblent en structure à triple hélice. Ces triples hélices vont ensuite s'auto-assembler en fibrilles plus ou moins épaisses (figure 7). Les collagènes non fibrillaires, comme le collagène IV, forment des réseaux de maillage.

Les CAF organisent les fibrilles de collagène en feuillets et câbles et modulent l'alignement des fibres de collagène (Frantz et al., 2010). Lors de la fibrose, il y a une accumulation de protéines matricielles comme les collagènes fibrillaires de type I et III et une augmentation de la dégradation du collagène IV (Kauppila et al., 1998; Lopez-Nova and Nieto, 2009) due à l'augmentation de l'activité inflammatoire et la sécrétion des facteurs tumorigènes comme le TGF β (Margadant and Sonnenberg, 2010). La fibrose a été observée dans certains sites métastatiques pour faciliter l'établissement de métastases.

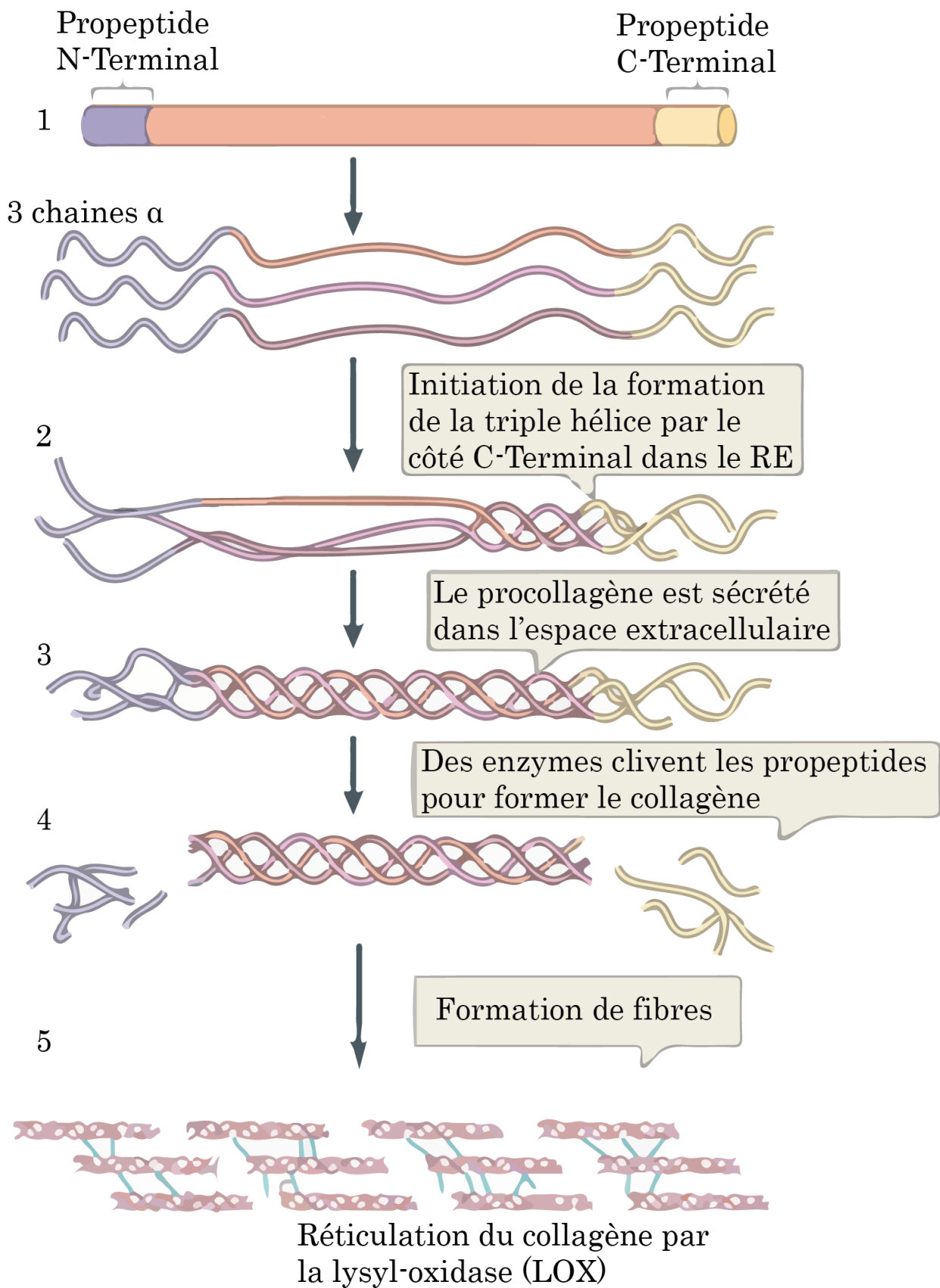


Figure 7 : Les étapes de la formation du collagène mature

Adapté de (Mouw et al., 2014a)

Classes	Type	Gènes codant pour la protéine	Description
Fibrille	I	<i>COL1A1 et COL1A2</i>	Fibrilles que l'on trouve dans les matrices stromales fibreuses comme la peau, les os, les tendons et les ligaments
	II	<i>COL2A1</i>	
	III	<i>COL3A1</i>	
	V	<i>COL5A1, COL5A2 et COL5A3</i>	
	XI	<i>COL11A1, COL11A2 et COL11A3</i>	
	XXIV	<i>COL24A1</i>	
	XXVII	<i>COL27A1</i>	
FACIT	IX	<i>COL9A1, COL9A2 et COL9A3</i>	Ponts moléculaires associés aux fibrilles des collagènes fibrillaires de type I (XII, XVI, XIX, XXI) et type II (IX, XVI, XIX)
	XII	<i>COL12A1</i>	
	XIV	<i>COL14A1</i>	
	XVI	<i>COL16A1</i>	
	XIX	<i>COL18A1</i>	
	XX	<i>COL20A1</i>	
	XXI	<i>COL21A1</i>	
	XXII	<i>COL22A1</i>	
Membrane basale	IV	<i>COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5 et COL4A6</i>	Réseau de structure composé de laminines et de protéines de la membrane basale
Chaîne longue	VII	<i>COL7A13</i>	Fibrilles d'ancrages associées à la membrane basale
Filamenteux	VI	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL6A5, COL6A6</i>	Microfibrilles perlées
Chaîne courte	VIII	<i>COL8A1</i>	Structure hexagonale
	X	<i>COL10A1</i>	Ces collagènes régulent et sont régulés par l'hypertrophie dans le cartilage
MULTIPLEXIN	XV	<i>COL15A1</i>	Multiples domaines à triple hélice avec des interruptions contenant des GAG sulfate de chondroïtine et sulfate d'héparine
	XVIII	<i>COL18A1</i>	
MACIT	XIII	<i>COL13A1</i>	Molécules de surface avec des domaines extracellulaire, membranaire et intracellulaire
	XVII	<i>COL17A1</i>	
	XXIII	<i>COL21A1</i>	

Table 2 : Les différents types de collagène

Adapté de (Mouw et al., 2014a)

ii. Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des protéines avec un domaine principal relié de façon covalente à des glycosaminoglycanes (GAG). Les protéoglycanes sont divisés en quatre catégories, selon leur localisation : les protéoglycanes extracellulaires que l'on retrouve dans la MEC (aggrécane, versicane, neurocane et brevican) ; les protéoglycanes péricellulaires (perlécane et agrine) ; les protéoglycanes de surface (les syndécane, bétaglycane, glypican, phosphacan). Les aggrécane et versicane sont les protéoglycanes que l'on retrouve dans la majorité des tissus (Iozzo, 2000).

Le hyaluronane, ou acide hyaluronique (HA), est un GAG retrouvé dans de nombreux tissus qui possède la propriété unique de ne pas pouvoir s'attacher de façon covalente aux peptides (Laurent and Fraser, 1992). Le HA, comme les protéoglycanes, peut se lier à d'autres protéoglycanes et glycoprotéines comme le versicane ou la ténascine pour rendre former une couche matricielle couvrant les neurones, rendant le réseau neuronal plus condensé et rigide (Kwok et al., 2011).

Grâce à leur capacité à se lier à d'autres protéines matricielles, les protéoglycanes contribuent à la structure de la MEC. Ils jouent un rôle important en condition physiologique et dans le développement de pathologies comme les cancers (Iozzo and Sanderson, 2011; Theocharis et al., 2010). Dans le cancer du poumon, la voie MAPK p38 régule la production de HA dans les CAF et joue un rôle dans la tumorigenèse du cancer du poumon (Brichkina et al., 2016).

iii. Glycoprotéines

Les glycoprotéines sont similaires aux protéoglycanes dans le sens où ils consistent en des unités peptidiques qui se lient à des groupes carbohydrates. Contrairement aux protéoglycanes qui possèdent de longues chaînes de répétition de disaccharides, les glycoprotéines contiennent des carbohydrates ramifiés et volumineux avec peu de structures répétées. Les glycoprotéines contiennent un groupe fonctionnel qui reconnaît et se lie aux autres molécules de la MEC (comme le collagène), à des molécules d'adhésion cellulaire (comme les intégrines) ou à des facteurs de croissance sécrétés. Elles contribuent à ce que la MEC soit un réseau cohésif de protéines. La fibronectine, les laminines sont les glycoprotéines qui prédominent dans la MEC du microenvironnement (Mouw et al., 2014a).

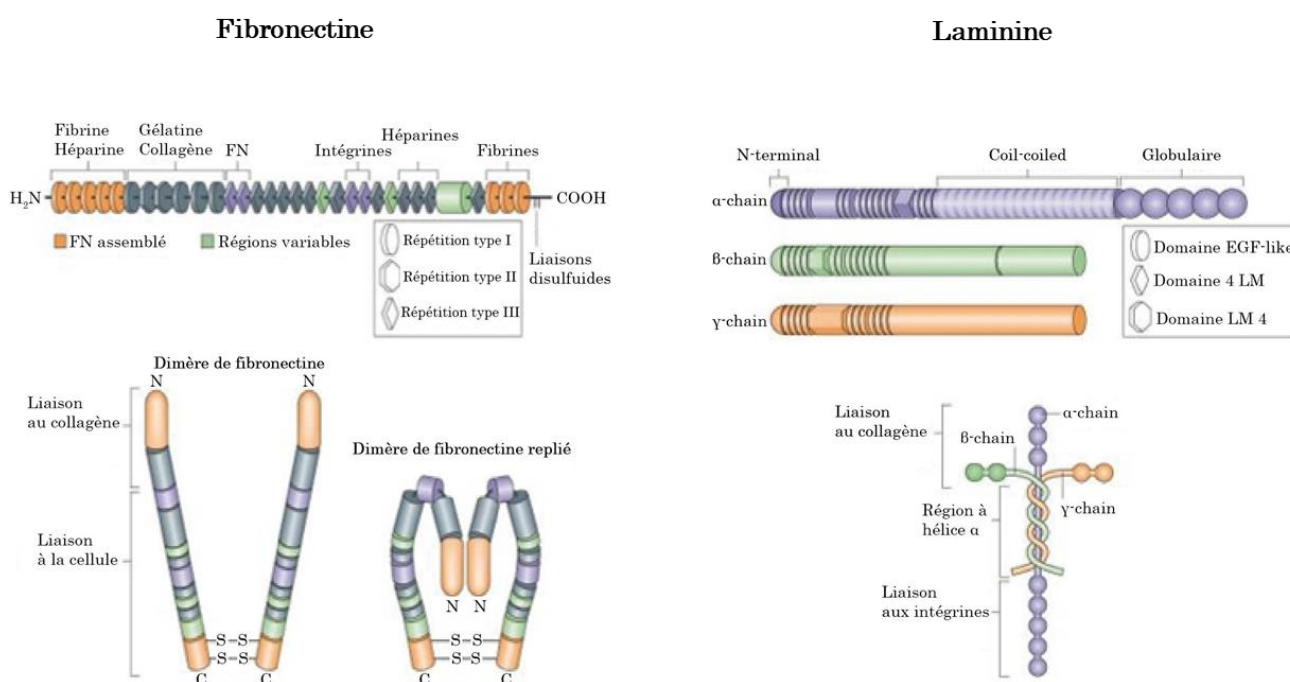


Figure 8 : Structure de la fibronectine et de la laminine

A gauche, Structure de la fibronectine. Elle est composée de 2 chaînes d'acides aminés jointes par un pont disulfure proche des résidus carboxy-terminaux. Les domaines d'interaction avec d'autres protéines matricielles et les intégrines sont indiqués.

A droite, Structure de la laminine. Elle consiste en trois chaînes d'acides aminés qui s'assemble au centre pour former une croix. Les domaines interagissant avec d'autres protéines de la matrice et les intégrines sont indiqués.

Adapté de (Mouw et al., 2014a)

• La fibronectine

La fibronectine est une grosse molécule, de 250kDa qui consiste en deux polypeptides joints par un pont disulfure (figure 8) (Pankov and Yamada, 2002). Ces sous-unités sont constituées de trois structures répétées nommées type I, type II et type III (Zollinger and Smith, 2017). Ces trois structures possèdent différents domaines qui lui permettent de se lier à des glycosaminoglycanes, des protéoglycanes, des fibrines, des héparines et des molécules transmembranaires comme les intégrines. Elle peut être synthétisée par les fibroblastes, les macrophages, les cellules endothéliales mais également les cellules tumorales. La fibronectine existe sous 2 formes : la forme plasmatique, circulante, ou la forme cellulaire, appelée aussi « oncofœtale » car elle est exprimée au cours du développement ou dans certains cancers (Hynes, 1990). Ce type de fibronectine possède 2 variants constitués d'extra-domaines ED-A et ED-B font partie de la signature de transformation tumorigénique et sont des marqueurs de l'angiogenèse tumorale et des métastases (Castellani et al., 1994; Rybak et al., 2007).

Elle est le composant le plus important de la MEC qui lui donne sa consistance. La fibronectine sert d'intermédiaire entre les différentes protéines matricielles mais également les cellules et la matrice. Il existe un lien réciproque entre la fibronectine et le collagène. En effet, sans dépôt de fibronectine, le collagène ne peut former de matrice et une fois déposé, le collagène délimite le dépôt de la fibronectine (Sottile and Hocking, 2002). La fibronectine est essentielle dans la cicatrisation, la morphogenèse embryologique, ou la régulation de comportements cellulaires tels que l'adhésion et la migration (George et al., 1993; Lenselink, 2015). Elle est également impliquée dans le développement tumoral en favorisant la prolifération, la migration ou l'angiogenèse (Rick et al., 2019). Par exemple, la fibronectine favorise la migration et l'invasion des mélanomes de façon dépendante de la voie MAPK mutée dans les mélanomes portant la mutation BRAF^{V600E} (Gaggioli et al., 2007b).

• Les laminines

Les laminines sont les constituants majeurs de la lame basale, la couche qui sépare l'épiderme du derme (Durbeej, 2010; Halper and Kjaer, 2014). Elles consistent en trois polypeptides hautement glycosylés : alpha, beta et gamma qui sont connectés au centre et forment une croix (figure 8). Il existe 5 types de chaîne alpha, 3 de beta et 3 de gamma, qui peuvent former 16 sous-types de laminines (Aumailley et al., 2005). Leur hétérogénéité génère des diversités fonctionnelles (Domogatskaya et al., 2012). En plus de leurs fonctions structurelles dans la MEC, les laminines influencent également les fonctions cellulaires par leur interaction avec les intégrines (Ramovs et al., 2017). Les laminines sont impliquées dans différents processus cellulaires comme la différenciation cellulaire, l'adhésion et la migration et sont vitales pour le maintien et la survie des tissus (Theocharis et al., 2016). Elles participent à la tumorigenèse en modulant différentes fonctions comme la prolifération, la croissance tumorale, l'EMT, la migration ou l'adhésion (Ishikawa et al., 2014 ; Patarroyo et al., 2002).

iv. L'élastine

L'élastine est une protéine structurale qui donne ses propriétés élastiques à la peau et aux vaisseaux. La tropoélastine s'auto-assemble pour former l'élastine. L'élastine fait partie des 2 constituants des fibres élastiques avec les microfibrilles. Les fibres élastiques s'assemblent très tôt pendant le développement. Une production anormale d'élastine ou de fibres élastiques peut causer des pathologies vasculaires ou cutanées (Debelle and Tamburro, 1999).

v. Protéines matricellulaires

Les protéines matricellulaires sont des protéines non-structurales de la MEC qui modulent les fonctions cellulaires en facilitant les interactions intercellulaires ou avec la MEC. Elles ont des structures variables mais des motifs de liaison à la MEC et des fonctions similaires. Ces protéines sont modérément exprimées à l'âge adulte mais leur expression augmente en condition pathologique (Alford and Hankenson, 2006; Kyriakides and Bornstein, 2003; Sage and Bornstein, 1991). Parmi les différentes protéines matricellulaires on trouve en outre : les ténascines, les thrombospondines, l'ostéopontine, la fubiline et SPARC.

Différentes modulations des forces du microenvironnement comme la contractilité cellulaire, les forces de cisaillement ou les forces d'étirements peuvent induire l'expression de certaines protéines matricellulaires comme la thrombospondine (TSP), SPARC, la ténascine tandis que d'autres, comme l'ostéopontine, voient leur expression diminuer, révélant un rôle spécifique de chaque protéine matricellulaire selon les conditions fibrotiques (Asparuhova et al., 2011 ; Chen et al., 2011; Durvasula and Shankland, 2005). Les protéines matricellulaires peuvent se fixer à un grand nombre de récepteurs cellulaires, comme les intégrines ou les syndécanes (Murphy-Ullrich and Sage, 2014).

Les protéines matricellulaires peuvent réguler les fonctions cellulaires de façon extracellulaire ou intracellulaire. Au niveau extracellulaire, ces protéines peuvent déréguler les fonctions d'autres cellules du microenvironnement. Par exemple, SPARC, sécrété par les cellules de mélanome va agir de façon paracrine en se liant au récepteur VCAM1 (vascular adhesion molecule 1) des cellules endothéliales et entrainer une perméabilité vasculaire qui aide l'extravasation des cellules tumorales pour leur dissémination (Tichet et al., 2015). Au niveau intracellulaire, elles peuvent jouer différents rôles selon leur localisation. TSP-4 participe aux fonctions du réticulum endoplasmique en se liant à ATF6 α (Lynch et al., 2012). SPARC permet la survie du mélanome en inactivant p53 via la phosphorylation de MDM2 par AKT (Fenouille et al., 2011). La ténascine-C favorise l'EMT dans le cancer colorectal en modifiant l'activité transcriptionnelle de la β -caténine (Beiter et al., 2005). SPARC induit la perte de l'E-Cadhérine dans les mélanocytes et donc « l'EMT-like » via l'augmentation de l'expression de Snail (Robert et al., 2006) et de Slug (Fenouille et al., 2012). La protéine SPARC contrôle la résistance thérapeutique contre l'Imatinib dans la Leucémie Myéloïde Chronique de façon intracellulaire, en contrôlant l'activation de Fyn et de ERK (Fenouille et al., 2010).

vi. Les enzymes de dégradation de la MEC

Les principales enzymes de dégradation de la MEC sont les métalloprotéases (MMP) matricielles. Les MMP sont classées en six groupes : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les MT-MMP et les autres MMP. Ce classement est basé sur les spécificités de substrats, les similarités de séquence et l'organisation de leurs domaines protéiques (Visse and Nagase, 2003). Le rôle des MMP en conditions normale et pathologique est bien caractérisé au point qu'elles font l'objet de ciblage pharmacologiques (Bonnans et al., 2014; Fields, 2015). Les MMP sont produites par différents types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules inflammatoires et les cellules tumorales et sont responsables du catabolisme de toutes les protéines matricielles (Vihinen and Kahari, 2002). Les cellules collaborent entre elles pour activer cette cascade protéolytique après stimulation. En effet, les cellules stromales secrètent une forme inactive de MMP2 qui sont activées par les MMP membranaires des cellules cancéreuses (MT-MMP1) (Stahtea et al., 2007). Leur action de dégradation des protéines matricielles génère des molécules bioactives nommées matrikines qui servent de chimio-attractants pour les cellules immunitaires (Wells et al., 2015). En plus des capacités de dégradation, les MMP libèrent les cytokines et facteurs de croissance emprisonnés dans la matrice (McCawley and Matrisian, 2001). C'est notamment le cas pour le TGF β , sécrété dans la matrice sous forme d'un complexe latent, qui a besoin d'être clivé pour se détacher de son complexe et devenir actif (Yu and Stamenkovic, 2000).

Les plasmines sont des sérines protéases qui dégradent les protéines matricielles comme la fibrine, la fibronectine et les laminines et contribuent ainsi au remodelage de la MEC (Cawston and Young, 2010). Ces protéines sont activées par les activateurs du plasminogène, des protéases qui convertissent le plasminogène en plasmine, activant ainsi sa fonction fibrinolytique (Duffy and O'Grady, 1984). Les plasmines peuvent cliver la E-Cadhérine, la rendant inactive et ainsi participer à l'invasion des cellules tumorales épithéliales (Ryniers et al., 2002).

vii. Les enzymes de réticulation de la MEC

Les propriétés biochimiques et biophysiques du collagène fibrillaire dépendent des modifications post-traductionnelles qui conduisent à la réticulation des fibrilles de collagène, dictant ainsi les forces de tension aux tissus. Une fois le procollagène sécrété dans l'espace extracellulaire, clivé pour former le collagène et auto-assemblé en fibrilles, ses résidus lysines et hydroxylysines sont désaminés par une enzyme appelée lysyl oxidase (LOX) qui produit un groupe aldéhyde réactif. Cela va entraîner la réticulation covalente du collagène par des réactions de condensation. La réticulation par les lysyl-oxydases ou hydroxylases sont importantes pour les forces de tension et la stabilité structurelle des tissus. Une perte de leur activité entraîne des conséquences délétères sur l'organisme comme une fragilité osseuse ou des maladies cardiovasculaires. Une augmentation de leur activité augmente la réticulation du collagène et induit une rigidification de la matrice (Bonnans et al., 2014) notamment dans la fibrose et les cancers (Lu et al., 2012).

2. Rôles de la MEC dans le développement et la progression tumoral

La MEC contrôle le développement tissulaire et son homéostasie. Sa dérégulation contribue à la progression tumorale (figure 9). Elle ne sert pas seulement de support sur lequel les tissus s'organisent mais elle fournit également des signaux biochimiques et biophysiques qui participent à la croissance cellulaire, la survie, la migration et module le développement vasculaire et la réponse immunitaire (Pickup et al., 2014) (figure 9). Alors que des modifications génétiques initient la tumorigenèse, les cellules cancéreuses poursuivent leur développement en évoluant dans une MEC dynamique qui peut intervenir dans chaque processus de la progression tumorale.

Les tumeurs présentent très souvent un état fibrotique caractérisé par un dépôt, une organisation altérée et une augmentation de la réticulation des fibres de collagènes et autres protéines matricielles (Lu et al., 2012). La MEC tumorale est une des caractéristiques histologiques de la plupart des tumeurs solides (Levental et al., 2009; Provenzano et al., 2008) (figure 6). Par exemple, dans le cas du cancer du pancréas, une fibrose est associée à la progression tumorale et à un mauvais pronostic (Pandol et al., 2009). Dans le mélanome, l'augmentation du collagène, associée à l'expression du marqueur mélanocytaire MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) est associée à un mauvais pronostic (Miskolczi et al., 2018). L'expression d'enzyme de remodelage de la MEC comme les MMP ou les LOX sont également marqueurs de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Erler et al., 2006; Slattery et al., 2013).

La fibrose peut aussi prédisposer un tissu au cancer. En effet, les patients avec une cirrhose du foie ou une fibrose kystique, caractérisée par une accumulation anormale de collagène, ont plus de risques de développer un cancer (Neglia et al., 1995; Sorensen et al., 1998). Cela a également lieu avec la fibrose pulmonaire (Ballester et al., 2019). Et enfin, une augmentation du dépôt de collagène, visualisée par mammographie, est un marqueur de diagnostic des cancers du sein (Boyd et al., 2007).

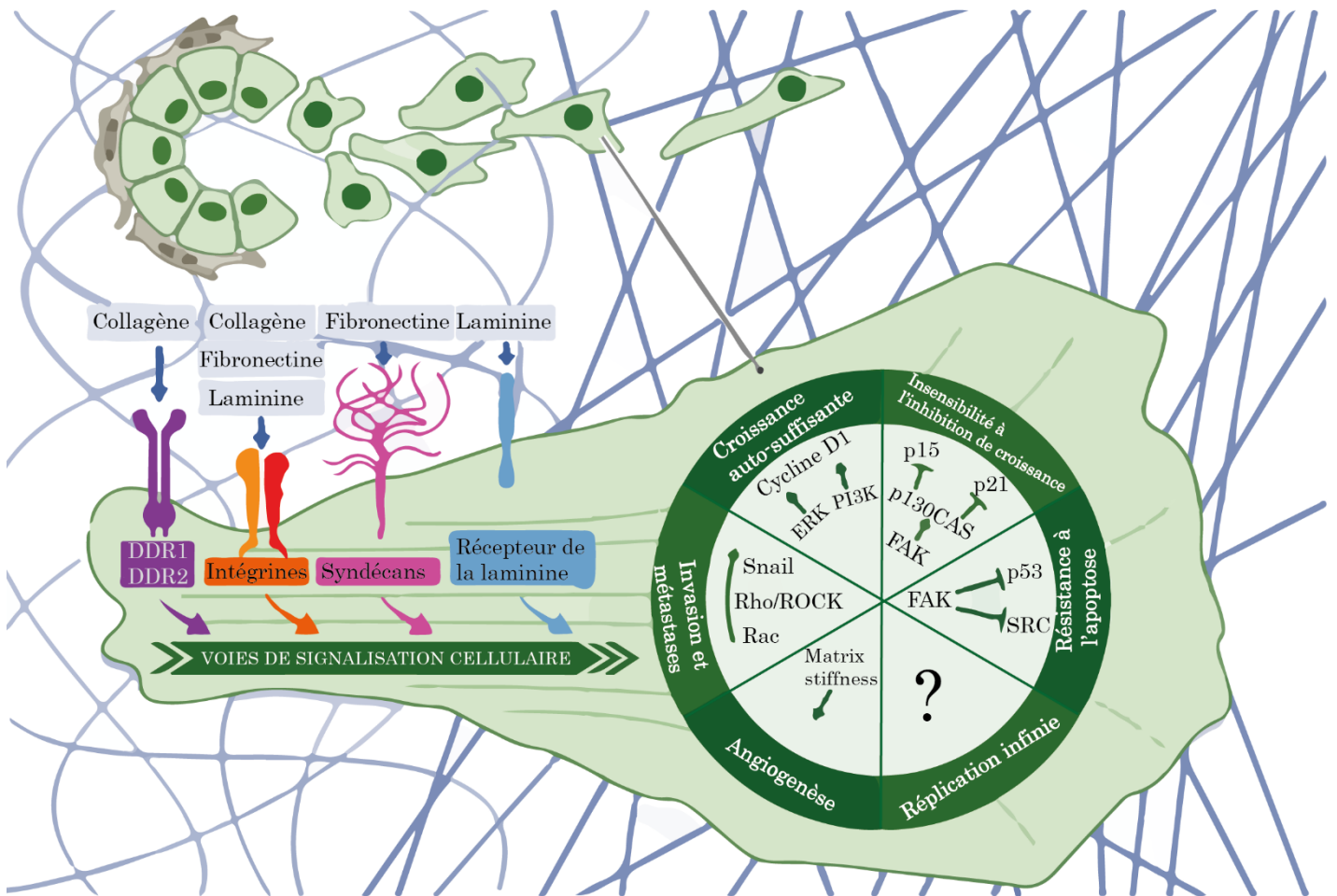


Figure 9 : Le rôle de la MEC dans les propriétés tumorales

Adapté de (Pickup et al., 2014)

i. Prolifération

L'adhésion à la MEC permet notamment l'activation de Ras par des facteurs de croissance qui va promouvoir la transition G1/S du cycle cellulaire grâce à ERK (Schwartz and Assoian, 2001). La phosphorylation de FAK (focal adhesion kinase), dépendante de l'adhésion, va également stimuler Ras ainsi que la voie PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase). Chacune de ces deux voies de signalisation vont conduire à l'activation ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) et favoriser l'entrée dans le cycle (Pylayeva et al., 2009).

ii. Angiogenèse

L'angiogenèse est stimulée par des facteurs de croissance comme le VEGF ou le FGF et implique la prolifération et la migration des cellules endothéliales. La MEC qui entoure la tumeur constitue un réservoir pour les facteurs pro et anti-angiogéniques, fournit un chemin de migration pour les cellules endothéliales et favorise la croissance et la survie des cellules endothéliales (Akiyama et al., 1989; Bonanno et al., 2000).

iii. Immunosuppression

La surveillance immunitaire est un processus clé dans la prévention de la formation des tumeurs. La MEC peut autant supporter que compromettre la réponse immunitaire adaptative par les lymphocytes T. L'activité pro-immunogène de la MEC est due aux chemins fournis par la matrice pour la migration des lymphocytes T, les aidant à envahir les tissus en réponse aux fragments de matrice chimio-attractants libérés par le clivage des MMP (Houghton et al., 2006; Wells et al., 2015). La MEC peut également inhiber la prolifération ou l'activation des lymphocytes T via la liaison du collagène I sur les récepteurs LAIR (Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor) (Meyaard, 2008).

Les tumeurs sont caractérisées par leur inflammation. Dans la majorité des cas, des tissus avec une inflammation chronique sont fibrotiques et présentent une augmentation du dépôt de collagène et de fibronectine (Izbicki et al., 2002; Stramer et al., 2007). Une MEC fibrotique influence le recrutement des cellules du système immunitaire inné en favorisant l'inflammation tumorale. Par exemple, la présence de laminine se liant à l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ favorise le recrutement des neutrophiles dans les tissus (Dangerfield et al., 2002). La protéine SPARC inhibe significativement l'infiltration des macrophages (Sorokin, 2010). De plus, une MEC riche en collagène favorise la prolifération et l'activation des macrophages ainsi que leur polarisation en macrophage M2 (Wesley et al., 1998) tandis qu'une MEC riche en fibronectine favorise le phénotype M1 et l'effet anti-tumorigénique des macrophages (Perri et al., 1982).

La MEC forme un maillage dense autour de la tumeur et peut devenir une barrière empêchant les lymphocytes T de l'atteindre (Jiang et al., 2017; Pickup et al., 2014). Une étude récente de l'équipe du Dr Donnadiou a montré que les lymphocytes T réussissent à mieux infiltrer la tumeur lorsque la MEC est rendue plus souple par un inhibiteur des LOX, le BAPN (Nicolas-Boluda et al., 2021).

iv. Invasion et formation de métastase

La formation de protrusion riche en actine, appelées invadosomes, nécessite l'adhésion des intégrines et des récepteurs au collagène DDR à la MEC et la formation de complexe d'adhésion. Ces derniers favorisent l'invasion cellulaire grâce aux MMP qui s'y trouvent (Di Martino et al., 2016). La MEC améliore la formation d'invadosomes et augmente l'invasion tumorale en favorisant l'assemblage des adhésions focales (Parekh et al., 2011). Les MMP entraînent l'EMT des cellules tumorales (Menon and Beningo, 2011) et les aident à dégrader la matrice entourant la tumeur pour s'en échapper et se rendre dans la circulation sanguine ou lymphatique pour disséminer et coloniser un nouvel organe (Celia-Terrassa et al., 2012).

La MEC est modifiée au cours du vieillissement. Une étude du Dr Weeraratna a montré que la diminution de la protéine HAPLN1 (Hyaluronan And Proteoglycan Link Protein 1) dans la MEC produite par des fibroblastes âgées comparée à celle produite par des fibroblastes jeunes est associée à une augmentation de l'alignement des fibres de la MEC et une augmentation des propriétés métastatiques des cellules de mélanome (Kaur et al., 2019). Ces résultats suggèrent que la modification de la MEC au cours du vieillissement est un paramètre important à prendre en compte dans le développement du mélanome

II. Conclusion

Le microenvironnement tumoral représente la moitié de la masse tumorale dans la tumeur primaire ou les métastases. Chacune des cellules non-tumorales qui composent le microenvironnement participent aux différentes étapes de la progression tumorale de la prolifération à la formation de métastases. Les cellules tumorales sont capables de modifier autant les composants cellulaires que les composants non cellulaires de leur microenvironnement, pour se créer une niche favorable à leur progression et leur survie en présence des traitements. Les CAF produisent diverses protéines matricielles qui vont interagir entre elles et s'assembler en un réseau dynamique et plastique. Une augmentation du dépôt et de l'assemblage du collagène et des autres protéines de la MEC entraîne une rigidification des tissus tumoraux. Le *prochain chapitre* va aborder un aspect important de la MEC qui est la rigidité matricielle. Pour répondre aux signaux mécaniques apportés par la MEC la cellule va activer différentes voies de signalisation qui seront également détaillées dans le *chapitre suivant*.

Chapitre 2 :

La mécanotransduction

I. Définition et rôles physiologiques

L'idée que des forces puissent réguler le remodelage et le développement des tissus a été évoquée au XIX^{ème} siècle par le chirurgien et anatomiste Julius Wolff (Eyckmans et al., 2011). Les contraintes mécaniques sont maintenant considérées comme des régulateurs importants des processus physiologiques, au cours du développement embryonnaire, de la régénération des tissus et dans des situations pathologiques, tels que les cancers. Elles régissent différentes fonctions de l'organisme, de la sensation du son dans les cellules de l'oreille interne à la détection du flux sanguin par les cellules endothéliales.

Les cellules et les tissus perçoivent ces contraintes mécaniques et les convertissent en signaux biochimiques par un processus appelé mécanotransduction et génèrent en retour des forces sur leur substrat. La mécanotransduction a d'abord été étudiée dans les cellules sensorielles. Les cellules ciliées de l'oreille interne sentent les forces mécaniques, comme l'onde sonore, la gravité et la pression, et les transduisent en activant des voies de signalisation pour générer l'audition. Ces cellules possèdent des structures particulières appelées stéréocils attachés à leurs extrémités par des filaments extracellulaires. Quand les stéréocils sont déformés par des forces mécaniques, les filaments extracellulaires s'étirent et déforment les canaux ioniques présents sur le stéréocil, causant un influx d'ions pour initier l'activation des voies de signalisation (Vollrath et al., 2007). Les autres cellules sensorielles de la proprioception ou du toucher ont des mécanismes de mécanotransduction similaires (Eberl et al., 2000).

La mécanotransduction joue également un rôle important dans la morphologie et la physiologie d'un grand nombre de tissus. Au sein de l'organisme, le module de Young (coefficient d'élasticité et indicateur de la rigidité) est différent selon le tissu (figure 10). En conséquence, les cellules vont répondre différemment à une variation de rigidité de l'environnement selon leur tissu d'origine.

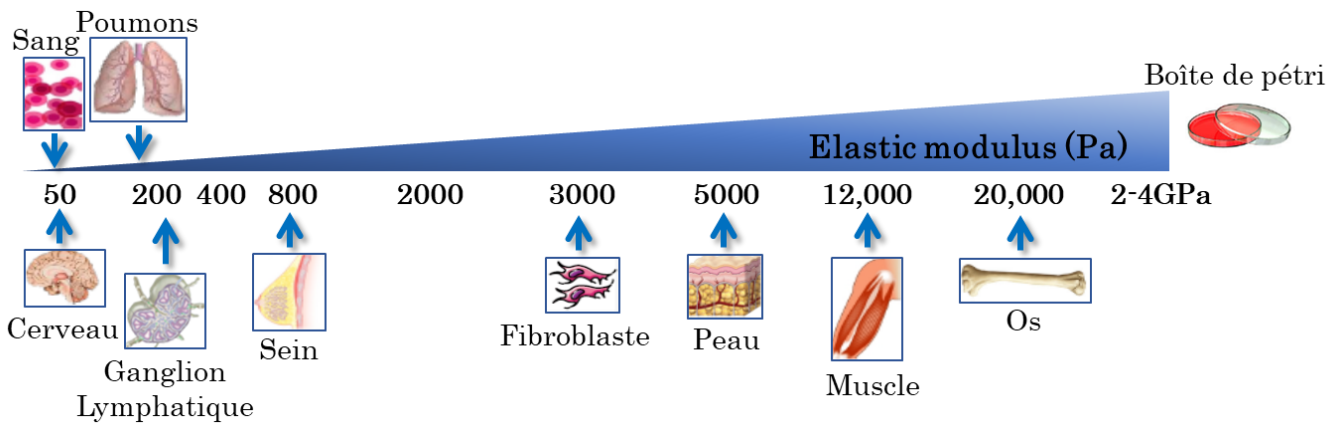


Figure 10 : Echelle de rigidité des tissus du corps comparé à celle d'une boîte de pétri

D'après (Butcher et al., 2009)

Le cœur et le système vasculaire sont affectés par les forces de pression et de cisaillement dues au flux sanguin (Garcia-Cardena et al., 2001; Gimbrone et al., 2000). Les poumons sont soumis à la distension et la contraction due à la respiration causant un stress mécanique (Wirtz and Dobbs, 2000). Les os sont soumis à la gravité et aux forces compressives (Burger and Klein-Nulend, 1999).

Au niveau cellulaire, les forces mécaniques régulent le comportement de la majorité des cellules, si ce n'est pas toutes. Les signaux mécaniques modulent différentes fonctions cellulaires comme la croissance, la différenciation, la migration, l'expression des gènes, la synthèse protéique et l'apoptose.

De plus, la rigidité du substrat joue un rôle important dans le développement et la différenciation cellulaire. En effet, des cellules souches mésenchymateuses naïves peuvent se différencier différemment selon la rigidité de la matrice. Ainsi, un support souple conduit les cellules à se différencier en cellules neuronales car la rigidité ressemble à celle du cerveau, tandis qu'un support dont la rigidité se rapproche de celle du tissu musculaire entraîne la différenciation en myocytes. Enfin, une matrice très rigide, dont la rigidité s'apparente à celle de l'os, mène à la formation d'ostéoblastes (Engler et al., 2006 ; Saha et al., 2008 ; Sun et al., 2018).

II. Les différents types de forces

Les signaux mécaniques se présentent sous différentes formes : la rigidité matricielle, les forces hémodynamiques, l'étirement cellulaire, la tension intracellulaire ou la compression intercellulaire. Du point de vue de la physique, on parle de force de compression, tension et de cisaillement (figure 11).

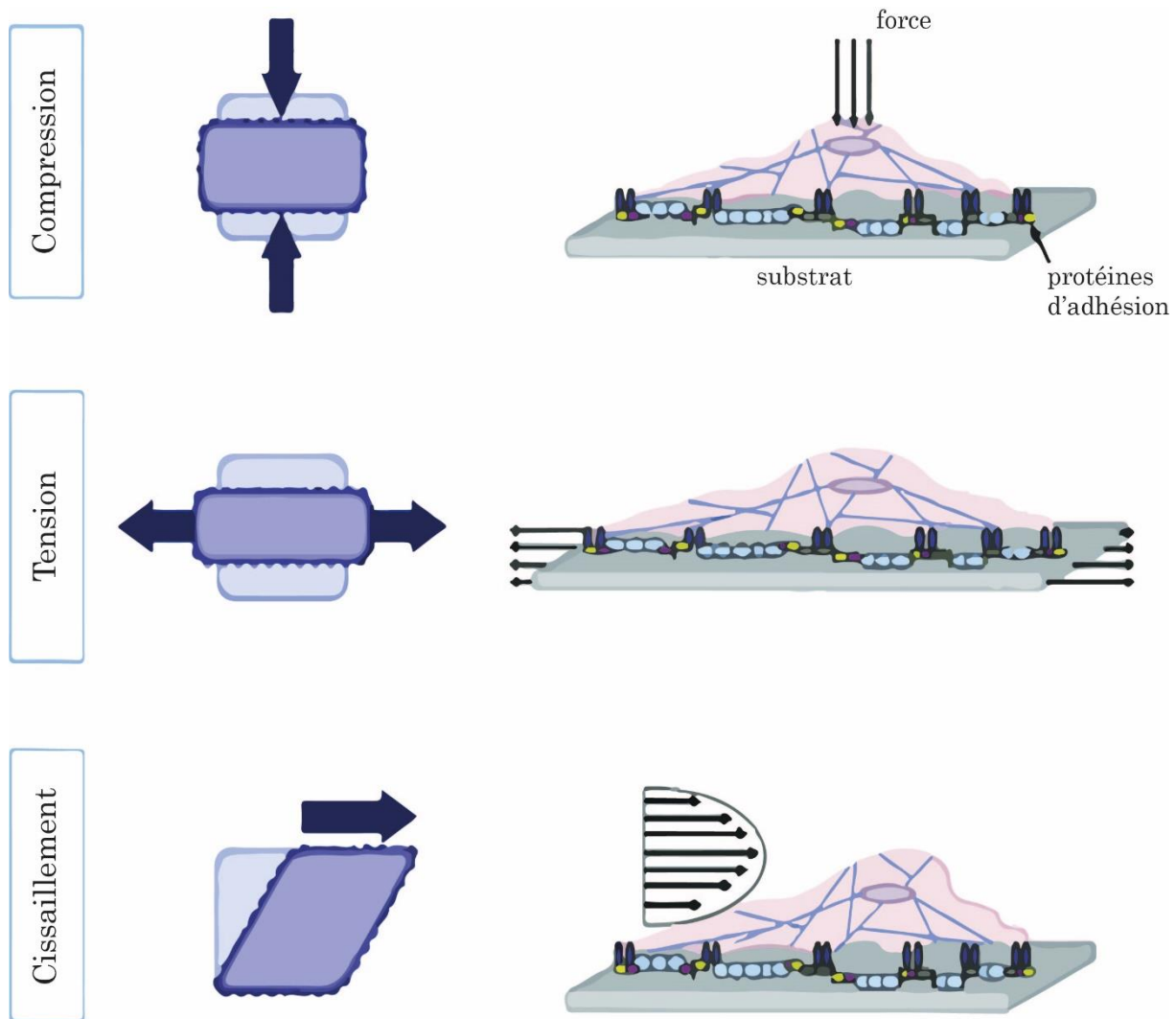


Figure 11 : Les différents types de forces mécaniques qui s'appliquent sur les cellules

(Wang et al., 2019)

A. Forces hémodynamiques

La monocouche de cellules épithéliales tapissant la surface interne des vaisseaux est sujette à un flux laminaire provoqué par le flux sanguin. Les cellules endothéliales soumises à ce flux réarrangent leur cytosquelette, s'allongent et s'alignent dans la direction du flux. La valeur de la contrainte de cisaillement à laquelle la couche de la surface interne des vaisseaux est soumise est comprise entre 1 et 1,5 Pa. Cette valeur est régulée par des mécanismes propres aux cellules sanguines. En cas de modification des forces hémodynamiques, les vaisseaux s'ajustent en modifiant la structure de leur paroi pour uniformiser la contrainte de cisaillement imposée à cette monocouche (Lehoux and Tedgui, 2004).

B. Forces de contact cellule-cellule

Les cellules ne sont pas seules dans un organisme, elles sont fermement connectées les unes aux autres par des jonctions intercellulaires. Les jonctions adhérentes, un exemple de ces jonctions intercellulaires, lient le cytosquelette de cellules adjacentes via le regroupement des cadhérines. La présence d'une voie intercellulaire de transmission des forces a de nombreuses implications. Une activité contractile des cellules d'un feuillet multicellulaire peut mener à la prolifération du feuillet (Nelson et al., 2005). La transmission des forces au travers des jonctions adhérentes peut donc jouer un rôle important durant le développement embryonnaire (Martin et al., 2010).

C. Forces appliquées par le support

Le support des cellules au sein d'un tissu est la MEC. Les propriétés mécaniques de la MEC dépendent de sa composition et de son organisation. La protéine la plus abondante de la MEC est le collagène (cf. *Chapitre 1*) qui se présente majoritairement sous forme fibrillaire pour donner sa force élastique à la peau (Yang et al., 2015). La proportion et le contenu de la MEC produite et remodelée par les MMP et les LOX permettent de maintenir l'homéostasie de la peau et de s'adapter en cas de blessure (Eckes et al., 2010; Humphrey et al., 2014). La peau blessée et cicatrisante est plus rigide que la peau non blessée à cause du phénomène de fibrose qui se met en place (Clark et al., 1996).

La fibrose est caractérisée par un dépôt anormal de MEC par les fibroblastes en dehors de la cicatrisation. La rigidité matricielle est drastiquement augmentée lors de la fibrose. Par exemple, des études ont montré que dans le foie ou les poumons, la rigidité peut passer de 0,5-1kPa en conditions physiologiques à 25-100kPa en conditions fibrotiques (Georges et al., 2007). Cette fibrose est à l'origine de pathologies dans différents organes comme le poumon, le foie ou le rein (Rosenbloom et al., 2017) et également de cancers (Li et al., 2014; Wang et al., 2013).

En conditions physiologiques, les cellules, principalement des fibroblastes, doivent entretenir activement les propriétés mécaniques de la MEC pour maintenir les fonctions normales des tissus (Humphrey et al., 2014). Les cellules contrôlent les propriétés mécaniques de la MEC par les processus de dégradation, synthèse et organisation de ses composants. En retour, les signaux mécaniques de la MEC vont déclencher des voies de signalisations affectant l'expression des gènes et des processus cellulaires comme la motilité ou la morphologie cellulaire. Les cellules vont répondre aux signaux mécaniques reçus en appliquant des forces sur le substrat, que l'on appelle forces de traction et qui servent notamment à la motilité cellulaire.

III. Méthodes de mesure des forces

Il est possible de mesurer les forces de traction des cellules en utilisant des gels déformables contenant des billes servant de marqueurs à la déformation, c'est ce qu'on appelle la microscopie à force de traction (TFM, traction force microscopy) (Wang and Lin, 2007). Les forces intercellulaires au sein d'une monocouche peuvent être également mesurées par la TFM. La mesure des forces dans les tissus peut se faire par l'intégration de gouttelettes d'huile de rigidité définie à l'intérieur des tissus pour mesurer les pressions locales dues à la déformation (Ladoux and Mege, 2017). La mesure du module élastique d'une cellule, d'une MEC ou d'un tissu peut être réalisée par microscopie à force atomique (AFM, atomic force microscopy) ou la nano-indentation. Ces techniques consistent en l'application d'une pointe (« cantiliver ») sur la cellule ou le tissu et la mesure de la déflexion de cette pointe. La valeur obtenue correspond au module élastique de la cellule ou du tissu dont l'unité est le Pascal (Pa) (Thomas et al., 2013). Des approches par aspiration avec micropipettes existent également pour mesurer les tensions locales (Lam et al., 2012).

IV. Modèles d'étude de la mécanotransduction

L'étude de la mécanotransduction commence à devenir de plus en plus importante au vu de son implication dans différentes pathologies dont les cancers. Des modèles permettant d'étudier la mécanotransduction, plus particulièrement l'influence des forces provenant du substrat ont été développés (Leight et al., 2017).

A. Hydrogels de protéines matricielles

Les modèles les plus couramment utilisés sont des hydrogels de protéines matricielles retrouvées dans les conditions physio-pathologiques comme le collagène de type I, la fibrine, les laminines (avec le Matrigel®). Ces hydrogels ont été utilisés en premier pour l'étude du cancer du sein (Lee et al., 1984 ; Weaver et al., 2002). Ils possèdent des caractéristiques proches du microenvironnement natif des cellules. On y retrouve des similitudes dans les sites d'adhésion à la matrice, l'architecture fibrillaire, la possibilité pour les cellules de remodeler ce gel en utilisant les MMP. La rigidité de ces hydrogels peut être modifiée de différentes manières incluant la variation de concentration en protéine matricielle ou l'augmentation de l'assemblage fibrillaire par des méthodes enzymatiques (glycation), chimiques (glutaraldéhyde) ou physiques (UV). Ces méthodes permettent d'augmenter de 2 à 4 fois la rigidité des hydrogels (Hapach et al., 2015).

B. Matrices dérivées de cellules

Les matrices dérivées de cellules (Cell-derived matrix, CDM) sont des matrices produites *in vitro* par des cellules. Les cellules sont ensuite enlevées pour ne garder que la matrice produite comme substrat de culture (Beacham et al., 2007). Selon le type de fibroblaste utilisé pour produire ces matrices, des différences ont été observées dans le type de protéines sécrétées, l'organisation des fibres et leur impact sur les fonctions cellulaires (Berestjuk et al., 2019; Castello-Cros et al., 2009)(*Annexe II*). Les avantages des CDM sont similaires à ceux des hydrogels de collagènes concernant l'architecture fibrillaire et la possibilité de remodelage matriciel pour les cellules ensemencées dessus mais ces CDM ne permettent pas d'y insérer les cellules en 3D et il y est plus difficile de contrôler la rigidité.

D'une façon générale, les matrices dites natives comme les hydrogels de collagène ou les CDM sont des matériaux plutôt souples avec une faible gamme de rigidité (de 0,1 à 10kPa) et ne peuvent donc pas reproduire complètement les propriétés mécaniques observées dans les tissus cancéreux *in vivo* (de 1 à 100kPa) (Gribova et al., 2011). De plus, il est difficile, à partir de ces matrices, d'isoler des propriétés spécifiques de la MEC étant donné que l'augmentation de la rigidité change également d'autres variables comme la densité de ligands ou la taille des pores entre les fibres.

C. Hydrogels synthétiques

Pour éviter ces biais, des alternatives synthétiques ont été développées pour étudier le rôle des propriétés mécaniques de la MEC dans différentes fonctions cellulaires physiologiques ou pathologiques. Les premières études du rôle de la rigidité matricielle dans les fonctions cellulaires ont été permises grâce au travail pionnier de Pelham & Wang qui ont développé un système de culture basé sur des hydrogels de polyacrylamide (Pelham and Wang, 1997). Dans ce système, des protéines de la MEC comme le collagène ou la fibronectine sont conjuguées à un hydrogel dont la rigidité est contrôlée par la réticulation du polyacrylamide sans changer la densité du ligand. Cependant, comme l'acrylamide n'est pas un monomère compatible avec la survie des cellules, ces dernières ne peuvent pas être intégrées dans ce gel. Le système est donc limité aux substrats en 2D.

Des systèmes synthétiques biocompatibles adaptés à la 3D ont donc été mis au point. Ils incluent les hydrogels d'alginate, les gels de peptides auto-assemblables ou des polymères totalement synthétiques comme le polyester ou le PEG. L'alginate est un polysaccharide dérivé d'une algue brune qui forme des hydrogels réticulés biocompatibles (Roscoe and Owsianka, 1982). Les gels de peptides s'auto-assemblent lorsqu'ils sont exposés à des solutions salines physiologiques et permettent d'étudier l'influence du microenvironnement sur le phénotype cellulaire (Miroshnikova et al., 2011). Les gels de polyesters sont utilisés comme systèmes de culture en 3D dans différents cancers (Fischbach et al., 2007). Enfin, les gels de PEG, un polymère hydrophile, ont été utilisés pour analyser le rôle de la rigidité matricielle dans différents cancers et pour pouvoir contrôler la rigidité et la dégradation matricielle dans l'espace et le temps (Culver et al., 2012; Tokuda et al., 2014).

Même si les matériaux synthétiques permettent un contrôle précis des propriétés mécaniques de la MEC, ils leur manquent les aspects importants d'une matrice native comme l'architecture fibrillaire ou la composition matricielle. Pour surmonter ces limitations, il est possible de produire des matrices synthétiques reproduisant la structure fibrillaire 3D qui conservent les avantages des polymères synthétiques en fournissant également un réseau fibrillaire plus natif (Nelson et al., 2014). De plus, des hydrogels semi-synthétiques de gélatine et hyaluronane peuvent être injectés en sous-cutané dans les souris, pour suivre la croissance cellulaire en fonction de la rigidité dans un contexte se rapprochant de la physio-pathologie (Meng et al., 2018; Panciera et al., 2020).

V. Les principaux acteurs de la mécanotransduction

Les cellules détectent les forces biomécaniques exercées par la MEC ou les forces de tensions provenant des cellules voisines par des récepteurs et des canaux ioniques exprimés à leur surface. Ces récepteurs signalent via différentes protéines ou seconds messagers pour transmettre les forces reçues aux protéines constituant le cytosquelette. Le cytosquelette est en interaction directe avec le noyau et va ainsi lui propager les signaux mécaniques reçus pour moduler la transcription des gènes et agir sur les différentes fonctions cellulaires (figure 12) (Wang et al., 2009).

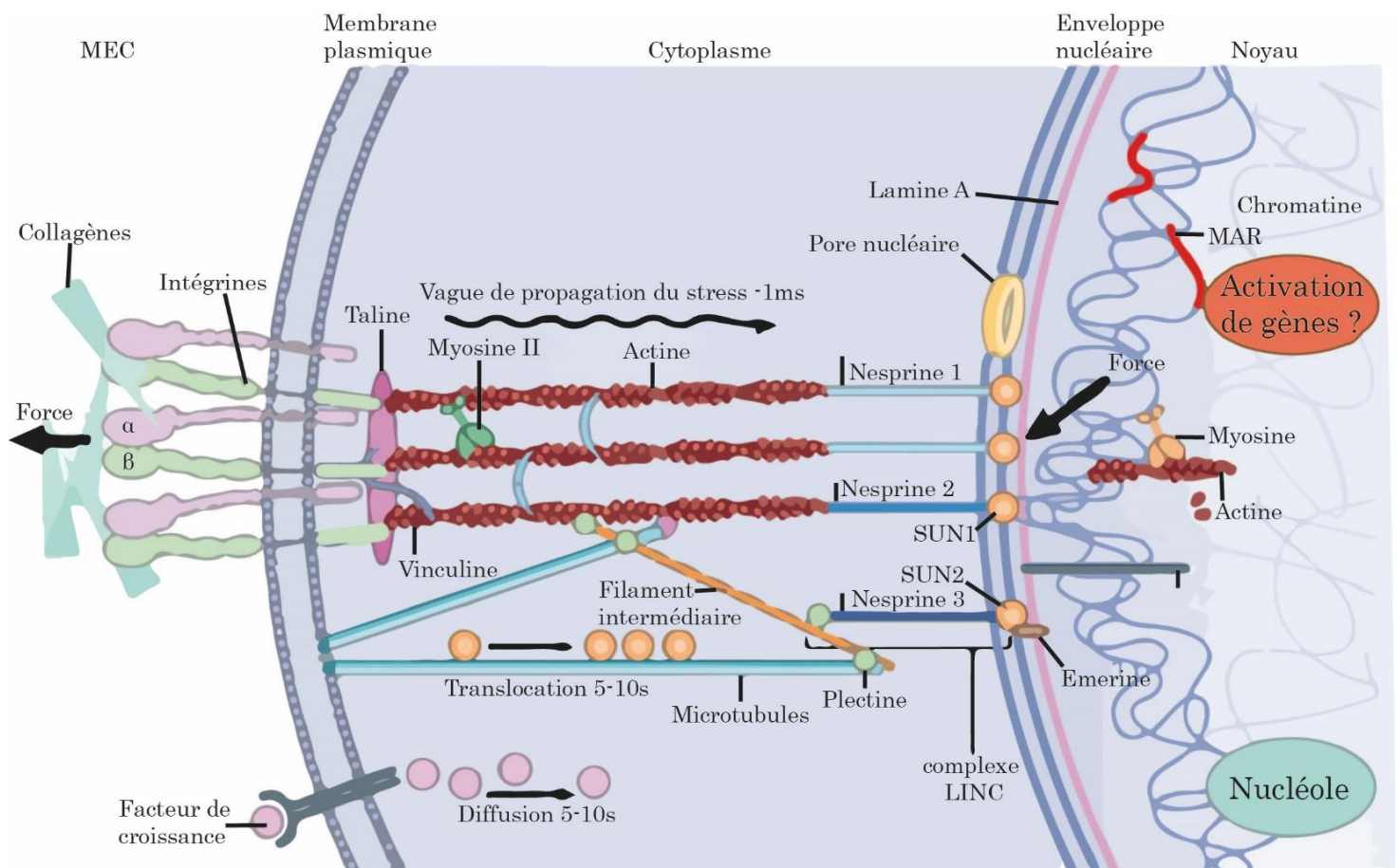


Figure 12 : La mécanotransduction : de la MEC au noyau

(Wang et al., 2009)

A. Les récepteurs extracellulaires impliquées dans la perception des signaux mécaniques

Les cellules établissent des contacts directs avec la MEC grâce aux récepteurs d'adhésion tels que les intégrines, les récepteurs à domaine discoïdine (DDR) ou les syndécans. Les cellules peuvent également sentir les déformations transmises par d'autres cellules via les cadhérines. Les signaux mécaniques peuvent également être perçus lors d'une déformation de la membrane plasmique qui entraîne l'ouverture de canaux ioniques membranaires.

a) Les intégrines

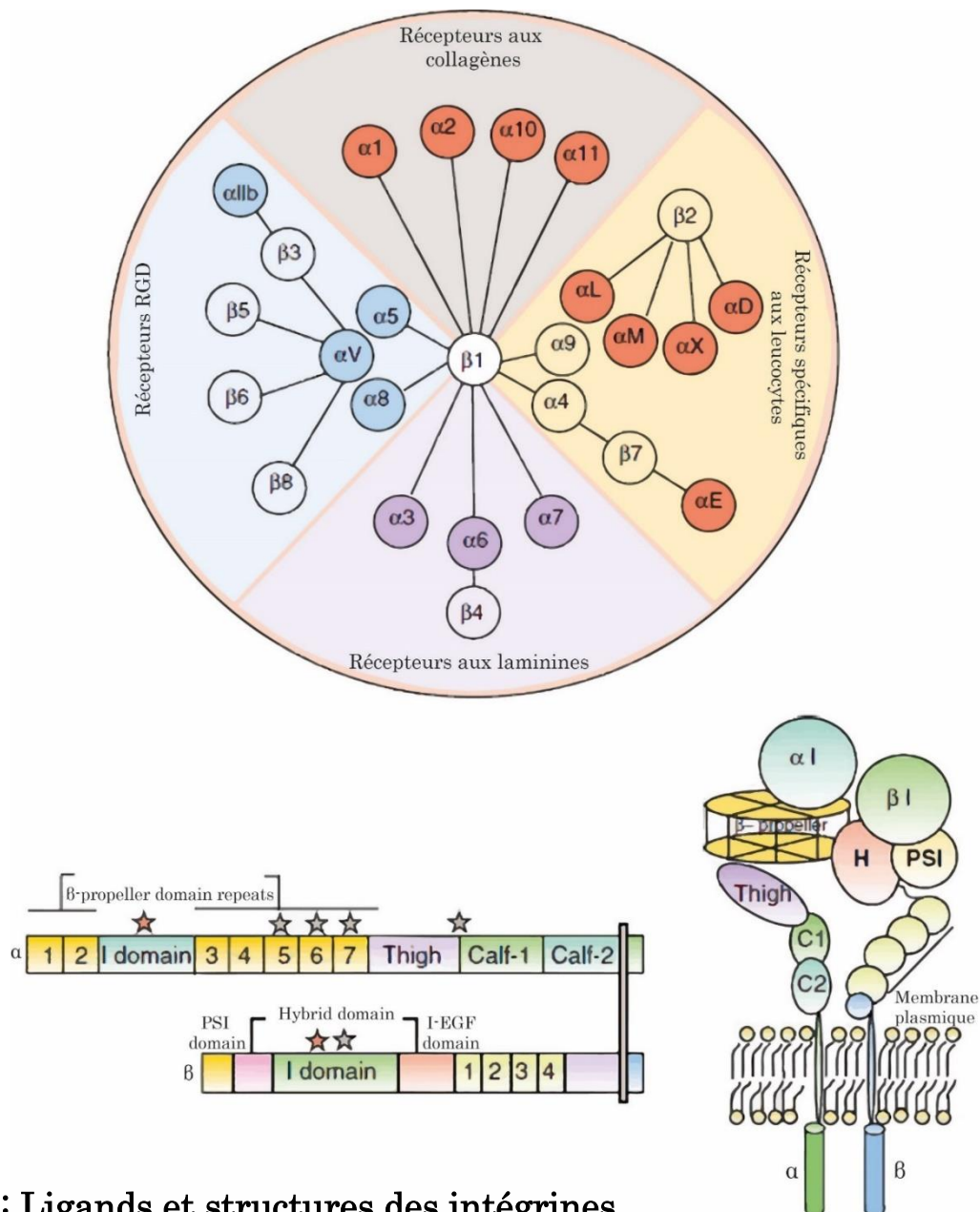


Figure 13 : Ligands et structures des intégrines

(Barczyk et al., 2010)

1. Rôle physiologique

Les intégrines sont des protéines hétérodimériques composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β liées de façon non covalente. Différentes combinaisons de 18α et 8β peuvent donner 24 hétérodimères d'intégrines. Une intégrine est structurée avec une tête et 2 queues (figure 13) (Campbell and Humphries, 2011). La tête est la partie extracellulaire se liant à la MEC tandis que les domaines intracellulaires sont des ancrages pour les protéines du cytosquelette (Wegener et al., 2007). La composition en sous-unité α ou β des intégrines dicte leur affinité pour les différents composants de la MEC. Les intégrines composées de la sous-unité $\beta 1$ sont les plus abondantes. Avec les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ et $\alpha 11$, elles se lient aux collagènes tandis que lorsqu'elles sont constituées des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 6$ et $\alpha 7$, elles ont une affinité pour les laminines. Les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 8\beta 1$, ainsi que d'autres intégrines composées de la sous-unité αV , sont capables de reconnaître le motif RGD présent notamment dans la fibronectine ou la fibrilline. Les intégrines peuvent également se lier à d'autres récepteurs de surface comme les ICAM, VCAM, PECAM ou la E-Cadhérine (Humphries et al., 2006)(figure 13).

Quand les intégrines se lient à leur ligand extracellulaire, leur domaine cytoplasmique recrute des protéines d'échafaudage, des enzymes et accumule d'autres intégrines et récepteurs à la surface pour former les adhésions focales, on parle de « clustering » des intégrines (figure 14) (Winograd-Katz et al., 2014). Parmi les nombreuses protéines qui constituent les adhésions focales, les plus connues et les plus décrites sont notamment la taline, la vinculine, la paxilline et la kinase FAK (focal adhesion kinase) (figure 14). La majorité des intégrines sont liées à l'actine mais l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est reliée aux filaments intermédiaires. Les adhésions focales modifient l'espace extracellulaire en transmettant les forces provenant du cytosquelette (voie « inside-out ») et traduisent les signaux mécaniques extérieurs en voies de signalisation intracellulaires qui conduisent à la transcription de gènes (voie « outside-in ») (Moser et al., 2009). Les intégrines transmettent les signaux de l'environnement extracellulaire proche que les cellules vont traduire en processus cellulaires comme la prolifération, l'apoptose ou le remodelage de la MEC pour faciliter la dissémination métastatique (Desgrosellier and Cheresch, 2010). Les adhésions focales sont des complexes protéiques très dynamiques, qui s'assemblent et se désassemblent continuellement. Elles sont d'abord des structures avec une courte durée de vie, puis elles se développent en adhésions focales plus matures, grâce à l'activation des GTPases et au « clustering » des intégrines (figures 14 et 15).

Les intégrines activent des voies de signalisation intracellulaires via leurs principales kinases effectrices telles que FAK, YES, FYN ou ILK (integrin-linked kinase) (figure 14). L'activation de FAK entraîne sa dimérisation et son autophosphorylation. Cette phosphorylation libère un site de liaison de forte affinité pour les kinases de la famille SRC, augmentant son activité enzymatique et stimulant le recrutement de différentes protéines effectrices.

2. Rôle dans les cancers

FAK et les intégrines sont surexprimées et activées dans de nombreux cancers, et participent à des étapes clés de la progression tumorale ainsi qu'à la résistance thérapeutique (Barczyk et al., 2010 ; Sulzmaier et al., 2014). Selon ses effecteurs, FAK contrôle la croissance, la migration, la survie, la différenciation ou encore l'organisation du cytosquelette des cellules (Sulzmaier et al., 2014) (figure 15). L'équipe du Dr Valérie Weaver a été une des premières à démontrer le rôle clé de cette voie de signalisation dans la mécanotransduction, en démontrant que l'assemblage des intégrines, la formation de complexes d'adhésion focale et le remodelage du cytosquelette d'actine sont influencés par la rigidification de la MEC (Paszek et al., 2005; Yeung et al., 2005). L'assemblage des intégrines permet aussi le recrutement et l'activation de récepteurs tyrosine kinase, effecteurs notamment de voies de survie et de prolifération (Levental et al., 2009). L'activation de FAK induite par la rigidification de la MEC favorise la transformation maligne et la formation de métastases mammaires, en stimulant la voie de signalisation intégrine β -caténine (Mouw et al., 2014b). De plus, les thérapies ciblées induisent une activation de la voie β 1/FAK/SRC dans les cellules de mélanome qui provoque une résistance thérapeutique par la réactivation de ERK (Hirata et al., 2015).

En réponse à un stress oxydatif, FAK peut se retrouver dans le noyau où il se lie à P53 et MDM2, en jouant un rôle de protéine d'échafaudage, indépendamment de son activité kinase (Lim et al., 2008). Cela va entraîner une augmentation de la poly-ubiquitination de P53 et ainsi sa dégradation et donc l'expression des protéines d'arrêt du cycle cellulaire comme P21 (Zhao et al., 2010b).

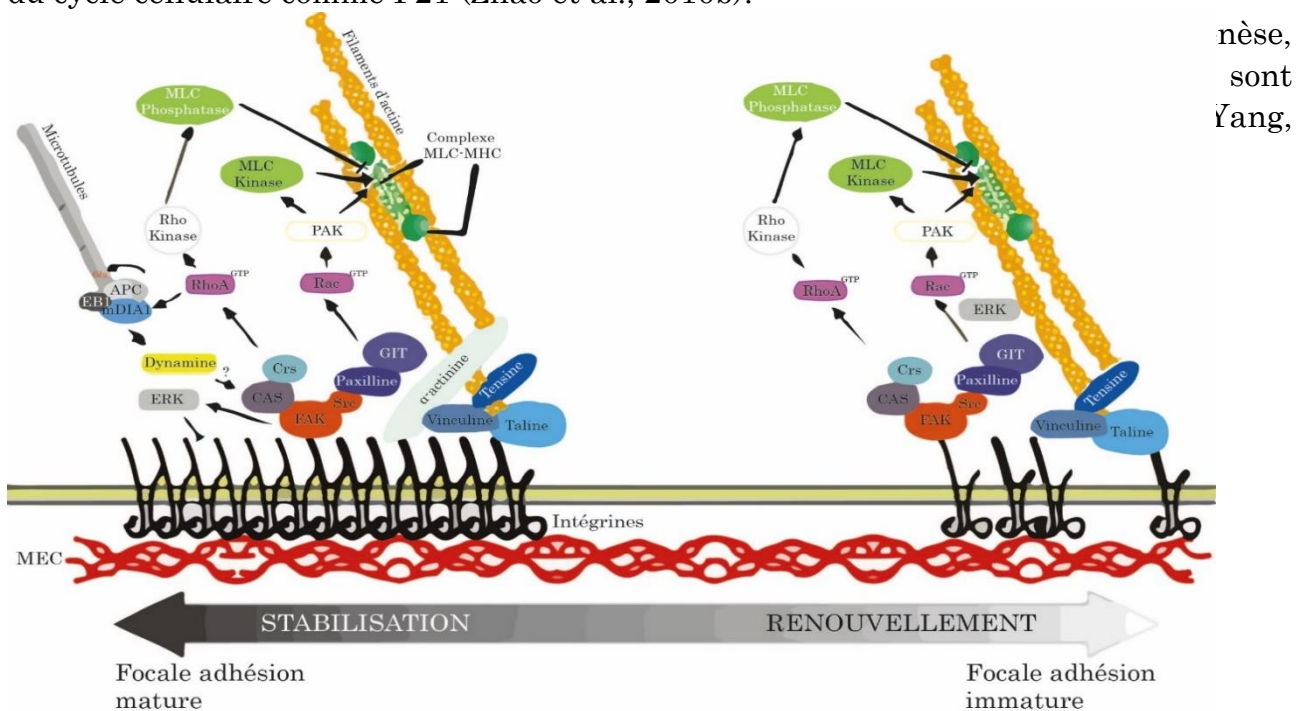


Figure 14 : Structure et maturation d'une adhésion focale

(Vicente-Manzanares et al., 2005)

nèse,
sont
Yang,

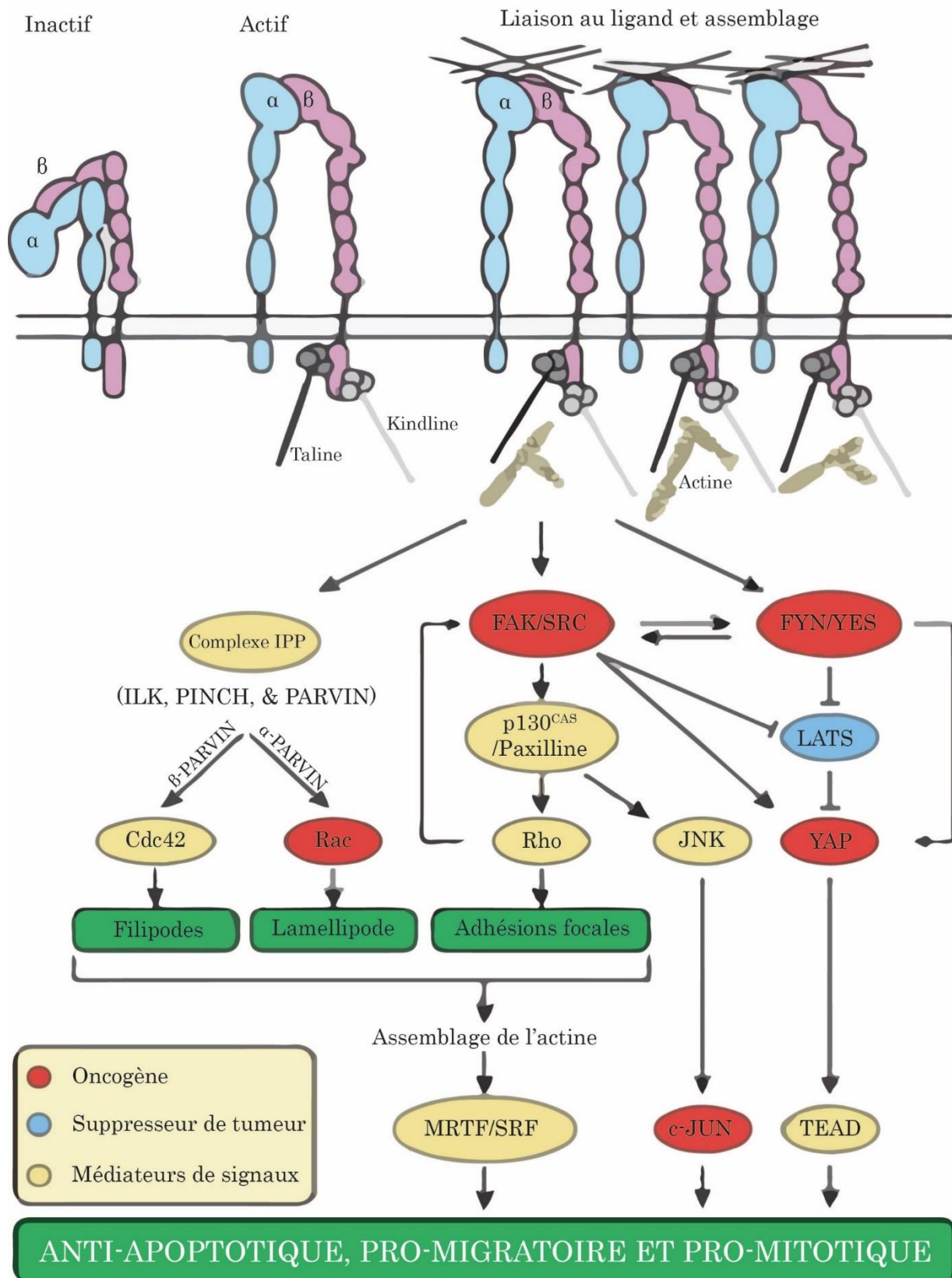


Figure 15 : Voies de signalisation des intégrines

Rap1-GTP induit l'activation de la taline, via les protéines MRL, et va se lier au domaine cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines. La taline et la kindline peuvent se connecter à l'actine, promouvoir le clustering des intégrines et initier les voies de signalisation intracellulaires. La réorganisation du cytosquelette ainsi induite va entraîner l'activation de MRTF/SRF, de c-Jun ou de YAP.

(Cooper and Giancotti, 2019)

b) Les récepteurs à domaine discoïdine

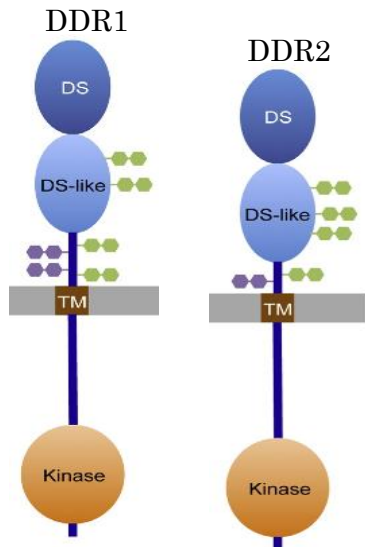


Figure 16 : Structure des DDR

(Leitinger, 2014)

1. Rôle physiologique

Les récepteurs à domaine discoïdine (Discoidin domain receptor, DDR) sont des récepteurs tyrosine kinase qui fonctionnent comme récepteurs au collagène (Fu et al., 2013; Leitinger, 2014). Cette sous-famille de RTK est constituée de 2 membres : DDR1 et DDR2. L'épissage alternatif de l'ARNm de DDR1 mène à la formation de 5 isoformes : DDR1a, DDR1b, DDR1c, DDR1d et DDR1e. Les trois premiers isoformes (DDR1a, DDR1b et DDR1c) possèdent une activité kinase tandis que le DDR1d et DDR1e n'en possèdent pas.

Les DDR sont les seuls RTK qui interagissent avec des composants structuraux de la MEC et sont donc à l'interface entre les RTK et les récepteurs matriciels. Les DDR sont caractérisés par la présence d'un domaine discoïdine dans leur région extracellulaire lié à un domaine de structure similaire : le domaine discoïdine-like (Carafoli et al., 2012) (figure 16). Le domaine discoïdine est homologue à la protéine discoïdine-I découvert initialement chez *Dictyostelium discoideum* (Amibe) et fonctionne comme un site de liaison à la lectine.

Les deux DDR sont exprimés dans différents tissus, au cours du développement et dans l'organisme adulte (Leitinger, 2014). DDR1 est principalement trouvé dans les cellules épithéliales alors que DDR2 est majoritairement exprimé dans les tissus conjonctifs d'origine mésodermique (Alves et al., 1995; Vogel et al., 2001). Les DDR sont également exprimés dans les cellules immunitaires (Lee et al., 2007; Matsuyama et al., 2003).

Les deux DDR sont importants pour le développement embryonnaire. Des souris KO pour DDR1 sont caractérisées par une petite stature. Les femelles présentent de nombreux défauts de fertilité ou un défaut des glandes mammaires les empêchant d'allaiter (Vogel et al., 2001). La perte de DDR1 dans la souris provoque également un défaut au niveau des reins et de l'oreille interne (Gross et al., 2004; Meyer zum Gottesberge et al., 2008).

Le KO de DDR2, chez la souris, entraîne un nanisme avec une réduction des os longs et du museau à cause d'une réduction de la prolifération des chondrocytes (Labrador et al., 2001). Le rôle de DDR2 dans la croissance osseuse a été confirmée chez l'Homme. En 2009, Bargal *et al.*, ont découvert que des mutations de DDR2 (mutations faux-sens ou mutations du site d'épissage) sont responsables d'une chondrodysplasie, la dysplasie spondylo-méta-épiphysaire avec membres courts (Bargal et al., 2009).

De tous les RTK, les DDR ont un mécanisme d'activation unique qui n'a pas été complètement caractérisé. Les DDR se lient à différents types de collagènes. Les collagènes fibrillaires (de type I, II et III majoritairement) sont des ligands à la fois de DDR1 et DDR2 (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997) tandis que les autres types de collagènes ont des affinités de liaison différentes comme le collagène de type IV qui se lie seulement à DDR1 et le collagène de type X qui se lie au DDR2 (Leitinger and Kwan, 2006; Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997) (table 3). L'activation des DDR par le collagène requiert que ce dernier soit sous sa forme native de triple hélice. La gélatine (collagène dénaturé par la chaleur) n'est donc pas reconnue par les DDR (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997).

Type de collagène	Classe	Récepteur
I	Fibrillaire	DDR1 & DDR2
II	Fibrillaire	DDR1 & DDR2
III	Fibrillaire	DDR1 & DDR2
IV	Membrane basale	DDR1
V	Fibrillaire	DDR1
VI	Filamenteux	DDR1
VIII	Chaine courte	DDR1
X	Chaine courte	DDR2

Table 3 : Les DDR et leurs ligands

(Cooper and Giancotti, 2019)

Les DDR sont sous forme de dimères de façon constitutive (Noordeen et al., 2006). La réponse classique des RTK à la liaison de leur ligand est une autophosphorylation des résidus cytoplasmiques en quelques secondes à quelques minutes et qui ne dure qu'une ou deux heures. Pour les DDR, la phosphorylation est maintenue dans le temps, cela peut notamment aller jusqu'à 18h. (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997).

Les DDR possèdent des partenaires intracellulaires de signalisation incluant les adaptateurs ShcA pour DDR1 et DDR2, Nck2 pour DDR1 (Ikeda et al., 2002; Koo et al., 2006). D'autres molécules sont connues pour interagir avec la forme phosphorylée de DDR1 comme les phosphatases SHP-1 et SHP-2 pour activer la migration cellulaire (Koo et al., 2006; Wang et al., 2006) et certains membres de la famille STAT notamment pour réguler la lactogenèse (Faraci-Orf et al., 2006) (figure 17). Pour DDR2, les effecteurs en aval incluent SHP-2, Nck1, Lyn de la famille des kinases SRC et la phospholipase C-like 2 (Iwai et al., 2013) (figure 17).

Les DDR régulent l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération et la différenciation et le remodelage de la MEC avec les MMP (Olaso et al., 2002; Vogel et al., 2006). Pour cela, ils activent différentes voies de signalisation selon le type cellulaire et le contexte. Dans les cellules de muscle lisse, les cellules épithéliales mammaires ou les mégacaryocytes, DDR1 active ERK1/2 (Abbonante et al., 2013; Hilton et al., 2008; Lu et al., 2011) tandis que dans les cellules mésangiales, ERK1/2 est réprimé par DDR1 (Curat and Vogel, 2002). DDR1 peut aussi activer JNK dans les cellules stromales adipeuses (Ghosh et al., 2013). DDR2 active p38 et JNK mais pas ERK1/2 dans les cellules embryonnaires de rein (Poudel et al., 2013). Dans les ostéoblastes, DDR2 va activer le facteur de transcription Runx2 via la voie MAPK p38 ou ERK1/2 (Lin et al., 2010; Zhang et al., 2011). L'activation de DDR1 est liée à l'activation de la voie PI3K/AKT dans différentes lignées humaines saines ou cancéreuses (Ongusaha et al., 2003; Suh and Han, 2011). En plus de dépendre du type cellulaire et des conditions physiologiques, les DDR peuvent aussi activer différentes voies en fonction de leur ligand. Par exemple, dans les cellules embryonnaires humaines de reins, le collagène de type I active la voie MAPK via DDR1 (Suh and Han, 2011), alors que dans des cellules cancéreuses, c'est le collagène de type IV qui active cette voie de signalisation par DDR1 (Ongusaha et al., 2003).

Bien que l'activation des DDR par le collagène soit indépendante des intégrines (Vogel et al., 2000), Les DDR coopèrent avec les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ et $\alpha 11\beta 1$ avec lesquelles elles partagent leur spécificité de liaison au collagène. Les DDR peuvent affecter directement l'activité des intégrines en modifiant leur expression à la membrane plasmique (Staudinger et al., 2013). Ils participent ensemble à l'activation de voies de signalisation menant à l'adhésion cellulaire. De plus, en interagissant avec les intégrines, les DDR peuvent réguler les capacités contractiles des cellules (Bayer et al., 2019) grâce à leur liaison au niveau intracellulaire avec la myosine II (Coelho et al., 2017).

2. Rôle dans les cancers

Autant DDR1 que DDR2 sont impliqués dans les maladies fibrotiques, notamment, DDR1 dans la fibrose pulmonaire et DDR2 dans la fibrose hépatique. Etant donné que la fibrose est associée à la majorité des cancers solides, il n'est pas surprenant que DDR1 et DDR2 jouent un rôle dans la progression tumorale. A la fois DDR1 et DDR2 sont surexprimés dans un grand nombre de cancers solides ou hématologiques (Valiathan et al., 2012).

L'expression aberrante des DDR est un marqueur de mauvais pronostic pour les patients. De plus, des fonctions altérées de DDR1 et DDR2 contribuent à la tumorigenèse. Plus particulièrement, dans le cas du mélanome, l'augmentation de l'expression de DDR1 est corrélée à la profondeur d'invasion de la tumeur et donc à la faible survie des patients (Reger de Moura et al., 2019). Les DDR peuvent servir à la fois de régulateurs positifs ou négatifs de la prolifération et la survie selon le type cellulaire. Comme précisé dans la partie précédente, les DDR régulent la prolifération en activant la voie des MAPK. Dans les cancers du sein ou du colon, l'activation de DDR1 déclenche des voies de survie en réponse à un stress génotoxique (Ongusaha et al., 2003). Dans le cancer colorectal, les voies de survie activées par DDR1 sont médiées par la voie Notch, dont la forme clivée va se localiser dans le noyau pour réguler l'expression de gènes de survie (Kim et al., 2011).

Les DDR jouent aussi un rôle dans l'invasion et la formation de métastases principalement via leur régulation de l'adhésion cellulaire. Notamment, l'équipe de Dr Saltel a montré que, dans les cancers du poumon et du sein, DDR1 permet la formation d'invadosomes linéaires, des structures d'actine impliquées dans l'invasion, via la voie Rho-Cdc42 et le facteur d'échange Tuba, de façon indépendante de l'activité kinase du récepteur (Juin et al., 2014). Dans le cas du mélanome, DDR2 est impliqué dans les capacités métastatiques des cellules dans un modèle *in vivo* (Badiola et al., 2012). De plus, DDR2 joue également un rôle dans la migration et l'invasion des cellules en modulant l'expression des MMP2 et MMP9 via les voies ERK1/2 et NFκB (Poudel et al., 2015). Dans le cancer colorectal, DDR1 régule l'invasion et la formation de métastases via la protéine BCR, identifiée comme son substrat dans cette étude. DDR1 va phosphoryler BCR, ce qui permet de maintenir l'activité transcriptionnelle de β-caténine (Jeitany et al., 2018).

Pour acquérir des propriétés invasives et permettre la dissémination métastatique, les cellules peuvent subir une transdifférenciation réversible appelée EMT. De plus en plus d'études ont décrit le rôle des DDR dans la mise en place de l'EMT (Koh et al., 2015). En effet, l'activation de DDR2 conduit à l'augmentation de l'activité de la voie ERK et la stabilisation nucléaire de SNAIL, un facteur de transcription de l'EMT. La stabilisation de SNAIL permet la transcription de gènes impliqués dans l'invasion et la migration pour permettre la formation de métastases (Zhang et al., 2013).

Les DDR sont également impliqués dans la résistance aux traitements des cellules. En effet, dans le cancer du sein, l'activation de DDR1 mène à la résistance à l'Etoposide (un agent chimiothérapeutique) par l'activation de la voie NFκB (Das et al., 2006). L'inhibition de DDR2 par le Dasatinib, ou la diminution de son expression par shARN, augmente la sensibilité des cellules tumorales aux immunothérapies anti-PD1, dans le mélanome, le cancer du sein, du colon, de la vessie ou de sarcome (Tu et al., 2019). Enfin, une étude du laboratoire a mis en évidence l'implication de DDR1 et DDR2 dans la résistance des mélanomes aux thérapies ciblées via l'activation de la voie NFκB non-canonique (Berestjuk et al., 2019) (*Annexe II*).

Etant donné leur rôle dans le développement tumoral et la présence d'un domaine d'activité kinase facilement accessible pour des petites molécules inhibitrices, DDR1 et DDR2 pourraient être utilisés comme des cibles potentielles pour le traitement du mélanome mais également d'autres cancers (Li et al., 2015; Regeer de Moura et al., 2020).

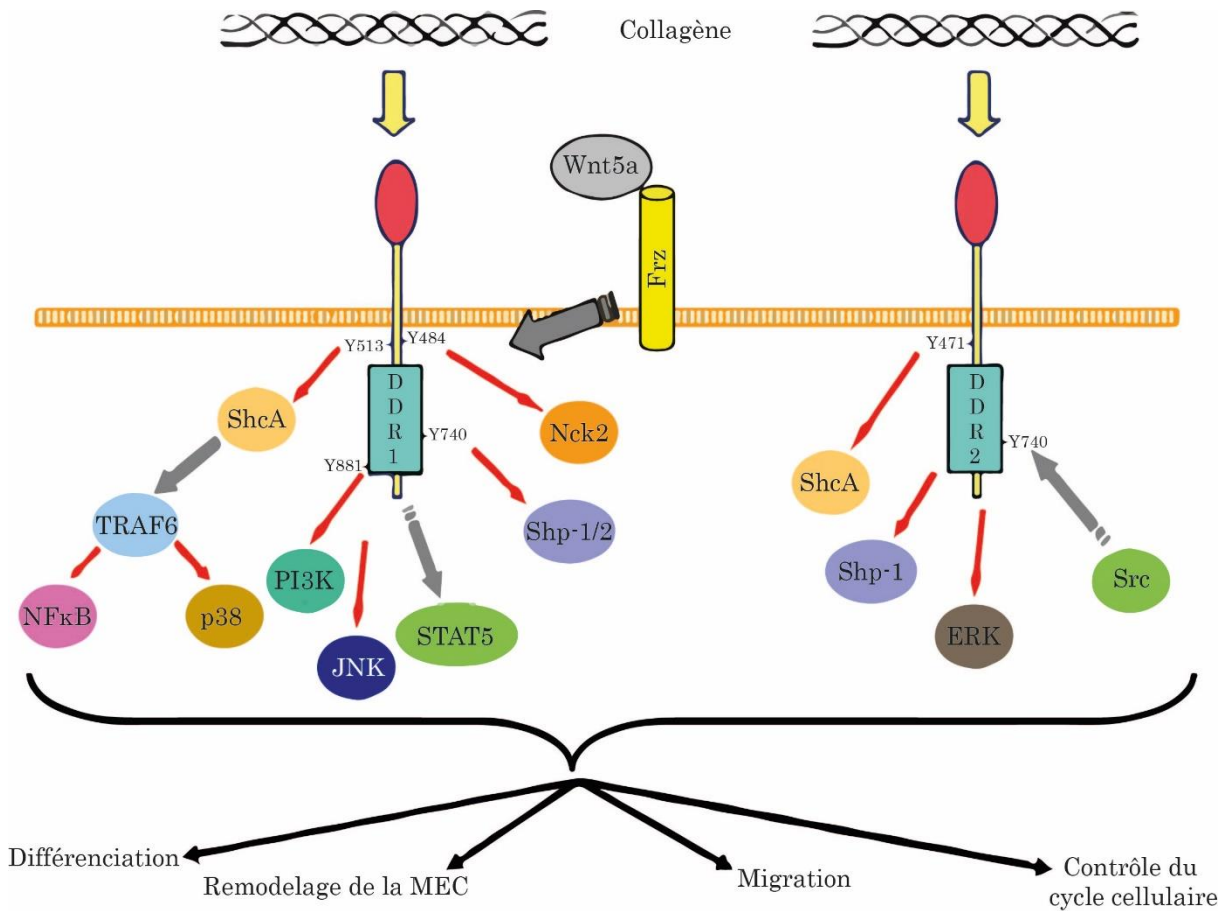


Figure 17 : Voies de signalisation des DDR

(Multhaupt et al., 2016; Vogel et al., 2006)

c) Autres récepteurs mécanosenseurs

1. Les cadhérines

Les cadhérines sont des glycoprotéines membranaires impliquées dans l'adhésion intercellulaire. Leur domaine extracellulaire se lie à celui d'une autre cadhérine de la cellule voisine pour favoriser leur interaction. Leur domaine intracellulaire est associé à une grande variété de protéines incluant des protéines du cytosquelette d'actine ou des filaments intermédiaires. Elles forment ainsi les jonctions cellulaires. Les forces de tensions intercellulaires sont donc senties par les cadhérines via les jonctions cellulaires notamment lors de la déformation de l'endothélium (Ko et al., 2001). Les cadhérines participent également à la mécanotransduction dans des systèmes sensoriels spécialisés comme les cellules de l'oreille interne (Holme and Steel, 2001).

Les cadhérines participent à de nombreuses fonctions des cancers comme la progression tumorale, l'EMT, l'angiogenèse ou la réponse immunitaire principalement dans les carcinomes (Yu et al., 2019).

2. Les canaux ioniques

Les stimuli mécaniques sont connus pour induire un courant ionique dans différents types cellulaires. Ces courants sont contrôlés par des canaux ioniques de différentes classes localisés à la membrane plasmique (Vogel and Sheetz, 2006). La sensibilité mécanique, comme la sensibilité au potentiel de membrane ou à la liaison du ligand, est une caractéristique classique des canaux ioniques. Certains canaux dépendants du potentiel de membrane comme les canaux potassiques et sodiques ont été décrit plus tard comme mécanosensibles (Sachs, 2010). Plusieurs canaux ioniques sont impliqués dans la mécanosensation mais seulement très peu sont connus pour être directement activés par les forces mécaniques. Les premiers canaux ioniques mécanosensibles à avoir été décrits sont les MSC (mechanosensitive ion channel) dans les bactéries. Ces canaux régulent la réponse des cellules aux changements de pression osmotique et affectent la croissance cellulaire en modulant le flux d'ion provenant de l'extérieur (Kung et al., 2010). Les canaux mécanosensibles (figure 18) sont impliqués dans la signalisation calcique soit de façon directe avec les Piezos, les TRP et les CaV (voltage-gated calcium channel) (Catterall, 2011; Coste et al., 2010; Toth et al., 2014) soit de façon indirecte en maintenant le gradient électrochimique nécessaire à l'entrée calcique avec la famille des canaux potassiques appelée K₂P et les canaux K_{Ca} (Brohawn et al., 2014; Ren et al., 2016). La dérégulation des canaux mécano-activés est liée aux pathologies dépendantes de la mécanotransduction comme les maladies cardiovasculaires, les maladies du rein ou les cancers (Barnes et al., 2017).

B. Les acteurs intracellulaires des voies de la mécanotransduction

a) Le cytosquelette sert d'intermédiaire entre les récepteurs et le noyau

Le cytosquelette forme la charpente de la cellule. C'est un réseau dynamique composé de différentes fibres. Trois différents types de fibres composent le cytosquelette : les microfilaments d'actines, les filaments intermédiaires (FI) et les microtubules (MT) (figure 18). Le cytosquelette sert de maintien à la cellule et permet le déplacement des organites et vésicules, la motilité cellulaire, la contraction et la division cellulaire

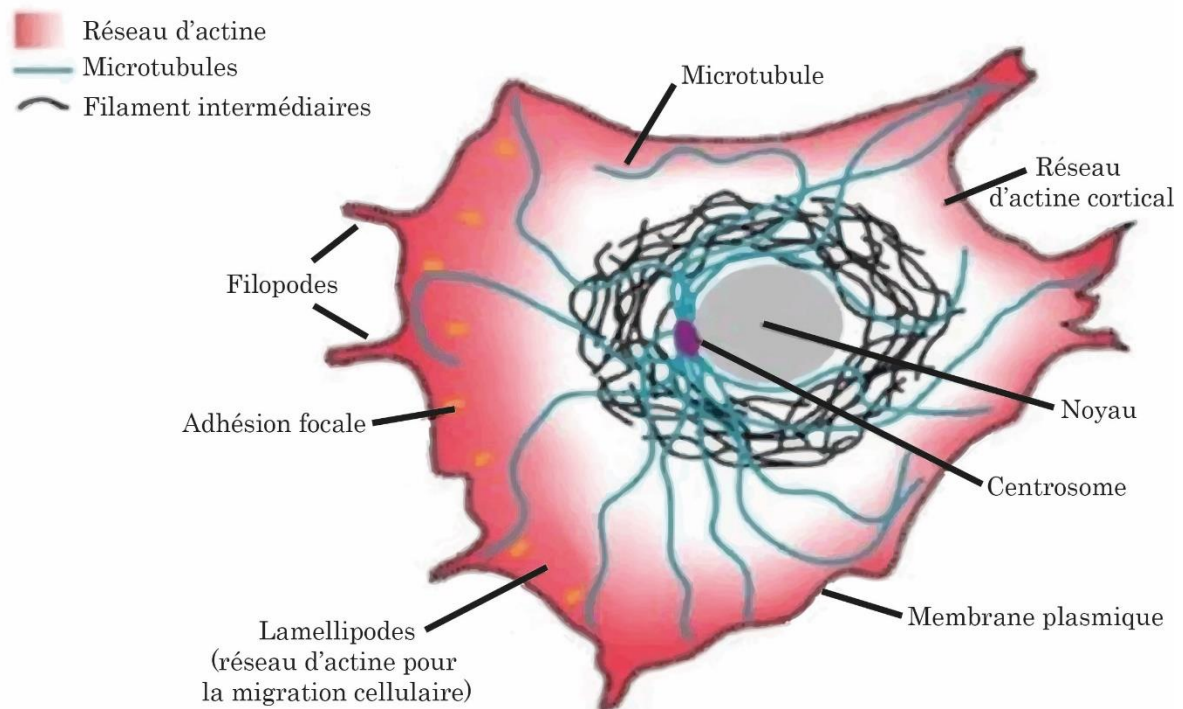


Figure 18 : Le cytosquelette

Schéma d'une cellule montrant la localisation des 3 composants du cytosquelette : le réseau d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Le réseau d'actine est plus dense au niveau de la membrane plasmique pour permettre la migration des cellules.

Adapté de la thèse de Prasenjit Bose, 2018

1. Les filaments d'actine

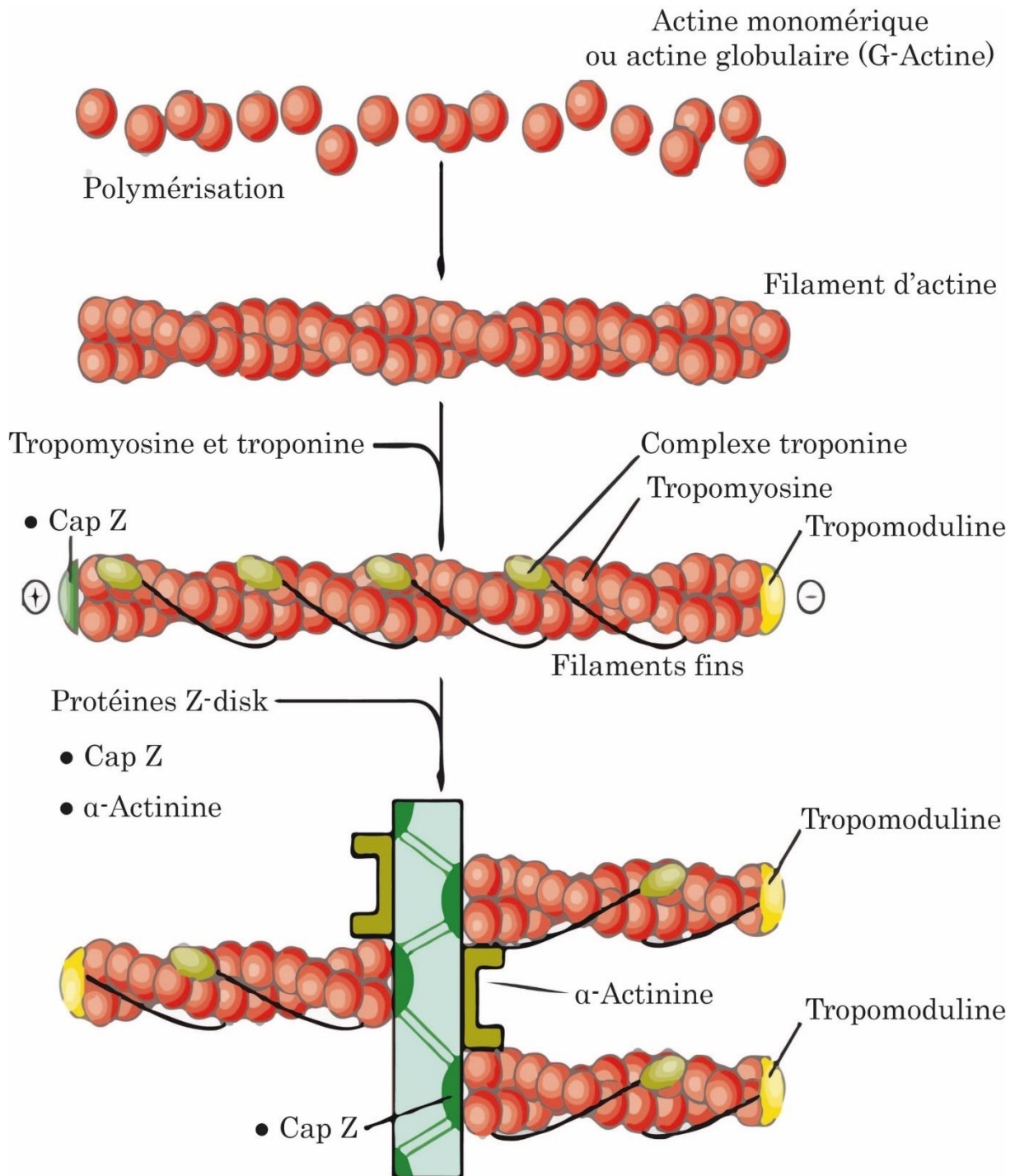


Figure 19 : Polymérisation de l'actine

Adapté de Medical Cell Biology (Third Edition) - Chapter 3 - Cytoskeleton

i. Rôle physiologique

Les microfilaments sont composés de polymères d'actine et de protéines de liaison à l'actine (ABP, actin-binding protein). Dans la cellule, l'actine existe sous forme de monomère (G-actine) ou de polymère (F-actine) (figure 19). Chaque sous-unité d'actine est capable de se lier à l'ATP qui est hydrolysé en ADP lors de l'incorporation d'actine pendant la croissance d'un filament. Les filaments d'actine consistent en une double hélice de polymères disposés en quinconce. Les fonctions du cytosquelette d'actine requièrent un remodelage et un renouvellement coordonnés des filaments d'actine (Pollard and Borisy, 2003) qui est possible grâce à l'interaction avec les ABP (Weeds et al., 1991) (Table 4). La famille des myosines fait partie des ABP. Elles sont au nombre de 18 (de I à XVIII) et sont divisé en deux groupes : la myosine II, de type conventionnel, qui participe à la contractilité du muscle strié squelettique et les myosines non conventionnelles qui se déplacent sur le filament d'actine grâce à l'hydrolyse de l'ATP pour permettre le transport des vésicules à travers le cytoplasme pour établir l'organisation intracellulaire (Hartman and Spudich, 2012; Spudich, 2001).

La régulation de la dynamique d'un filament d'actine fait également intervenir certaines enzymes appelées petites protéines G ou petites GTPases, dont fait partie la famille des protéines Rho, incluant Cdc42, Rac1 et RhoA (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Ces GTPases passent d'un état actif lié au GTP à un état inactif lié au GDP. L'activation de Cdc42 mène à la polymérisation de l'actine résultant en la formation de filopodes et microspikes. L'activation de Rac1 mène à la formation de lamellipodes. L'activation de Rho promeut l'assemblage des filaments d'actine qui forme, avec la myosine II, des fibres de stress en interaction avec les adhésions focales (Etienne-Manneville and Hall, 2002) (figure 20).

Protéines	Fonctions
Tropomyosine	Stabilise les filaments
Fimbrine, α -actinine, villine	Regroupe les filaments
Formine, Arp 2/3	Amorce la polymérisation et forme des branches
Filamine	Réticule les filaments
Spectrine I/II	Réticule les filaments dans la membrane
Gelsoline	Fragmente les filaments
Myosine II	Fait glisser les filaments sur les muscles
Myosine I	Transporte les vésicules sur les filaments
Cap Z	Coiffe l'extrémité (+) des filaments
Profiline, thymosine	Se lie aux monomères d'actine

Table 4 : Protéines se liant à l'actine (ABP)

Adapté de Medical Cell Biology (Third Edition) - Chapter 3 - Cytoskeleton

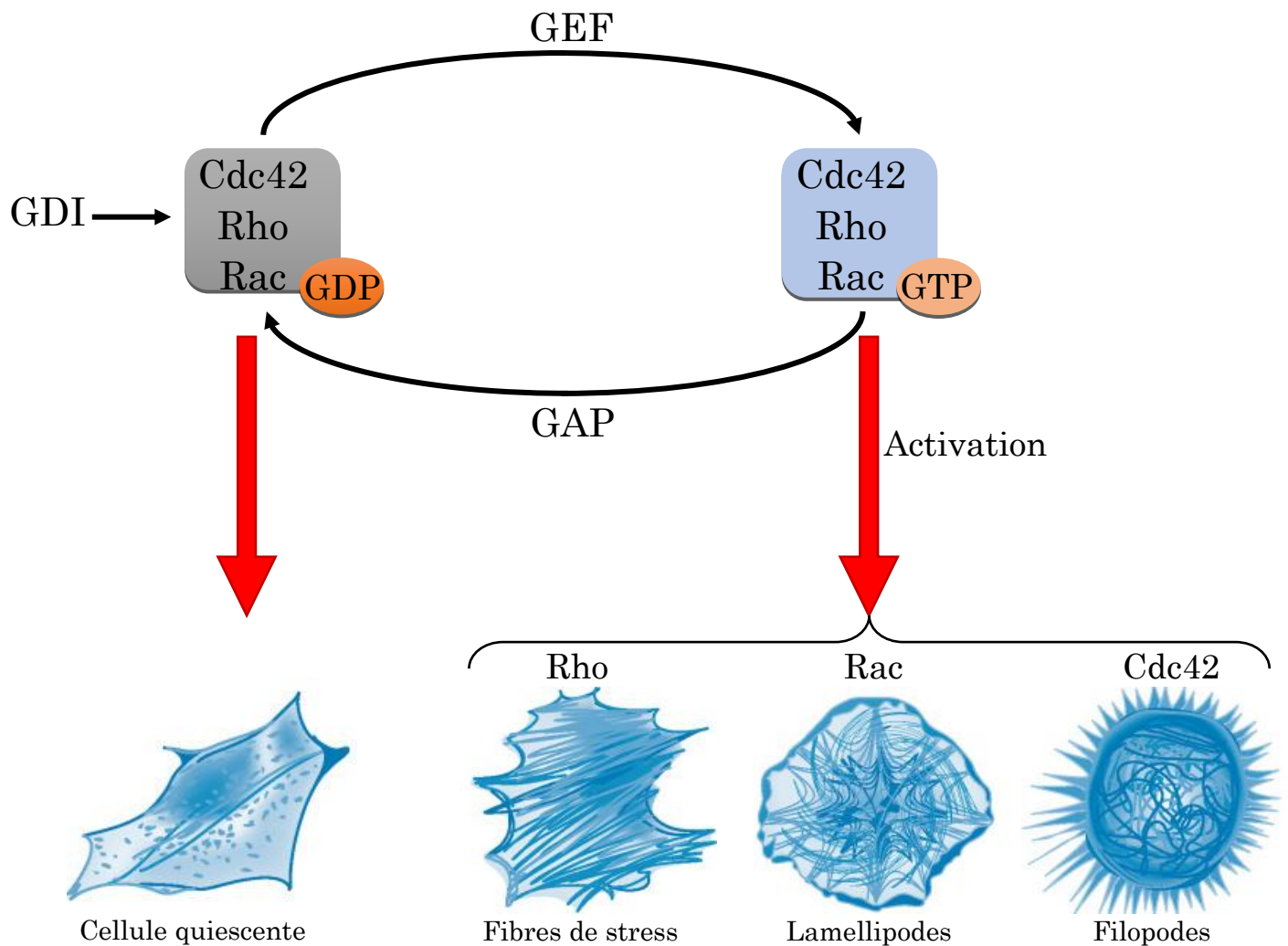


Figure 20 : Effet de l'activation des protéines de la famille Rho sur l'organisation de l'actine

Adapté de Medical Cell Biology (Third Edition) - Chapter 3 - Cytoskeleton

ii. Rôle dans la mécanotransduction

Les filaments d'actine sont directement reliés aux différents récepteurs de la mécanotransduction et permettent ainsi de transmettre les forces extérieures jusqu'au noyau. La réorganisation du cytosquelette d'actine entraîne des changements de morphologie cellulaire en réponse aux changements de rigidité. Plus particulièrement, les fibres de stress d'actine ne sont pas visibles lorsque les cellules sont ensemencées sur support souple, elles apparaissent à partir de 3kPa (Yeung et al., 2005). Lorsque les cellules endothéliales sont soumises à un flux laminaire, elles réorganisent leur cytosquelette d'actine de façon dépendante de Rac1 et RhoA (Tzima et al., 2001). De plus, grâce au cytosquelette d'actine et à la myosine, les cellules peuvent exercer en retour des forces contractiles sur leur substrat pour le remodeler (Asparuhova et al., 2009). En réponse aux signaux mécaniques, le cytosquelette d'actine influence la translocation nucléaire de différents cofacteurs de la transcription comme YAP/TAZ et MRTF dont les rôles seront détaillés dans la *partie c)* et *d)* (Dai et al., 2019; Dupont et al., 2011).

Les CAF régulent la rigidité matricielle par la contraction de leur cytosquelette d'actomyosine. La contraction du cytosquelette se fait par la GTPase Rho et sa kinase effectrice ROCK (Rho associated protein kinase) qui va phosphoryler MLC-2 (myosin light chain 2) de manière directe ou indirecte par la phosphorylation inhibitrice de la phosphatase de MLC-2, MYPT (myosin phosphatase targeting protein) (Albregues et al., 2014b; Sanz-Moreno et al., 2011) (Figure 21).

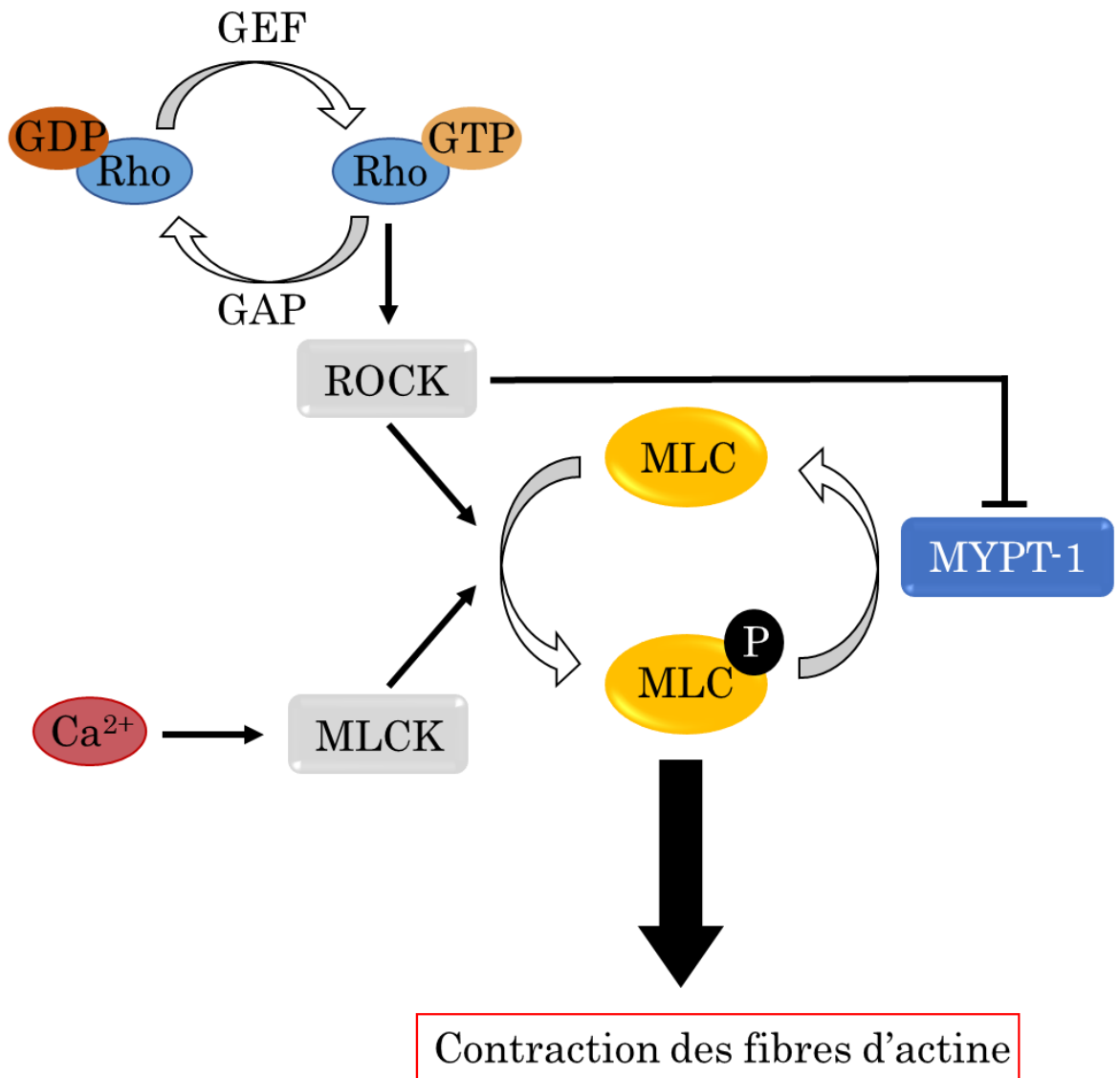


Figure 21 : La voie Rho/ROCK

Adapté de Cellular Biochemistry II et de {Jin, 2020 #1846}

iii. Rôle dans les cancers

Une motilité cellulaire altérée est un des « hallmarks » des cancers et est caractéristique de la formation de métastases en facilitant l'avancement des cellules tumorales de façon locale et vers des sites distants (Hanahan and Weinberg, 2011). La réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine est requise pour la motilité cellulaire. Cette réorganisation de l'actine a lieu lors de l'EMT pour convertir des cellules de type épithéliales en cellules mésenchymateuses pour augmenter leurs capacités migratoires (Lamouille et al., 2014; Thiery et al., 2009). Les Rho GTPases, en lien avec l'actine, sont d'importants transducteurs de différentes voies de signalisation régulant la migration cellulaire, la prolifération, la survie et la résistance à la mort (Orgaz et al., 2014). Les Rho GTPases sont peu mutées dans les cancers. On retrouve cependant une mutation de Rac1 sur la proline en position 29 dans certaines tumeurs de mélanome, de cancer du sein ou de la tête et du cou (Alan and Lundquist, 2013). La plupart du temps, les Rho GTPases sont surexprimées ou hyperactivées à cause d'un changement d'expression des GAP, GEF ou GDI (figure 20). Les Rho GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 ont été montrées comme importantes pour la progression et la formation de métastases de différents cancers solides comme le cancer du sein, du foie ou le mélanome (Kamai et al., 2004; Wang et al., 2007). Le rôle des Rho GTPases dans les cancers est complexe et dépend de plusieurs facteurs comme les stimuli extracellulaires, les voies de signalisation impliquées et le type de cancer considéré (Albregues et al., 2014b; Calvo et al., 2015; Haga and Ridley, 2016). Les voies Rho/ROCK (Rho-associated protein kinase) et Cdc42/Septine sont également impliquées dans la contraction des CAF, favorisant la croissance, l'angiogenèse tumorale et l'invasion tumorale (Sanz-Moreno, 2011 #237). Le ciblage de ces Rho GTPases dans les cancers peut être une approche prometteuse (Rodriguez-Hernandez et al., 2016). En effet, dans le cas du mélanome, une étude récente de l'équipe du Dr Sanz-Moreno a montré que le ciblage de ROCK, la kinase effectrice de RhoA, augmente la sensibilité des cellules de mélanome aux thérapies ciblées et aux immunothérapies (Orgaz et al., 2020).

2. Les filaments intermédiaires

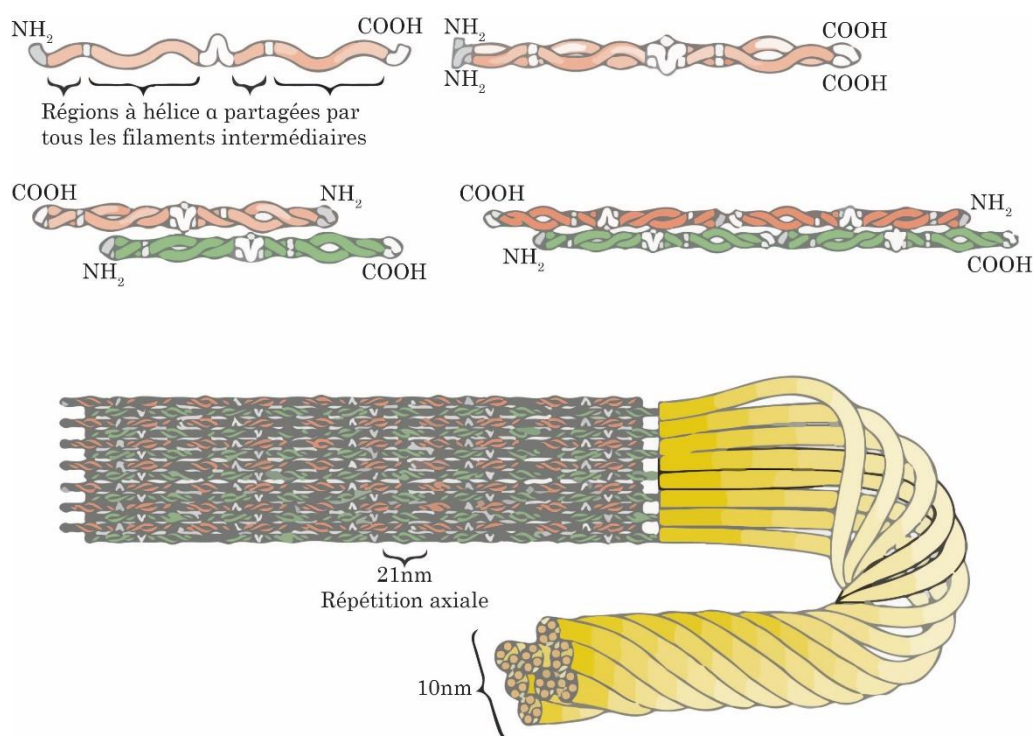


Figure 22 : Structure et assemblage d'un filament intermédiaire

Adapté de Medical Cell Biology (Third Edition) - Chapter 3 - Cytoskeleton

i. Rôle physiologique

Les filaments intermédiaires (FI) sont divisés en cinq classes : les kératines, les neurofilaments, les desmines, les lamines et la vimentine (table 5). Ils sont liés à la MEC par certaines intégrines et s'étendent dans le cytoplasme jusqu'au tour du noyau. Ce vaste réseau permet de relayer les informations de la surface vers les compartiments internes de la cellule (Chang and Goldman, 2004).

Les FI ont des structures fibreuses alors que les filaments d'actine et les MT sont globulaires. Aucune énergie n'est nécessaire pour la polymérisation des FI. Pour commencer, 2 monomères s'enroulent pour former un dimère. Ensuite, 2 dimères se juxtaposent de façon antiparallèle pour former un tétramère. Les tétramères s'attachent ensemble jusqu'à 8 tétramères. Ces 8 tétramères s'enroulent à nouveau pour former une structure en corde (figure 22) (Fuchs and Weber, 1994).

Contrairement aux filaments d'actine et aux microtubules, les FI participent à la structure et à l'élasticité cellulaire mais pas à sa motilité mais car ils sont plus stables que les autres fibres du cytosquelette. Le réseau de FI fournit un support mécanique aux membranes cellulaires, comme la lamine retrouvée le long de la surface interne de l'enveloppe nucléaire (McKeon, 1991).

Classe	Protéines	Type cellulaire
I	Kératines acides	Cellules épithéliales
II	Kératines basiques	Cellules épithéliales
III	Vimentine	Mésenchyme
	Desmine	Muscles
	GFAP	Cellules gliales, astrocytes
	Périphérine	Système nerveux périphérique
	Plasticine	Cellules rétinienne ganglionnaires
IV	Protéines Neurofilaments -L, -M, -H	Système nerveux centrale
	α -internexine	Neurones du système nerveux centrale
V	Lamines A, B, C	Membrane nucléaire
VI	Nestines	Cellules neuro-épithéliales

Table 5 : Les différents filaments intermédiaires

Adapté de Medical Cell Biology (Third Edition) - Chapter 3 – Cytoskeleton et de (Daly et al., 1998)

ii. Rôle dans la mécanotransduction

Les FI peuvent interagir avec certains récepteurs de la mécanotransduction comme l'intégrine $\beta 3$ à laquelle se lie la vimentine (Kim et al., 2016a) ou de façon indirecte par des protéines de liaison telle que la plectine (Bhattacharya et al., 2009). Le cytosquelette de FI agit comme un réseau élastique qui transmet et propage les forces mécaniques auxquelles les cellules sont soumises via la MEC ou l'adhérence intercellulaire. L'assemblage des fibres de stress d'actine et leur contractilité peuvent être régulés par les filaments de vimentine via l'activation de RhoA et de la GEF-H1 (la GEF de RhoA) (Jiu et al., 2017). Les FI participent donc à la mécanotransduction en se coordonnant avec les autres éléments du cytosquelette pour répondre aux stimuli mécaniques auxquels la cellule peut être soumise (Sanghvi-Shah and Weber, 2017).

iii. Rôle dans les cancers

Les FI jouent un rôle important dans les cancers notamment dans la formation de métastases. La nestine est surexprimée dans différents types de cancer. Son expression corrèle avec la croissance tumorale et la formation de métastases, en faisant ainsi un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du pancréas, de la prostate, le mélanome et le glioblastome (Ishiwata et al., 2011). La vimentine voit également son expression augmentée dans les cellules devenues mésenchymateuses après avoir subi l'EMT, participant ainsi à la progression tumorale (Satelli and Li, 2011). Enfin, la kératine est surexprimée dans différents cancers épithéliaux tels que le cancer du sein, des ovaires, de la prostate, du poumon, de la tête et du cou ou de la vessie et elle peut servir de marqueur de diagnostic ou de caractérisation de tumeurs métastatiques d'origine inconnue (Barak et al., 2004; Karantza, 2011).

3. Les microtubules

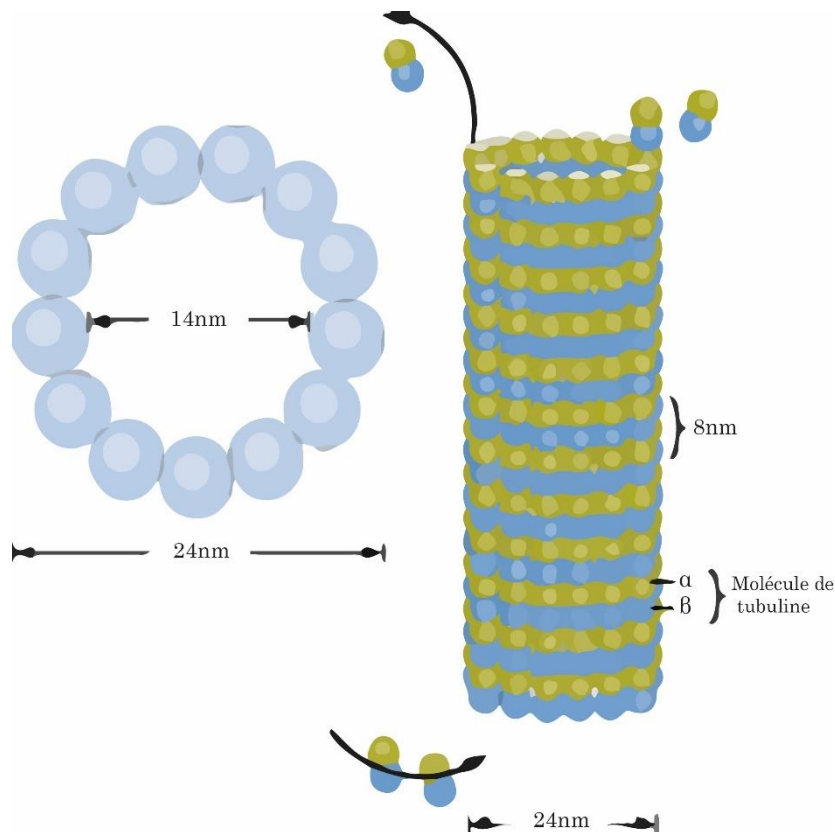


Figure 23 : Structure d'un microtubule

Adapté de Medical Cell Biology (Third Edition) - Chapter 3 - Cytoskeleton

i. Rôle physiologique

Les microtubules (MT) sont composés d'hétérodimères de tubuline α et β qui s'auto-assemblent en polymères et forment des structures cylindriques. (Luduena, 2013). Un MT est composé de 13 hétérodimères de tubuline qui représente 13 protofilaments, organisés en une alternance de sous-unité de tubuline α et β (figure 23). Les protéines associés aux MT sont impliquées dans l'assemblage des MT et leur nucléation, c'est-à-dire l'assemblage des hétérodimères de tubuline α et β (Maccioni and Cambiasso, 1995). La dynamique des MT est régulée par l'hydrolyse du GTP sur la sous-unité de tubuline β . Les MT sont des structures dynamiques avec un rôle important dans la migration cellulaire, le transport des vésicules et la mitose (Ganguly et al., 2012; Salmon and Wolniak, 1990; Thyberg and Moskalewski, 1999). La capacité des MT à se polymériser et se dépolymériser de façon régulée est essentielle pour la séparation des chromosomes lors de la mitose (figure 24).

ii. Rôle dans la mécanotransduction

La formation des MT est affectée par des stimuli mécaniques. Cela a été observé lors d'un étirement passif de cellules musculaires cardiaques où les MT sont devenus plus stables et plus denses (White, 2011). De plus, l'inhibition de l'intégrine $\beta 1$ a le même effet qu'un inhibiteur classique de la polymérisation des MT comme la colchicine. Ceci suggère que la polymérisation des MT induite par un stress mécanique est contrôlée par l'intégrine $\beta 1$ (Yutao et al., 2006). Dans des cellules épithéliales de sein, la stabilité des MT est diminuée en réponse à la rigidité matricielle, permettant l'activation de la GEF-H1 et donc de la voie RhoA (Heck et al., 2012).

iii. Rôle dans les cancers

Des voies sont communes à l'actine et aux MT, comme la voie des Rho GTPases, pour réguler notamment le mouvement cellulaire. En effet, dans l'adénocarcinome gastrique, une altération de la dynamique des MT augmente l'activité de RhoA et sa kinase associée ROCK, résultant en une modification de l'organisation du cytosquelette et un changement vers une migration amiboïde (Eitaki et al., 2012). La prolifération soutenue des cellules tumorales étant un des « hallmarks of cancer », les premiers traitements contre les cancers à avoir été développés sont les chimiothérapies, comme le paclitaxel et docitaxel, ciblant le cytosquelette de MT pour empêcher la mitose (Zhou and Giannakakou, 2005). Cependant, une altération de la tubuline β dans les cancers épithéliaux, est associée à la résistance à ces agents chimio-thérapeutiques (Kavallaris, 2010).

b) Le noyau peut sentir les forces mécaniques et y répondre

Beaucoup de voies de signalisation convergent au noyau pour réguler d'importants processus comme la transcription, la réplication de l'ADN et la progression dans le cycle cellulaire. Les forces mécaniques transmises par les récepteurs mécanosenseurs et par le cytosquelette sont transmises au noyau qui peut soit les sentir directement soit faire entrer des facteurs ou cofacteurs de la transcription pour activer la transcription de leurs gènes cibles.

Les changements de morphologie du noyau en réponse à un stimulus mécanique ont été observés pour la première fois il y a presque 90 ans (Chambers et al., 1931). Des forces appliquées sur les intégrines mènent à une transmission rapide, de l'ordre de la seconde, des forces vers le noyau, avec comme conséquence un changement morphologique du noyau (Maniotis et al., 1997). Les effets des forces mécaniques influencent également l'activité des gènes (Gieni and Hendzel, 2008; Lombardi et al., 2011) et la morphologie de la chromatine. L'expression des gènes peut être modifiée dans le noyau sans l'intervention de facteurs et cofacteurs de la transcription.

L'étude de Tajik *et al.*, a montré qu'exercer un stress d'étirement sur des cellules en utilisant des billes magnétiques, couplées à un motif RGD pour être reconnu par les intégrines, entraine un étirement de la chromatine qui a pour conséquence une augmentation de la transcription des gènes (Tajik et al., 2016) (figure 24).

Les forces mécaniques peuvent provoquer un changement de conformation de la lamine A/C (Ihalainen et al., 2015; Swift et al., 2013), qui peut altérer son interaction avec des protéines partenaires, induire des phosphorylations sur les sites exposés, modifiant la signalisation en aval (figure 24) (Maurer and Lammerding, 2019). Lors d'un stress mécanique, l'étirement du noyau entraine une ouverture des pores nucléaires qui permet l'import des protéines dans le noyau, comme le cofacteur de transcription YAP (Elosegui-Artola et al., 2017).

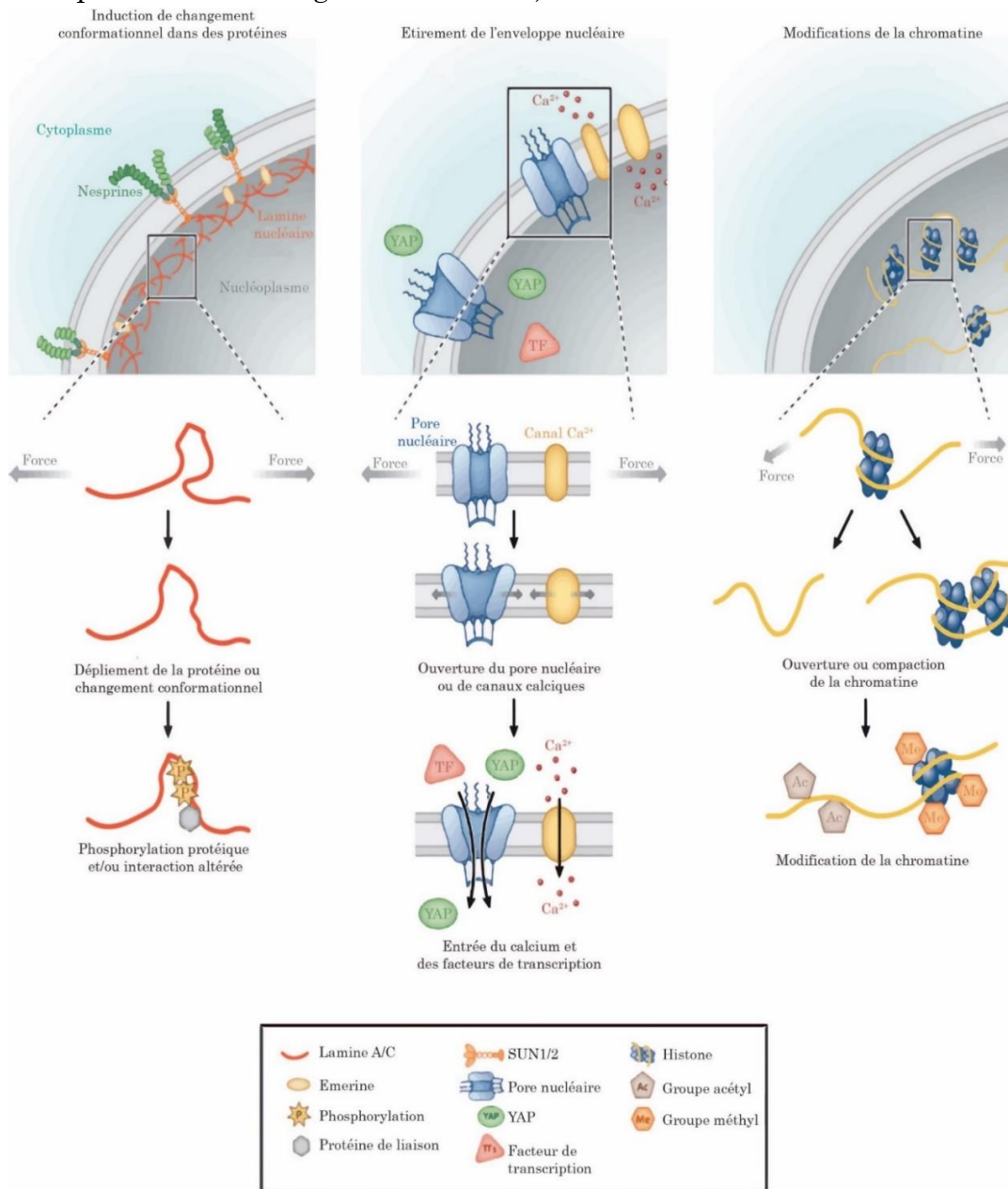


Figure 24 : Les conséquences des forces subies par le noyau

(Maurer and Lammerding, 2019)

Un noyau isolé est capable de répondre à des forces mécaniques (Guilluy et al., 2014), suggérant que des fonctions sensorielles, transductrices et de réponse à ces forces existent dans le noyau en lui-même. Le noyau est pourvu d'une enveloppe nucléaire constituée de protéines qui connectent le noyau au cytosquelette formant le complexe LINC (linker of nucleoskeleton and cytoplasm) (figure 25).

Ce complexe est lié de façon directe à l'actine et indirecte aux FI et aux MT (Jahed and Mofrad, 2019), permettant ainsi au noyau de ressentir les forces mécaniques transmises à la cellule.

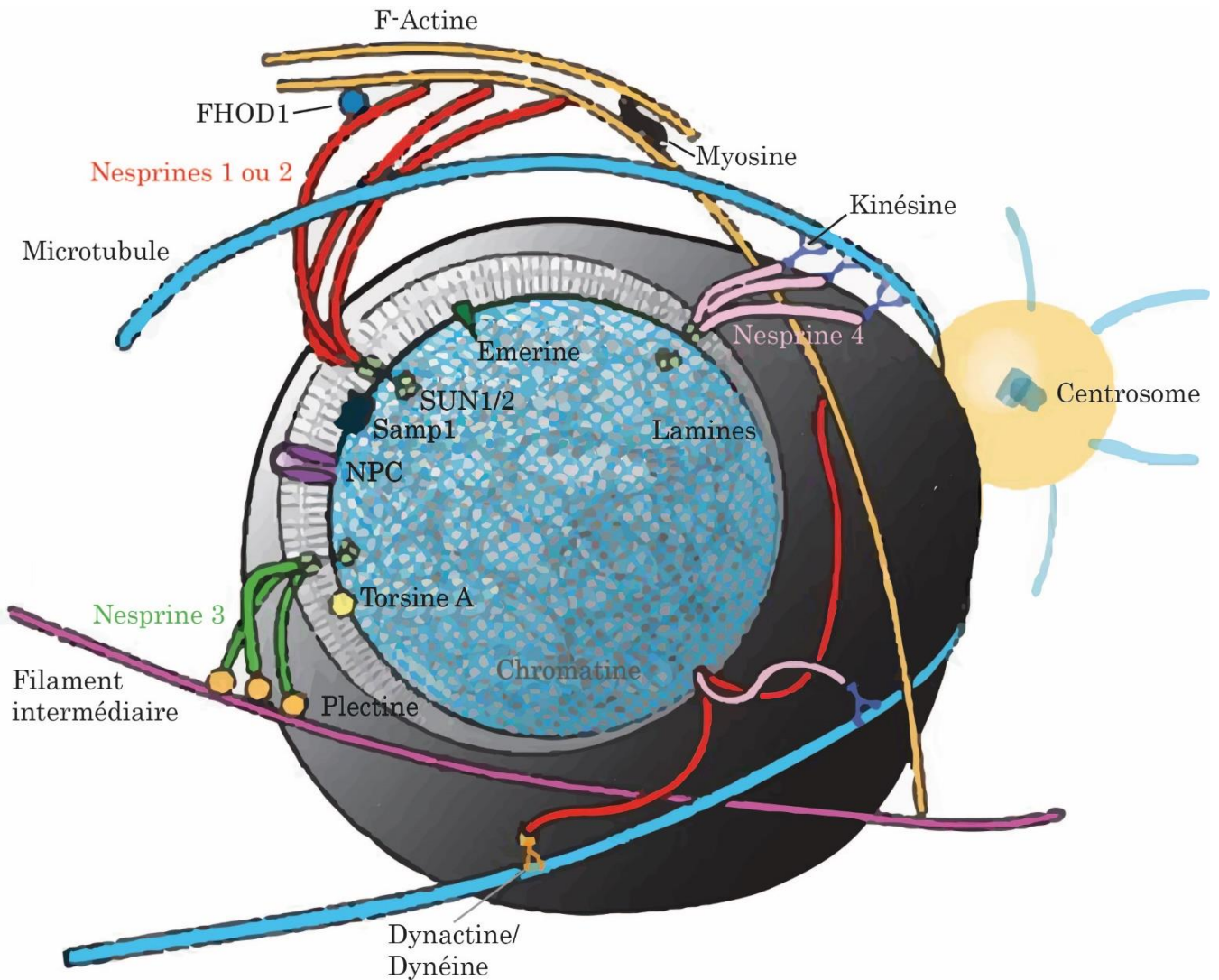


Figure 25 : Le complexe LINC du noyau

(Graham and Burrridge, 2016)

c) Les coactivateurs transcriptionnels YAP/TAZ

1. Rôle physiologique

Les cofacteurs de transcription YAP (Yes associated protein) et TAZ (Transcriptional CoActivator With PDZ-Binding Motif) font partie de la voie Hippo. Cette voie de signalisation a d'abord été décrite dans la Drosophile comme la voie « Salvador-Warts-Hippo » (Piccolo et al., 2014). Les kinases constituant la voie Hippo sont très conservées entre la Drosophile et l'Homme.

La voie Hippo relaie des signaux de la membrane plasmique au noyau pour réguler l'expression de gènes contrôlant divers processus cellulaires comme la prolifération, la survie ou la différenciation (Johnson and Halder, 2014). Contrairement aux voies de signalisation classiques, la voie Hippo n'a pas de ligands ou de récepteurs dédiés mais est régulée par un réseau de composants, principalement impliqués dans la régulation de l'adhésion cellulaire et la polarité (figure 27). La voie Hippo est composée de 2 familles de sérine-thréonine kinases : MST1/2 et LATS1/2. Chacune de ces kinases sont associées à des protéines d'échafaudage : SAV1 pour MST1/2 et MOB1A/MOB1B pour LATS1/2 (Johnson and Halder, 2014) (figure 26). La voie Hippo possède 2 coactivateurs de la transcription YAP et TAZ, qui ne sont pas capables d'associer directement à l'ADN. En conséquence, ils forment des complexes avec des facteurs de transcription via leur domaine TEA tels que TEAD (Transcriptional enhance associate domain), RUNX1/2 ou p73 (figure 26).

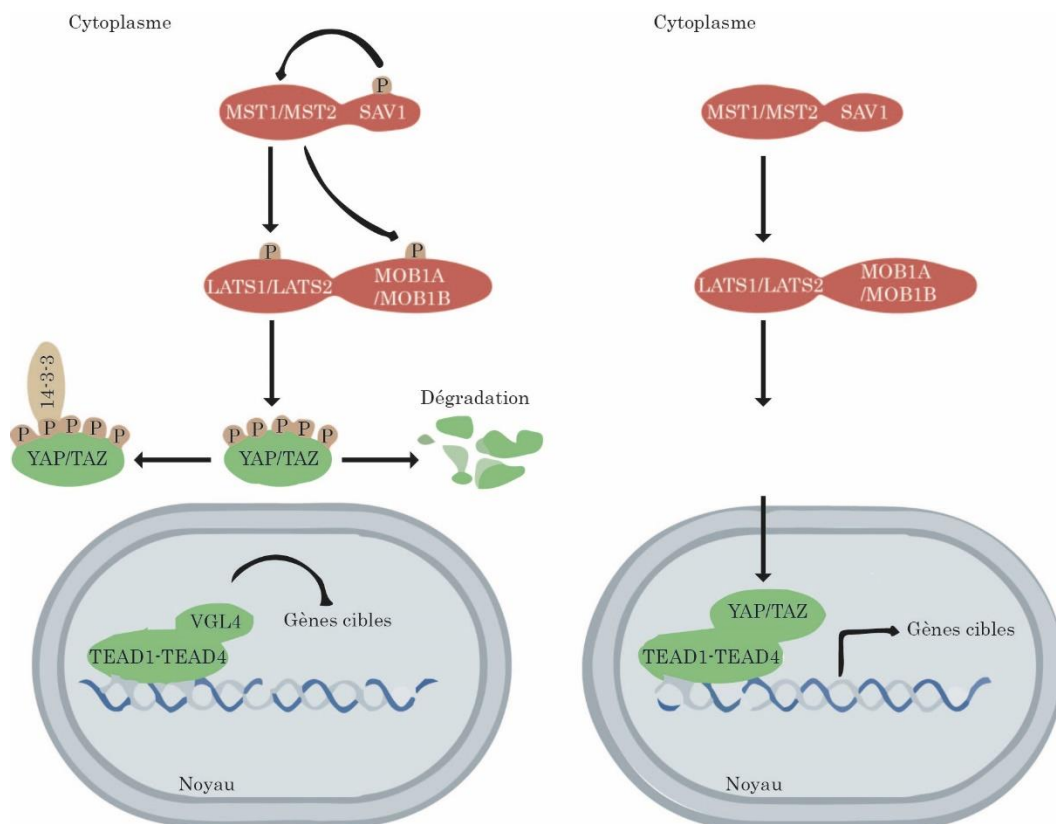


Figure 26 : La voie Hippo

(Johnson and Halder, 2014)

YAP a été identifiée en 1995 comme interagissant avec la kinase de la famille SRC, YES, par son domaine SH3, dont elle tient son nom (Sudol et al., 1995). TAZ a été identifiée plus tard, en 2000. Et elle interagit avec la protéine 14.3.3 par son domaine PDZ (prenant son nom des 3 premières protéines décrites possédant ce domaine : PSD95, Dsg, ZO-1) (Kanai et al., 2000). YAP et TAZ sont issues de la transcription de gènes distincts. YAP est codée par le gène *YAP1* sur le chromosome 11 tandis que TAZ est codée par le gène *WWTR1* sur le chromosome 3, et n'est présent que chez les vertébrés (Hilman and Gat, 2011). YAP et TAZ présentent une homologie de 46% entre elles. Elles possèdent des domaines communs comme un domaine d'interaction avec les facteurs de transcription de la famille TEAD (Transcriptional enhance associate domain) situé en N-terminal, au moins un domaine d'interaction de type WW (d'une quarantaine de résidus contenant 2 tryptophanes et interagissant avec le motif PPxY sur de nombreuses protéines), un domaine transactivateur (TAD) en C-terminal ainsi qu'un domaine d'interaction avec les protéines exprimant des domaines de type PDZ (Hong and Guan, 2012) (figure 27).

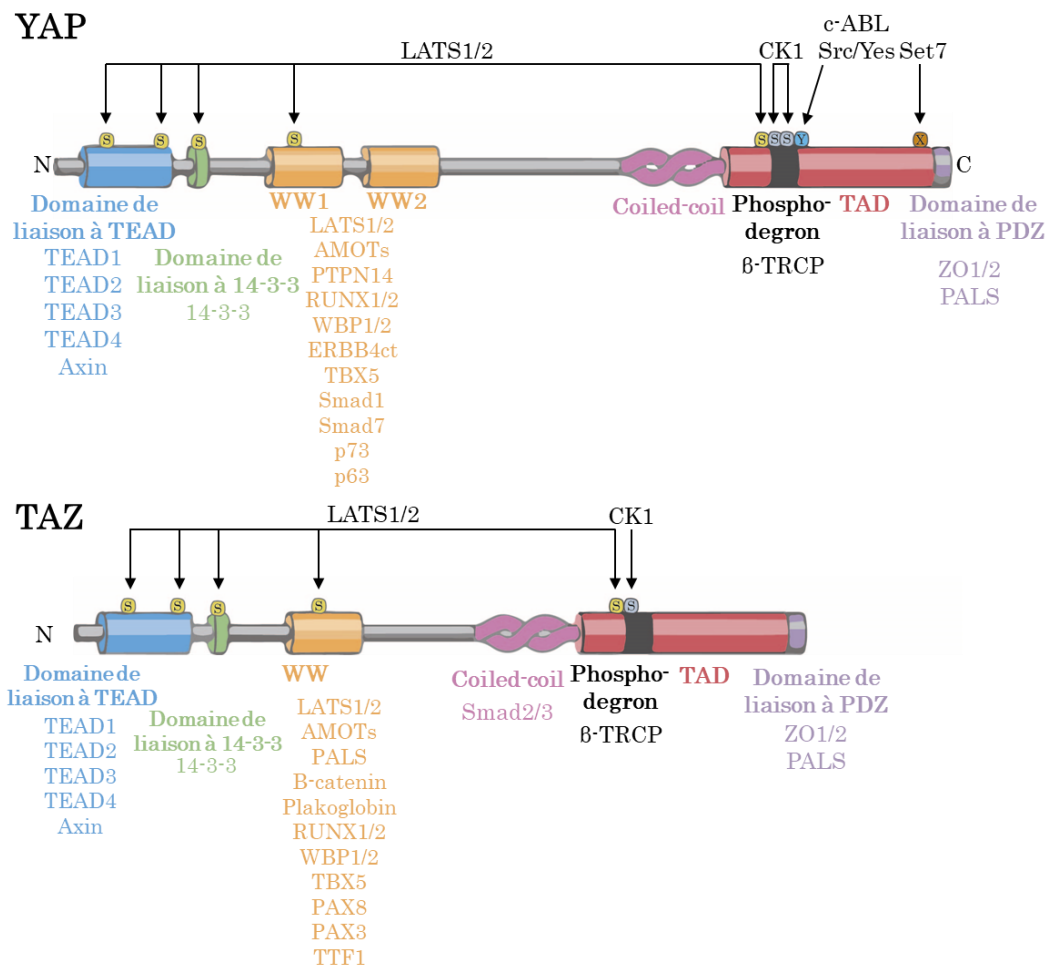


Figure 27 : Structure de YAP et de TAZ et protéines partenaires

TAD, transcription activation domain

Adapté de (Piccolo et al., 2014)

La voie Hippo est active lorsque les kinases MST et LATS le sont aussi. Le complexe MST/SAV1 phosphoryle et active le complexe LAST/MOB1 qui va à son tour phosphoryler leurs effecteurs YAP et TAZ (Dong et al., 2007; Hao et al., 2008; Oh and Irvine, 2008). La phosphorylation de YAP et de TAZ entraîne leur export du noyau, leur rétention dans le cytoplasme où ils vont être séquestrés par la protéine 14-3-3 puis leur dégradation dépendante de β TRCP par le protéasome (figure 26) (Dong et al., 2007; Liu et al., 2010; Oh and Irvine, 2008; Ren et al., 2010). Au lieu de se lier à YAP et TAZ, TEAD va se lier à VGL4 (vestigial-like family member 4) qui réprime l'expression des gènes (Guo et al., 2013; Zhang et al., 2014). Lorsque la voie Hippo est inactive, YAP et TAZ s'accumulent dans le noyau et activent la transcription de leurs gènes cibles en s'associant leurs facteurs de transcription tels que TEAD, SMAD, TBX5, RUNX1/2 ou p73 (Ferrigno et al., 2002; Murakami et al., 2005; Passaniti et al., 2017; Strano et al., 2001; Totaro et al., 2018; Varelas et al., 2008; Wu et al., 2008). La voie Hippo a donc pour rôle majeur d'inhiber les fonctions nucléaires de YAP et TAZ.

Le rôle de la voie Hippo dans le contrôle de la croissance lors du développement a d'abord été décrite dans la Drosophile (Jia et al., 2003; Udan et al., 2003). La voie Hippo sert à réguler la taille des organes durant le développement. Une surexpression de YAP ou une perte de fonction de MST et LATS entraîne une prolifération importante des cellules et une dérégulation de l'apoptose, ce qui conduit à une augmentation de la taille des organes comme le foie ou le cœur (Dong et al., 2007; Huang et al., 2005; Udan et al., 2003; von Gise et al., 2012).

Les protéines YAP et TAZ sont très similaires pour être redondantes dans certaines circonstances comme, dans l'ostéogenèse ou le phénotype des cellules souches, en revanche, leurs différences au niveau biochimique et de leur régulation leur permettent de jouer des rôles différents dans le développement pulmonaire, la fonction des fibroblastes de la cornée, la différenciation des lymphocytes T ou la fonction des myoblastes (LeBlanc et al., 2021). De plus, l'invalidation de YAP dans un modèle murin engendre la mort des embryons (Morin-Kensicki et al., 2006) alors que la perte de TAZ provoque des malformations sévères des glomérules rénaux ou des poumons, augmentant le risque de mortalité des souriceaux après leur naissance (Hossain et al., 2007; Makita et al., 2008). Ceci confirme les différences de fonctions existant entre YAP et TAZ.

YAP et TAZ sont également capables de se contrôler mutuellement selon le contexte. YAP régule négativement l'accumulation de TAZ, en provoquant sa dégradation via GSK3 et HSP90, dans un modèle de fibroblastes embryonnaires murins (Finch-Edmondson et al., 2015). Dans cette étude, TAZ n'est pas capable d'affecter l'expression de la protéine YAP. Cependant, il a été montré, dans un modèle humain de fibroblastes de la cornée, que la diminution de TAZ mène à une augmentation de l'expression de YAP (Muppala et al., 2019).

Les gènes cibles de YAP et TAZ incluent différentes protéines impliquées dans la mécanotransduction ou la rigidification de la MEC (figure 28)(Totaro et al., 2018) comme des intégrines, des protéines régulant le cytosquelette et la contraction (MLC2), des protéine de la MEC comme la laminine, des protéines matricellulaires comme CTGF ou CYR61 (cf. Chapitre 1) ou une protéine de la famille de motines telle que AMOTL2. Comme YAP et TAZ ne se lient pas aux mêmes facteurs de transcription, ils peuvent ne pas réguler les mêmes gènes (figure 27) (LeBlanc et al., 2021). Par exemple, l'intégrine αV ou l'ANGPTL4 sont des cibles de TAZ mais pas YAP tandis que BAX ou PIG3 sont des cibles de YAP lorsqu'elle se lie à p75 (Kim et al., 2018b)

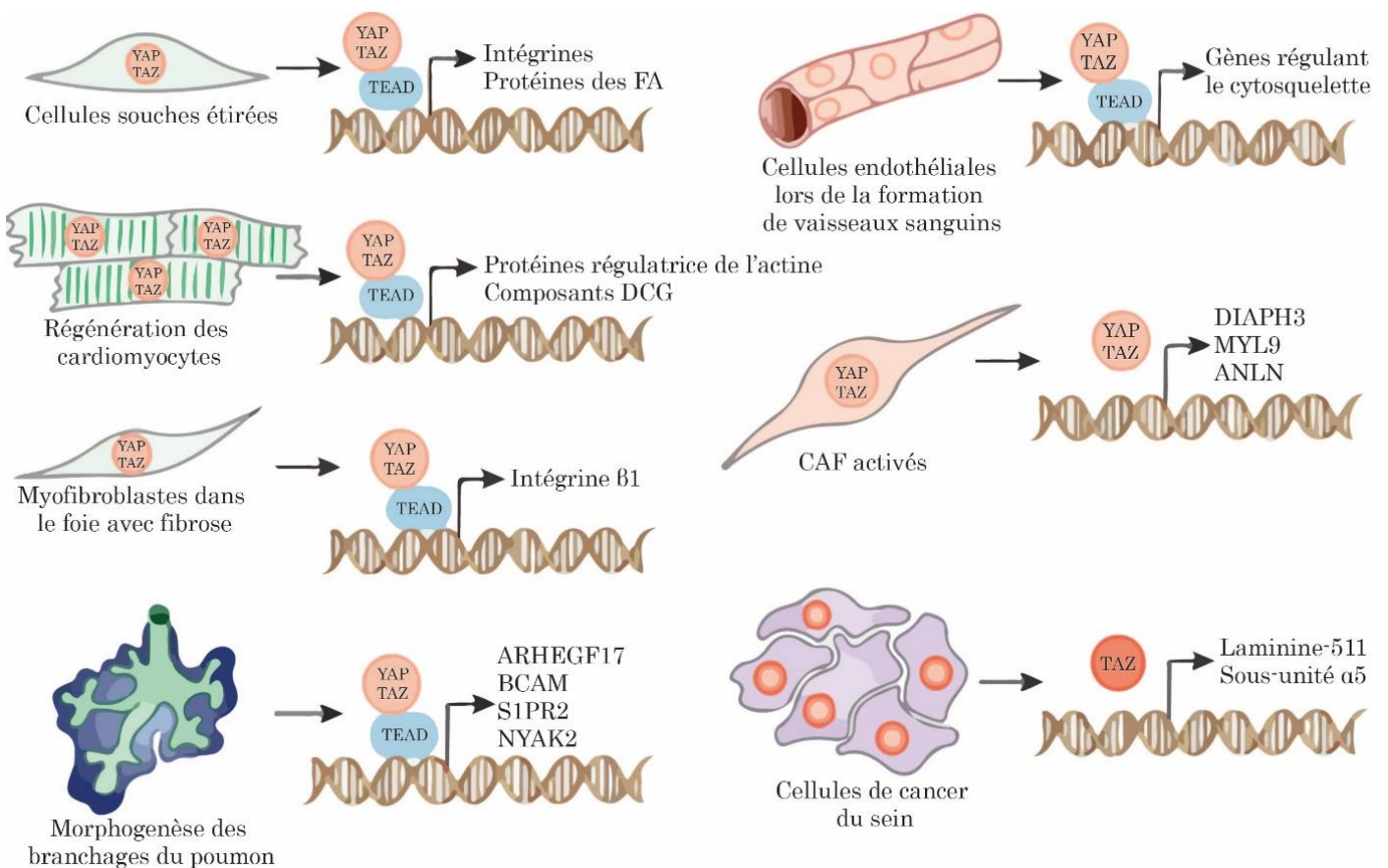


Figure 28 : Exemples de différents gènes cibles de YAP/TAZ selon le type cellulaire

(Totaro et al., 2018)

2. Rôle dans la mécanotransduction

En plus de leur régulation par la voie Hippo, la localisation nucléaire des protéines YAP et TAZ est modulée par la forme des cellules, la rigidité et la topologie de la MEC ou par les contraintes de cisaillements (Panciera et al., 2017) (figure 29).

Dupont et collaborateurs ont été les premiers à montrer que la rigidification de la MEC entraîne la translocation nucléaire des protéines YAP/TAZ et l'activation de leurs gènes cibles de façon indépendante de la voie Hippo (Dupont et al., 2011). Cette activation de YAP/TAZ par la rigidité matricielle se fait par la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'activation de la voie ROCK.

Dans un contexte multicellulaire, une forte densité entraîne une inhibition de la translocation de YAP/TAZ, cependant, la rigidité prend également le dessus sur la voie Hippo et entraîne l'activation de YAP (Aragona et al., 2013).

Les protéines YAP/TAZ peuvent agir comme un réservoir qui stocke les informations mécaniques passées (Yang et al., 2014).

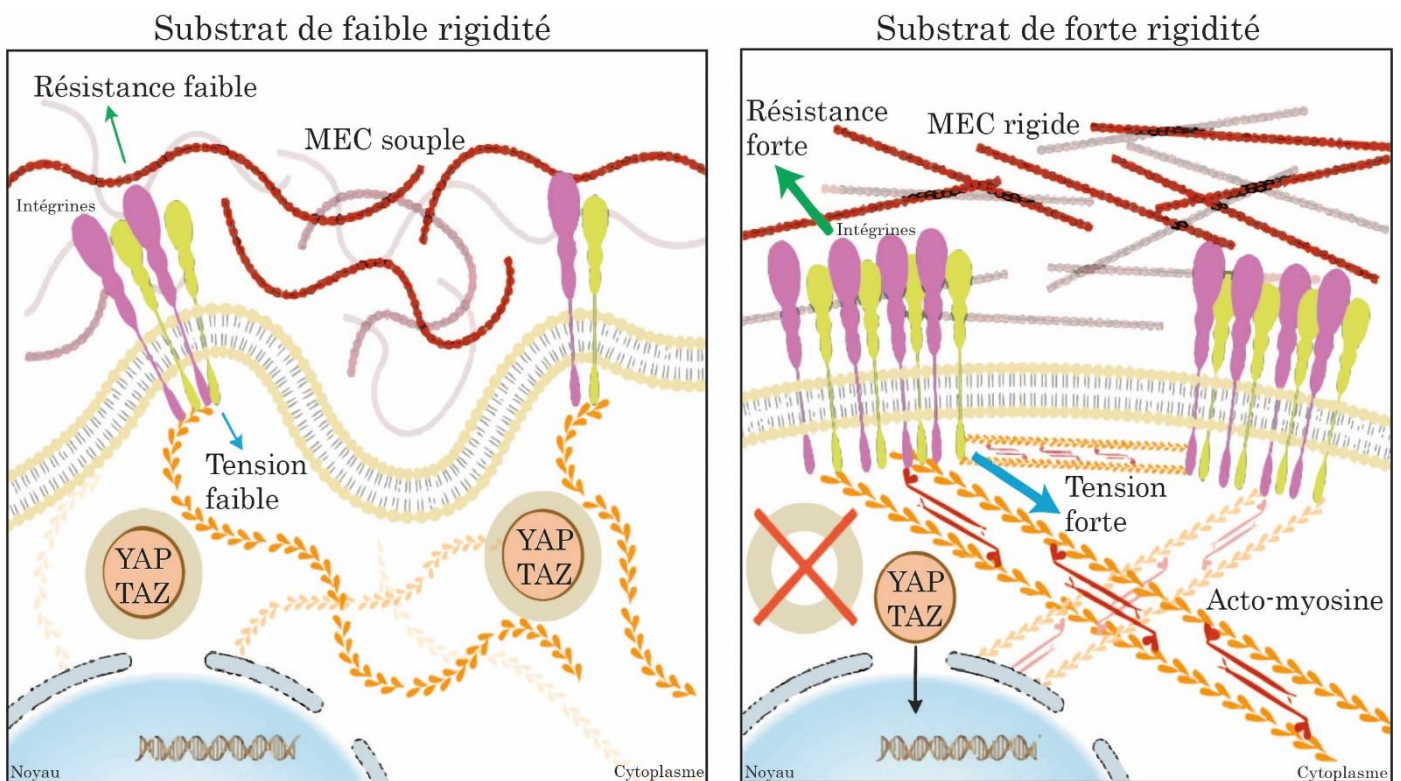


Figure 29 : Activation de YAP par la rigidité matricielle

Les cellules répondent à la rigidité matricielle en modulant leur état de tension via leur adhésion à la MEC par les intégrines. Une faible rigidité matricielle est associée à une faible maturation des adhésions focales, à une faible contractilité du cytosquelette d'actomyosine et à l'inactivation des YAP/TAZ, qui reste séquestrer dans le cytoplasme. Sur un substrat plus rigide, les intégrines s'assemblent et la tension intracellulaire du cytosquelette d'actomyosine, permet la localisation nucléaire de YAP/TAZ et son activation.

Adapté de (Totaro et al., 2018)

3. Rôle dans les cancers

Une augmentation de la localisation nucléaire de YAP et parfois TAZ a été rapportée dans la majorité des cancers solides suggérant une dérégulation répandue de la voie Hippo dans les néoplasies (Harvey et al., 2013; Overholtzer et al., 2006). Dans la peau, le foie ou le colon, des modèles murins montrent qu'une inhibition de la voie Hippo ou une surexpression de YAP sont suffisantes pour promouvoir la formation de tumeurs (Overholtzer et al., 2006; Zhou et al., 2009; Zhou et al., 2011).

Les protéines YAP/TAZ inhibent l'apoptose dans de nombreux cancers comme le cancer gastrique, le cancer du rein ou le rhabdomyosarcome (Cao et al., 2014; LeBlanc et al., 2021; Slemmons et al., 2015; Yan et al., 2018).

La voie YAP régule la prolifération cellulaire, dans le mélanome, en induisant l'expression de MITF, lorsqu'il se lie au facteur de transcription PAX3, et donc la transition vers un phénotype différencié de type mélanocytaire. A l'inverse, en présence de TGF β , YAP va se lier au facteur de transcription TEAD et permettre la dédifférenciation des cellules vers un phénotype invasif (Miskolczi et al., 2018). YAP et TAZ contrôlent également la prolifération cellulaire par leur action sur le métabolisme, en régulant notamment, la glycolyse, la lipogenèse et la glutaminolyse (Koo and Guan, 2018).

La perte de polarité, une des caractéristiques de l'EMT, entraîne l'activation de YAP/TAZ, qui engage une boucle de rétrocontrôle positive dans laquelle YAP/TAZ promeuvent l'EMT et la perte de polarité, maintenant son activité (Cordenonsi et al., 2011). Dans le mélanome, les protéines YAP et TAZ contrôlent l'invasion et les capacités métastatiques des cellules via CTGF (Nallet-Staub et al., 2014). YAP et TAZ participent également à la résistance thérapeutique. L'activation de YAP/TAZ est connue pour entraîner l'augmentation de la survie cellulaire et la suppression de l'apoptose (Udan et al., 2003); (Dong et al., 2007). Il a été montré également que les gènes cibles de YAP/TAZ, CTGF et CYR61, inhibent l'apoptose dans les cellules de cancer du foie (Juric et al., 2009; Urtasun et al., 2011) et sont aussi responsables de la résistance aux taxols dans le cancer du sein (Lai et al., 2011). YAP peut également induire la résistance aux thérapies ciblées en réactivant la voie MAPK dans les cellules de mélanome (Lin et al., 2015b); (Fisher et al., 2017; Girard et al., 2020 ; Kim et al., 2016b; Lecacheur et al., 2020; Misek et al., 2021) (*Article 1*). De plus, son activation est augmentée en réponse aux thérapies ciblées via le cluster de miR-143/-145 pour promouvoir la résistance des cellules de mélanome (Diazzi et al., 2021) (*Annexe III*). De plus, YAP fait partie des gènes qui ont été identifiés dans le mélanome comme régissant la résistance non génétique acquise aux thérapies ciblées (Hugo et al., 2015)). Ces gènes sont régulés de façon épigénétique par méthylation sur leurs sites CpG.

YAP participe également à la résistance aux immunothérapies à la fois dans les cellules tumorales et dans les cellules immunitaires. Dans les cellules tumorales, YAP induit une augmentation de l'expression de PD-L1 dans des cancers tels que le mélanome, les cancers du poumon, diminuant la sensibilité des cellules aux effets cytotoxiques des lymphocytes T CD8⁺. (Kim et al., 2018a).

Un des mécanismes de résistance aux immunothérapies est l'IFN γ . Une étude récente du Dr Sun a montré que l'IFN γ entraîne la localisation nucléaire et ponctiforme de YAP après un traitement avec l'anti-PD-1. Plus particulièrement YAP est localisé dans les régions euchromatique pour activer la transcription (Yu et al., 2021).

YAP et TAZ sont exprimées dans les lymphocytes Treg et les lymphocytes B, notamment, et sont impliquées dans leur moindre activation, atténuant ainsi la réponse immunitaire antitumorale. Une analyse clinique a ainsi montré que les patients présentant un faible taux d'expression de YAP dans leur tumeur avait un meilleur taux de survie à 5 ans (Ni et al., 2018; Pan et al., 2019).

Dans le cancer du poumon, une étude récente a montré que YAP et TAZ ont des rôles complémentaires dans la progression tumorale. YAP régule les gènes associés à la division et progression dans le cycle cellulaire tandis que TAZ régule les gènes contrôlant l'organisation de la MEC et la migration cellulaire. De plus, seule YAP contrôle la sensibilité aux traitements dans ce cancer (Shreberk-Shaked et al., 2020).

Bien que YAP soit très souvent décrit comme un oncogène, il peut aussi agir comme suppresseur de tumeur via sa fonction pro-apoptotique. YAP se lie à p73 et entraîne une augmentation de l'expression de BAX (Basu et al., 2003). De même, TAZ peut agir comme un suppresseur de tumeur. Par exemple, dans le myélome multiple, le promoteur de *WWTR1* est hyperméthylé et donc inactif. La réexpression de TAZ active l'apoptose dans les cellules cancéreuses via la répression de MYC et de ses cibles (Grieve et al., 2019). YAP et TAZ ont été récemment décrit comme régulant la ferroptose, un programme de mort cellulaire non apoptotique dépendant du fer. YAP régule la ferroptose dans le cancer du côlon via les modulateurs de la ferroptose ACSL4 et TFRC (Wu et al., 2019). TAZ, quant à lui, contrôle la ferroptose dans le cancer du rein, en augmentant l'expression de EPM1 (Epithelial Membrane Protein A), qui induit l'expression de NOX4 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) Oxidase 4), une espèce réactive de l'oxygène essentielle à la ferroptose (Yang et al., 2019).

Dans les CAF, YAP est nécessaire pour promouvoir la contractilité et la rigidité matricielle, l'invasion des cellules cancéreuses et l'angiogenèse. En retour, une matrice rigide augmente l'activation de YAP établissant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive (Calvo et al., 2013). De plus, une étude récente du laboratoire a également montré le rôle de YAP dans la contractilité d'un type de fibroblastes ganglionnaires, les FRC (fibroblast reticular cell) modifiant ainsi leurs capacités à réguler la taille du ganglion lymphatique, le rendant plus permissif à l'arrivée des cellules de mélanome pour l'établissement des premières métastases (Rovera et al., 2021) (*Annexe IV*). De plus, l'équipe du Dr Treisman a montré dans une étude récente que les voies YAP-TEAD et MRTF-SRF interagissent de façon indirecte pour accroître les propriétés contractiles et pro-invasives des CAF (Foster et al., 2017).

d) Le cofacteur transcriptionnel MRTF

1. Rôle physiologique

MRTF-A et B (myocardin related transcription factor) appelés également MKL1 et 2 (megakaryoblastic leukemia 1 et 2) ou MAL et MAL16, sont des cofacteurs de transcription de la famille des myocardines. Ces cofacteurs se lient au facteur de transcription SRF (serum response factor) pour stimuler son activité transcriptionnelle (Wang et al., 2002). MRTF-A et B sont exprimés de façon ubiquitaire dans différents types de cellules, des cellules embryonnaires aux cellules adultes. Ils sont retrouvés exprimés de façon abondante dans différents organes comme le cœur, le foie, les poumons, les reins, les muscles squelettique, la rate et le cerveau. Dans la suite de ce manuscrit, l'acronyme MRTF sera utilisé pour parler indistinctement de MRTF-A et MRTF-B.

L'activité transcriptionnelle de MRTF et donc sa localisation subcellulaire est régulée par la voie Rho-Actine. MRTF est un cofacteur transmettant les tensions de l'actine à SRF (Miralles et al., 2003). Dans les cellules quiescentes, MRTF s'associe à l'actine G monomérique et séquestré dans le cytoplasme. Ce complexe ne peut pas entrer dans le noyau (figure 30). La polymérisation de l'actine entraîne la dissociation de ce complexe et permet la translocation nucléaire de MRTF. En effet, la dissociation entre MRTF et l'actine G révèle un motif de localisation nucléaire nécessaire à l'import de MRTF via l'importine α/β (Pawlowski et al., 2010). MRTF est localisé majoritairement dans le cytoplasme de cellules en l'absence de sérum mais est rapidement transporté dans le noyau après une stimulation avec du sérum (Esnault et al., 2014). La rétention de MRTF dans le cytoplasme peut aussi être facilitée par une phosphorylation par ERK1/2 qui entraîne une inactivation de la voie MRTF/SRF (Muehlich et al., 2008).

Les rôles de MRTF-A et B sont multiples car ils sont d'importants régulateurs du développement et de processus physiologiques normaux. MRTF est requis dans les muscles squelettiques pour réguler l'organisation des sarcomères, la survie des myoblastes et la formation de myotubes intacts (Cenik et al., 2016). Il est essentiel au développement cardiaque et à ses fonctions (Mokalled et al., 2010) ou à la cicatrisation et la diminution de l'inflammation à la suite d'une blessure (Velasquez et al., 2013). MRTF régule la maturation des mégacaryocytes et la formation des plaquettes (Smith et al., 2012) et contrôle les fonctions physiologiques des cellules immunitaires de lignées lymphoïdes et myéloïdes (Record et al., 2015). MRTF joue également un rôle dans l'activité des myofibroblastes lors de la fibrose (Diazi et al., 2020; Shiwen et al., 2015; Sisson et al., 2015).

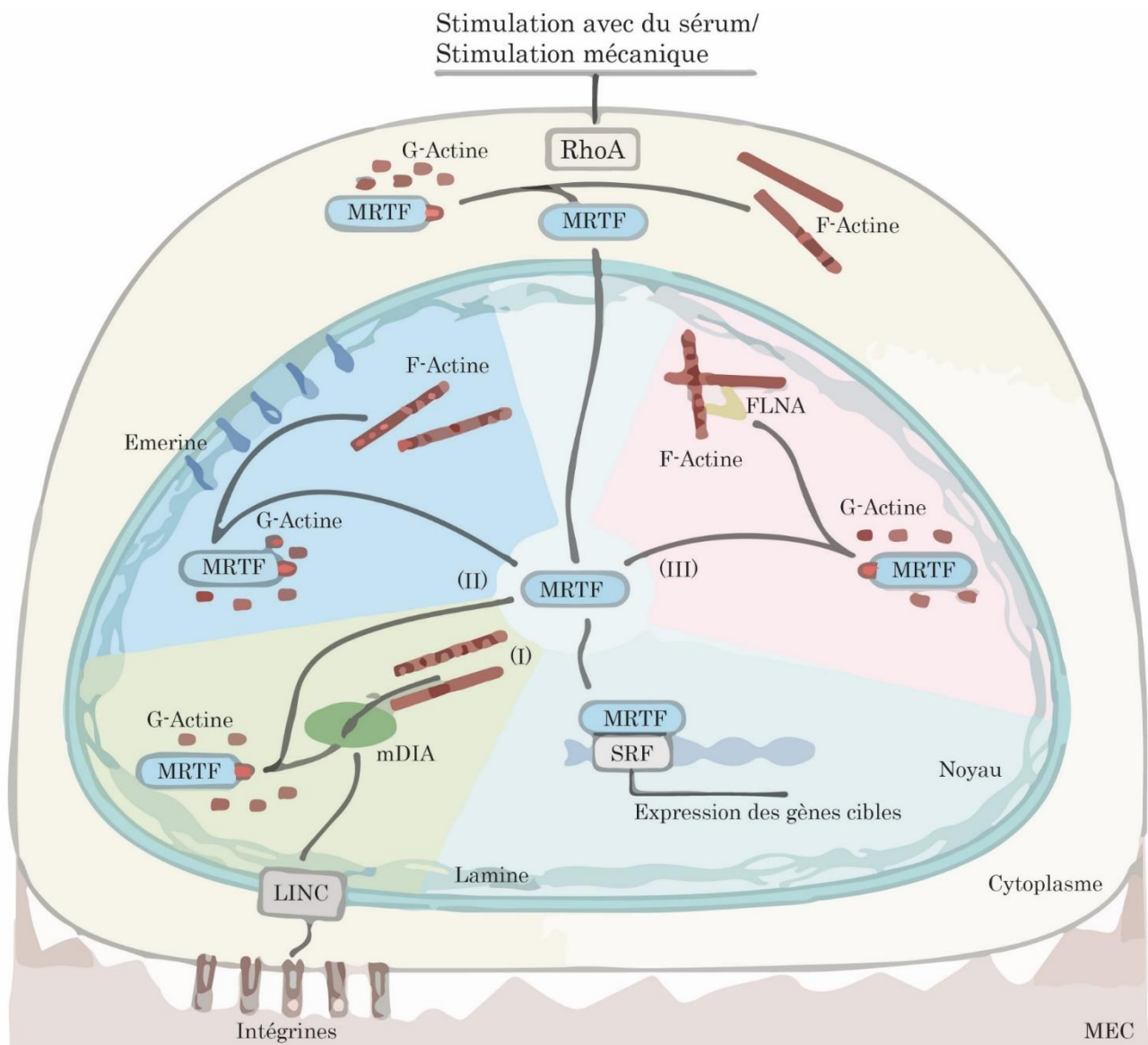


Figure 30 : Activation de MRTF

La régulation de MRTF se fait par la polymérisation de l'actine et la stabilisation de ses filaments. La séparation de complexe MRTF/G-actine peut se faire soit au niveau cytoplasmique via l'activité de RhoA, soit au niveau nucléaire via 3 mécanismes :

(I) Le complexe LINC régule la signalisation induite par l'adhérence cellulaire des intégrines à mDIA, une formine nucléaire, favorisant la polymérisation de l'actine.

(II) L'émerine, une protéine de la membrane nucléaire interne, facilite la polymérisation de l'actine nucléaire via un mécanisme non connu.

(III) La filamine A (FLNA) facilite la polymérisation de l'actine nucléaire et relie les filaments au complexe MRTF/SRF.

Tous ces différents mécanismes mènent à la liaison de MRTF au facteur de transcription SRF pour induire la transcription de leurs gènes cibles.

Adapté de (Sidorenko and Vartiainen, 2019)

2. Rôle dans la mécanotransduction

Etant donné son lien et sa régulation par le cytosquelette d'actine, l'activité de MRTF est également contrôlée par les signaux mécaniques provenant du microenvironnement. L'étude réalisée par Somogyi *et al* a été la première à décrire que l'accumulation de MRTF dans le noyau est induite par un étirement de la cellule (Somogyi and Rorth, 2004). Les intégrines, en transmettant les forces mécaniques au cytosquelette d'actine auquel MRTF est lié, favorisent sa translocation nucléaire (Maier et al., 2008). De plus, l'application de forces mécaniques sur des cellules provoque une réorganisation du cytosquelette d'actine et un remodelage de la chromatine induisant une translocation nucléaire de MRTF (Iyer et al., 2012). Certains des gènes cibles de MRTF, tels que *Myh9*, *FLNA*, *SRF* ou *SDPR*, régulent la contraction du cytosquelette activant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive dans les cellules qui produisent des forces sur leur substrat en réponse à des stimuli mécaniques (Foster et al., 2017).

3. Rôle dans les cancers

Le rôle de MRTF dans les cancers a d'abord été décrit dans la leucémie aigüe (Ma et al., 2001). Dans les cancers du sein ou le mélanome, MRTF est requis pour l'invasion tumorale et la formation de métastases. En effet, sa déplétion réduit l'invasion cellulaire et rend les cellules incapables de coloniser les poumons. De plus, son activation, dans des cellules faiblement invasives, augmente leur capacité métastatique (Medjkane et al., 2009). MRTF peut interagir avec YAP (Kim et al., 2017) ou la voie JAK-STAT3 (Liao et al., 2014) pour induire une augmentation de l'invasion cellulaire et des capacités métastatiques dans les cancers du sein. Il peut aussi induire l'EMT et les propriétés invasives des cellules tumorales (Gasparics and Sebe, 2018; O'Connor et al., 2015). Comme YAP, MRTF participe à la résistance des mélanomes aux thérapies ciblées. En effet, MRTF peut induire le switch phénotypique des cellules de mélanome mutés RAC^{P29S} et permet la résistance aux thérapies ciblées (Lionarons et al., 2019). De plus, le ciblage de MRTF permet de restaurer la sensibilité aux thérapies ciblées des cellules résistantes (Girard et al., 2020; Lecacheur et al., 2020; Misek et al., 2020)(*Article 1*). La localisation nucléaire de MRTF peut également être induite en réponse aux thérapies ciblées via le cluster de miR-143/-145 (Girard et al., 2020; Lecacheur et al., 2020)(*Article 1*) (Diazzi et al., 2021) (*Annexe III*).

VI. Rôle de la rigidité de la MEC dans les cancers

Des perturbations de la mécanotransduction dans les cellules peuvent donner lieu à différentes pathologies dont les cancers. De plus, les cancers sont sujets à une dérégulation de la production de MEC. Les tissus tumoraux sont donc plus rigides que les tissus sains. L'altération des propriétés biomécaniques de la MEC est également due à une forte activité des protéines de réticulation et un alignement des fibres de collagène (Chen, 2008; Levental et al., 2009; Lu et al., 2012; Provenzano et al., 2008; Tilghman et al., 2010). Cette MEC plus rigide est associée à une plus forte agressivité tumorale et un mauvais pronostic pour les patients (Lu et al., 2012; Schwartz, 2010). Un stress mécanique peut être un facteur de risque dans le développement de mélanome plantaire (Minagawa et al., 2016). La rigidité matricielle peut également être un facteur induisant la transformation maligne notamment dans le cancer du sein (Panciera et al., 2020).

A. Effet sur la prolifération cellulaire

Des cellules qui interagissent avec une matrice rigide prolifèrent plus en réponse aux facteurs de croissance et expriment des gènes qui régulent positivement la prolifération, via la phosphorylation de la kinase FAK (Bae et al., 2014; Provenzano et al., 2008; Provenzano and Keely, 2011; Wells, 2008). Dans le mélanome, une étude a montré que la rigidité du collagène induit une augmentation de la prolifération via la voie YAP/PAX3/MITF (Miskolczi et al., 2018). La rigidité matricielle favorise la survie et la croissance tumorale en empêchant l'activité des suppresseurs de tumeurs comme la voie p53 (Ingallina et al., 2018; Schrader et al., 2011; Tilghman et al., 2010). Une matrice rigide entraîne l'expression de miR-18a qui diminue l'expression du suppresseur de tumeurs PTEN, augmentant ainsi l'activité de la voie PI3K/AKT pour permettre la survie et la croissance cellulaire, dans le cancer du sein (Mouw et al., 2014b).

B. Conséquence sur l'angiogénèse

Une MEC rigide favorise l'angiogénèse en stimulant la migration des cellules endothéliales et en induisant l'augmentation de l'expression du récepteur VEGFR2 qui contrôle la croissance et la survie des cellules endothéliales (Liu and Agarwal, 2010; Mammoto et al., 2009; Zanotelli and Reinhart-King, 2018). Cependant, une matrice trop rigide peut aussi compromettre l'intégrité vasculaire et activer des MMP qui vont dégrader la MEC et entraîner le relargage de facteurs anti-angiogéniques. La rigidité matricielle peut donc à la fois promouvoir ou inhiber l'angiogénèse.

C. Impact sur la modulation du système immunitaire

Une matrice rigide peut compromettre l'activation des lymphocytes T en empêchant la production d'IL-2 qui est nécessaire pour la prolifération des lymphocytes T et la différenciation en TH1 (lymphocyte T helper) (O'Connor et al., 2012). Une MEC rigide stimule la polarisation M2 des macrophages grâce à l'enrichissement de la MEC rigide en collagène de type I (Wesley et al., 1998) et entraîne la diminution du nombre de macrophages M1 en réponse au LPS (Patel et al., 2012).

D. Conséquence sur l'invasion et la dissémination métastatique

Une matrice rigide augmente le recrutement des intégrines pour former des adhésions focales et favoriser la migration (Levental et al., 2009). L'EMT est stimulée sur une MEC rigide via l'activation de la voie PI3K/AKT (Leight et al., 2012) et la modification de l'expression de facteurs de transcription comme TWIST (Wei et al., 2015b) ou SNAIL (Zhang et al., 2016). Une matrice rigide entraîne l'augmentation de l'expression du récepteur EGFR et du canal calcique Cav1.1 pour permettre l'invasion des cellules de carcinome (Grasset et al., 2018) (Annexe I).

La rigidité matricielle favorise la dissémination et la croissance métastatique du mélanome notamment, comme cela a été montré dans l'étude de Li et collègues. Dans cette étude, ils ont comparé des cellules à faible ou fort potentiel métastatique et ont montré que la rigidité matricielle augmente la croissance et la migration des cellules faiblement métastatiques (Li et al., 2019b). Toujours dans le mélanome, un modèle prédictif liant la rigidité matricielle et l'invasion cellulaire a été établi et confirmé *in vitro* sur des hydrogels avec différentes concentrations de collagène. Ce modèle montre que l'invasion cellulaire est biphasique avec une augmentation de l'invasion jusqu'à une rigidité induisant une invasion optimale. Quand la rigidité dépasse cette valeur optimale, l'invasion diminue, jusqu'à ce que les cellules ne soient plus capables d'envahir (Ahmadzadeh et al., 2017). Cela peut s'expliquer notamment par la densité de substrat qui augmente avec la rigidité du substrat et empêche ainsi l'invasion des cellules tumorales.

Dans le cas du cancer des ovaires, les cellules métastatiques adhèrent préférentiellement à un support souple et y acquièrent un phénotype plus agressif. Ces cellules possèdent des propriétés contractiles plus importantes et subissent un changement de morphologie caractéristique de l'EMT qui va favoriser la migration cellulaire. Ces effets sont contrôlés par la voie Rho/ROCK (McGrail et al., 2014).

E. Impact sur la résistance thérapeutique

Avant d'être liée à l'adhérence et la réponse des cellules à un support rigide, une MEC rigide et donc plus dense peut favoriser la résistance aux traitements en limitant l'accès des traitements à la tumeur (Broders-Bondon et al., 2018). La résistance conférée par la rigidité de la MEC peut être due à une induction de l'EMT, caractérisée par une résistance aux traitements (Brabletz et al., 2018).

L'hypoxie peut être induite par les forces mécaniques de la pression interstitielle. En effet, des pressions importantes favorisent la progression tumorale en altérant la fonction des vaisseaux limitant ainsi l'apport en oxygène et en nutriments. Des tumeurs hypoxiques sont plus résistantes aux thérapies anti-cancéreuses telles que la radiothérapie, les chimiothérapies ou les thérapies ciblées (Broders-Bondon et al., 2018; Karakashev and Reginato, 2015).

La résistance thérapeutique peut également être favorisée par les forces compressives présentes dans les tumeurs. C'est notamment le cas dans le cancer du pancréas où il a été montré que l'augmentation des forces compressives, dans un modèle de sphéroïdes, diminue l'efficacité des agents chimio-thérapeutiques. Cela est dû à une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses en réponse au stress mécanique, empêchant ainsi la chimiothérapie d'être efficace (Rizzuti et al., 2020).

Le rôle de la rigidité matricielle dans la résistance aux traitements a été majoritairement étudiée pour les chimiothérapies. La résistance aux chimiothérapies est augmentée avec la rigidité matricielle via l'activation de YAP dans les cellules de cancer du sein triple négatif, comparé aux autres types de cancer du sein. (Joyce et al., 2018). D'autres études ont confirmé que la résistance aux chimiothérapies ou thérapies ciblées dans le cancer du sein est due à l'activation de la voie YAP/TAZ par la rigidité matricielle (Lin et al., 2015a; Qin et al., 2020). La résistance aux chimiothérapies conférée par la rigidité matricielle a également été étudiée dans d'autres cancers comme le cancer du pancréas (Rice et al., 2017) ou du foie (Schrader et al., 2011), dans lesquels la fibrose est très importante et est associée à une rigidité importante de la tumeur. Dans le mélanome, l'étude de Tokuda et *al.* a montré, à l'aide d'hydrogels de PEG, que la rigidité matricielle augmente la résistance au Vémurafénib (Tokuda et al., 2014).

VII. Ciblage des principaux acteurs de la mécanotransduction

Le ciblage de la mécanotransduction peut se faire par 2 approches distinctes (Diazz et al., 2020; Lampi and Reinhart-King, 2018). La première approche consiste à cibler la rigidification de la MEC en elle-même, en inhibant soit la production et le remodelage de la MEC par les CAF soit en empêchant la conversion des fibroblastes en CAF soit en ciblant les enzymes responsables de la réticulation du collagène et donc de la rigidité comme les LOX et LOXL. La deuxième stratégie concerne l'inhibition des voies de signalisation activées dans les cellules tumorales en réponses aux signaux mécaniques qui ont été détaillées précédemment dans ce chapitre. Les différentes approches regroupant les deux stratégies sont résumées dans la figure 31.

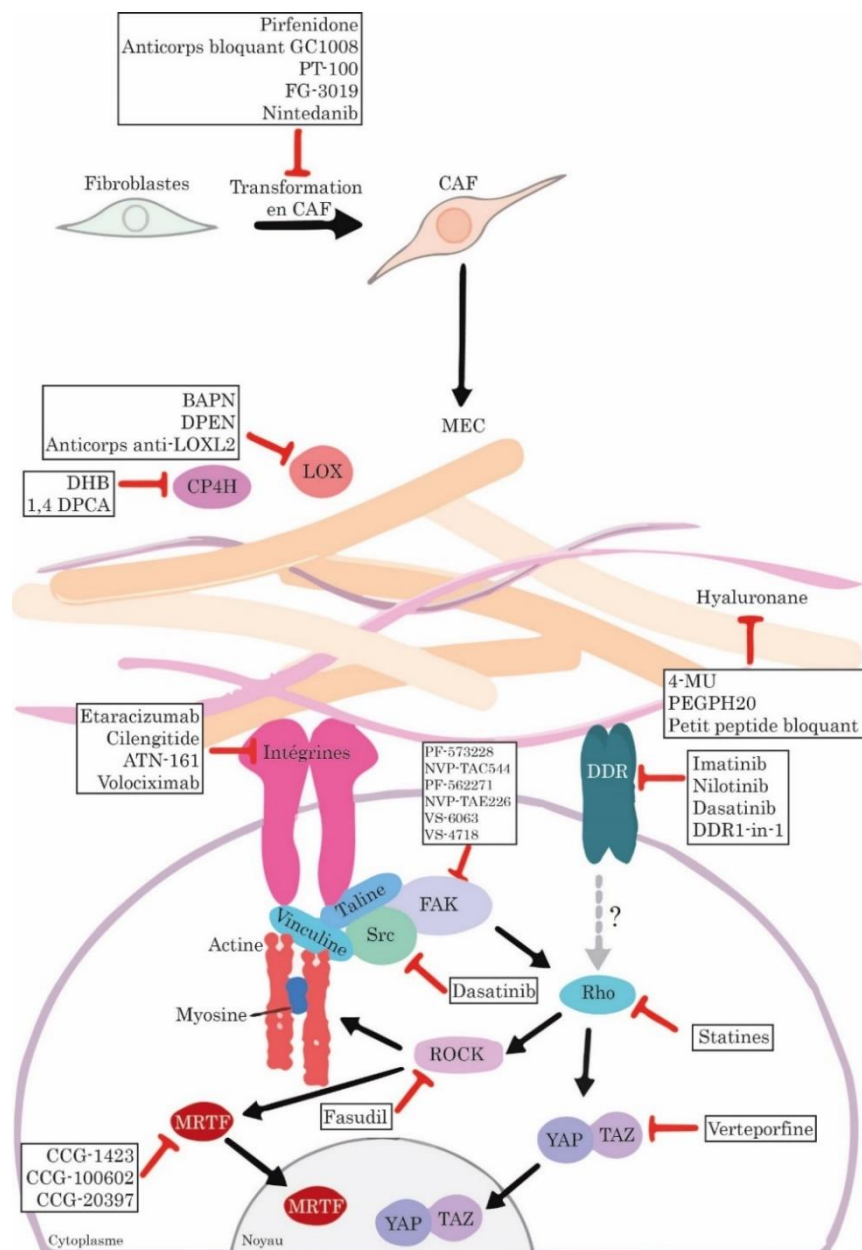


Figure 31 : Ciblage des voies de la mécanotransduction

Adapté de (Majeski and Yang, 2016)

A. Ciblage de la MEC

a) Inhibition de la transformation des fibroblastes en CAF

Une des causes principales de l'augmentation de la rigidité matricielle pendant la progression des cancers est la dérégulation de la synthèse et du remodelage matriciel par les fibroblastes activés et dédifférenciés en CAF. Cibler les CAF ou leur différenciation pourrait avoir un potentiel clinique pour atténuer la fibrose. Or il est difficile de cibler les CAF car, comme précisé dans le *chapitre 1*, ils représentent une population hétérogène caractérisée par un ensemble de marqueurs différents. Une étude préclinique, dans un modèle de fibrose du foie, a montré que l'utilisation d'un anticorps monoclonal C1-3 se fixant sur la synaptophysine, une protéine transmembranaire exprimée par les myofibroblastes hépatiques, induit l'apoptose des cellules quand il est conjugué à la gliotoxine, une toxine fongique (Douglass et al., 2008). La contraction des CAF peut être inhibée en utilisant un peptide synthétique bloquant α -SMA (Hinz et al., 2002). La conversion de fibroblaste en CAF peut être empêchée par certains miARN, comme *miR-29*. La molécule MRG-201, mimant l'activité du miR-29, a récemment été utilisée dans une étude clinique de phase I en tant que traitement anti-fibrotique (Gallant-Behm et al., 2019; O'Reilly, 2016).

Le TGF β est un facteur de croissance important dans la transition des fibroblastes en CAF (Cf. *Chapitre 1*). Le ciblage du TGF β est très étudié dans le cadre des maladies fibrotiques et les cancers (Akhurst, 2017). Le ciblage du TGF β se fait par différentes approches telles que l'inhibition de l'interaction entre le ligand et son récepteur, l'inhibition de l'activité sérine/thréonine kinase du récepteur par l'utilisation de peptides synthétiques, d'oligonucléotides, de petites molécules inhibitrices ou d'anticorps bloquants monoclonaux (Akhurst, 2017; Colak and Ten Dijke, 2017). Le ciblage du TGF β par la petite protéine inhibitrice Pirfenidone (Selvaggio and Noble, 2016) a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour traiter la fibrose pulmonaire idiopathique. Tandis que l'utilisation d'un anticorps monoclonal contre le TGF β est actuellement en phase 2 pour le cancer du sein, le cancer du poumon ou la sclérose glomérulaire segmentaire focale (une maladie fibrotique du rein) (Lampi and Reinhart-King, 2018; Morris et al., 2014).

La conversion de fibroblastes en CAF fait également intervenir la voie JAK/STAT par l'action de la cytokine LIF. Cette voie contrôle les propriétés contractiles et le remodelage matriciel des CAF, permettant l'invasion collective des cellules de carcinome. L'utilisation du Ruxolutinib, un inhibiteur de JAK, permet d'empêcher la conversion des fibroblastes en CAF et inhibe donc l'invasion des cellules cancéreuses (Albregues et al., 2014a).

Une étude récente du laboratoire montre l'implication de FAP α dans l'activité myofibroblastique des CAF de type CAF-S1 dans le mélanome. L'utilisation d'un inhibiteur de l'activité enzymatique de FAP α , le PT-100, réduit leur capacité contractile et de production de fibres alignées de MEC (Thèse de Ana Popovic, 2021). L'inhibition des CAF par cet inhibiteur permet d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie dans un modèle murin de cancer du côlon (Li et al., 2016). L'utilisation de cet inhibiteur pourrait être prometteur et fait l'objet d'un essai clinique de phase I (Nemunaitis et al., 2006).

D'autres facteurs de croissance pourraient être ciblés pour empêcher la formation des CAF comme le CTGF, le PDGF ou le VEGF. L'inhibiteur du CTGF, le FG-3019 est en phase d'essai clinique 1 et 2 dans la fibrose pulmonaire idiopathique (Raghu et al., 2016). Le Nintedanib, un inhibiteur des récepteurs VEGFR, FGFR et PDGFR, utilisé dans le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique, pourrait être repositionnée pour d'autres pathologies comme certains cancers via son activation d'inhibition des CAF et/ou des cellules cancéreuses (Diazzi et al., 2021; McCormack, 2015)(*Annexe III*).

b) Inhibition de la réticulation du collagène et de sa synthèse

Un moyen efficace de cibler la rigidité matricielle est d'inhiber l'activité des enzymes de réticulation du collagène telles que les LOX et LOXL (Barker et al., 2012). Des essais précliniques utilisant le BAPN (β -aminopropionitrile), un inhibiteur de LOX, ou des anticorps bloquants anti-LOX permettent de supprimer les métastases au foie ou aux poumons dans des modèles de xénogreffes ou de souris transgéniques dans les cancers du sein ou gastrique (Barker et al., 2011; Peng et al., 2009). Des essais cliniques ont montré un effet mitigé de ces deux approches (Benson et al., 2017; Keiser and Sjoerdsma, 1967). Des approches permettant de cibler LOXL2 comme l'inhibiteur DPEN (diphényléthylènediamine) ou des anticorps monoclonaux bloquants anti-LOXL2 permettent une réduction de la tumeur primaire dans des études précliniques de cancer du sein et de cancer gastrique (Barker et al., 2011; Moreno-Bueno et al., 2011; Peng et al., 2009). L'anticorps anti-LOXL2 AB0024 a été proposé dans un essai clinique de phase 1 dans le cancer du sein (Barker et al., 2012). Un autre essai de phase 2 a été réalisé avec un anticorps bloquant LOXL2 combiné à la Gemcitabine, en traitement du cancer du pancréas (Barry-Hamilton et al., 2010). Même si les études initiales ne montrent pas de résultat prometteur dans un stade tardif du cancer, une étude additionnelle de Miller *et al.*, montre que cette combinaison thérapeutique est plus efficace lorsqu'elle est administrée plus précocement (Miller et al., 2015).

Des efforts ont également été concentrés sur l'inhibition de la synthèse du collagène en ciblant la prolyl-4-hydroxylase (CP4H), l'enzyme qui convertit la proline en hydroxyproline dans le collagène. Son inhibition, dans des modèles précliniques de cancer du sein, permet de diminuer les métastases pulmonaires (Gilkes et al., 2013; Xiong et al., 2014).

c) Inhibition de l'hyaluronane

L'hyaluronane, ou acide hyaluronique, (HA) est un composant de la MEC qui joue un rôle important dans les cancers (Spinelli et al., 2020) (cf. *Chapitre 1*). Son ciblage se fait par l'inhibition de sa synthèse ou de sa liaison avec son récepteur. Le 4-MU, un inhibiteur de la synthèse du HA, a des effets antitumoraux dans des modèles précliniques de cancer de la prostate (Lokeshwar et al., 2010).

De la même façon, un petit peptide bloquant la liaison du HA à son récepteur entraîne une diminution de la croissance de tumeurs du cancer du sein, du poumon, d'ostéosarcome et de mélanome dans des études précliniques (Evanko and Vogel, 1990; Urakawa et al., 2012a; Urakawa et al., 2012b). Le PEGPH20, une enzyme dégradant le HA, a été développée et utilisée dans un modèle murin de cancer du pancréas, en combinaison avec la Gemcitabine. Cette combinaison permet l'augmentation de la perméabilisation des macromolécules et ainsi une meilleure efficacité de la chimiothérapie, se traduisant par une inhibition de la croissance tumorale et le prolongement de la survie des souris (Jacobetz et al., 2013). Un essai clinique de phase 3, pour des patients atteints de cancer du pancréas au stade métastatique, a été effectué avec le PEGPH20 en combinaison avec la Gemcitabine et a montré une meilleure efficacité comparée au Gemcitabine seul (survie sans progression de 8 mois contre 5,3 mois) (Wang et al., 2021). Ces résultats suggèrent que le ciblage de l'hyaluronane pourrait être envisagé pour altérer les propriétés mécaniques des tumeurs et donc impacter sur le développement tumoral et sa progression (Majeski and Yang, 2016).

B. Ciblage des voies de la mécanotransduction

Les cellules répondent aux signaux biochimiques et mécaniques de la MEC et activent en réponse des voies de signalisation pour modifier leurs fonctions biologiques, entraînant la transformation de cellules saines en cellules malignes ou stimulant le développement tumoral. Cibler ces différentes voies pourrait constituer une approche prometteuse dans la prise en charge de différents cancers.

a) Voie des intégrines/FAK

Le ciblage des intégrines a commencé dans les années 80 avec l'étude de Humphries *et al*, dans laquelle des peptides RGD, motifs de liaison des intégrines, ont été utilisés pour bloquer un large spectre d'intégrines. Cette approche a permis de réduire l'invasion cellulaire et la formation de métastases dans un modèle murin de mélanome (Humphries et al., 1986). L'Etaracizumab, un anticorps bloquant $\alpha 5\beta 3$, a été développé pour le traitement de cancers solides. Ce traitement n'apporte pas de bénéfices par rapport aux chimiothérapies (Delbaldo et al., 2008; Hersey et al., 2010; McNeel et al., 2005). Il en a été de même pour le Cilengitide, un peptide bloquant les intégrines $\alpha 5\beta 3$ et $\alpha 5\beta 5$ dans les vaisseaux sanguins pour bloquer l'angiogenèse, qui n'a montré aucun bénéfice pour les patients atteints de glioblastome par rapport aux traitements existants (Desgrosellier and Cheresch, 2010; Reardon et al., 2008).

La faible efficacité du ciblage des intégrines peut être due au nombre important de couples d'intégrines existants dans les cellules qui peuvent prendre le relais pour activer la voie de signalisation et la kinase FAK en aval. Cette voie peut être ciblée de façon alternative en ciblant la kinase FAK, ou les kinases formant les adhésions focales. Les différents inhibiteurs de FAK (PF-573228, NVP-TAC544, PF-562271, NVP-TAE226, VS-6063, VS-4718) sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP qui empêchent son activité kinase. Différentes études précliniques ont montré l'efficacité de ces inhibiteurs dans la régression tumorale et l'inhibition de la formation de métastases (Stokes et al., 2011). Une étude préclinique de xénogreffes de tumeurs dérivées de patients atteints de mélanome a montré que l'utilisation des inhibiteurs de FAK (PF-562271 ou VS-6063) en combinaison avec la combothérapie Dabrafénib (inhibiteur de BRAF muté) et Tramétinib (inhibiteur de MEK), utilisée en clinique pour le mélanome, élimine la population « cellule souche de la crête neurale » responsable de la résistance non génétique et retarde les rechutes (Marin-Bejar et al., 2021). Ces inhibiteurs ont également passé avec succès des essais de phase 1 (Infante et al., 2012; Jiang et al., 2016; Schultze and Fiedler, 2010). Parmi ces différents inhibiteurs, le VS-6063 vient de compléter un essai de phase 2 dans le cancer du poumon muté KRAS (Gerber et al., 2020). Les inhibiteurs de FAK semblent donc prometteurs comme agents thérapeutiques dans différents cancers solides.

La kinase SRC est une autre kinase constituant les adhésions focales pour laquelle un inhibiteur, le Dasatinib, a été développé. Le Dasatinib est passé en essai clinique de phase 2 mais n'a donné que de modestes effets dans les cancers du sein, de la prostate et le mélanome (Mayer et al., 2011). Il possède tout de même une AMM pour la LMC. Une étude préclinique a montré que le Dasatinib potentialise l'effet antitumoral d'un inhibiteur de MEK, le Tramétinib. L'utilisation du Dasatinib en combinaison avec le Tramétinib pourrait être une stratégie thérapeutique envisageable dans le cas de cancers mutés dans la voie MAPK ERK (Rao et al., 2018).

b) Voie des Récepteurs à Domaine Discoïdine

Comme ils possèdent une activité tyrosine kinase, les récepteurs DDR peuvent être ciblés par des petites molécules inhibitrices. Différentes molécules ont été identifiées comme inhibiteurs des DDR comme l'Imatinib (Glivec®, STI571), le Nilotinib (Tasigna®, AMN107) et le Dasatinib (Sprycell®, BMS-354825) qui sont actuellement utilisés en clinique pour la leucémie myéloïde chronique (Hantschel et al., 2008). Ce sont des inhibiteurs de plusieurs tyrosine kinases comme BCR-ABL (Breakpoint Cluster Region – Abelson kinase), PDGFR, KIT et les kinases de la famille des SRC pour le Dasatinib. L'Imatinib est également utilisé en clinique pour 2 cancers solides : les GIST (Gastro intestinal Stroma Tumor) et le dermatofibrosarcome qui sont tous les deux des tumeurs mésenchymateuses, associées à un fort dépôt de collagène. Il est intéressant de noter que DDR2 est surexprimé dans les fibroblastes responsables des fibrosarcomes (Saby et al., 2016). Des études précliniques ont montré que l'Imatinib pouvait prévenir l'apparition de certaines fibroses comme la sclérose systémique cutanée diffuse (Distler et al., 2007).

L'Imatinib a donc passé un essai clinique de phase 2 pour cette pathologie et s'est avéré efficace, en diminuant l'épaisseur de la peau et en améliorant sa morphologie (Spiera et al., 2011). Dans le mélanome, une étude récente de notre laboratoire a montré que l'Imatinib en combinaison avec les thérapies ciblées dans le mélanome améliore leur efficacité par son action sur les DDR (Berestjuk et al., 2019).

Bien que ces inhibiteurs ciblent efficacement l'activité kinase des DDR, ils ne sont pas suffisamment spécifiques des DDR donc d'autres molécules plus sélectives ont été identifiées ou créées, mais ne possèdent pas d'AMM. Par exemple, les inhibiteurs DDR1-in-1 et DDR1-in-2 sont des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase plus sélectifs. Le rôle anti-cancéreux de DDR1-in-1 a été montré dans un modèle pré-clinique de mélanome (Grither and Longmore, 2018). Les DDR sont donc une cible prometteuse pour le mélanome ainsi que d'autres cancers solides.

c) Voie des Rho GTPase/ROCK

La voie des Rho GTPase/ROCK associée au cytosquelette d'actine est une voie importante dans la transmission des forces mécaniques au sein de la cellule. Le Fasudil, un inhibiteur de ROCK, inhibe la progression tumorale dans des modèles murins de cancer du poumon ou de glioblastome (Deng et al., 2010; Yang et al., 2012; Ying et al., 2006). L'activité de la GTPase Rho peut également être inhibée par les statines qui ciblent la voie mévalonate, une voie métabolique importante régulant les modifications post-traductionnelles de Rho et sa localisation à la membrane plasmique. Les essais cliniques menés avec les statines ont présenté trop d'effets secondaires chez les patients incluant des problèmes cardiaques ou une augmentation de la rigidité matricielle entraînant une accélération de la progression des cancers du sein ou de la prostate notamment (Pisanti et al., 2014). Ces résultats ont empêché les statines d'être proposées comme traitements anti-cancéreux.

Les inhibiteurs de ROCK, H1152 et AT13148, ont été utilisés dans le mélanome et ont permis d'inhiber la résistance aux thérapies ciblées et aux immunothérapies (Orgaz et al., 2020). Aucun de ces inhibiteurs ne possède d'AMM. En revanche, l'inhibiteur de ROCK, le Netarsudil, possède une AMM pour le glaucome. Il serait donc intéressant de comparer l'effet de cet inhibiteur aux autres inhibiteurs de ROCK et éventuellement de proposer ces traitements en combinaison avec les traitements actuels dans le mélanome.

d) Voie YAP/TAZ

L'activation de YAP/TAZ par la rigidité matricielle contribue à la transformation des fibroblastes en CAF, à l'augmentation du dépôt de collagène dans la MEC et à la prolifération cellulaire en alimentant des boucles de rétrocontrôles positifs qui augmentent la rigidité matricielle (Calvo et al., 2013; Liu et al., 2015).

Etant donné l'absence de site catalytique, il est difficile d'avoir des inhibiteurs de YAP/TAZ très spécifiques de ces protéines. De façon générale, les inhibiteurs de YAP/TAZ sont classés en trois catégories. La première catégorie interfère sur les voies en amont de YAP en inhibant les récepteurs à la membrane plasmique, ou alors au niveau cytoplasmique pour favoriser sa dégradation ou au niveau du cytosquelette. La 2^{ème} catégorie d'inhibiteurs empêche l'interaction entre YAP/TAZ et TEAD. Enfin, la 3^{ème} catégorie cible l'activité des protéines cibles de YAP/TAZ (Pobbati and Hong, 2020).

Une inhibition directe de l'activité de YAP/TAZ est possible grâce à une petite molécule inhibitrice, la Vertéporfine, qui empêche la liaison entre YAP/TAZ et leur facteur de transcription TEAD. Cette molécule est déjà utilisée pour la dégénérescence maculaire. Utilisée dans des modèles murins de cancer de foie ou le mélanome, elle inhibe le développement tumoral (Girard et al., 2020; Lecacheur et al., 2020; Liu-Chittenden et al., 2012) (*Article 1*). Des essais cliniques de phase 1 et 2 utilisant la Vertéporfine ont été réalisés pour le cancer du pancréas et ont donné des résultats prometteurs (Huggett et al., 2014).

Un peptide mimant l'inhibition physiologique de l'interaction entre YAP et TEAD par la protéine VGL4 a été utilisé comme thérapie contre le cancer gastrique dans un modèle murin (Jiao et al., 2014) ou le cancer du pancréas (Zhou et al., 2020). Ces études prometteuses suggèrent que YAP pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des cancers solides comme le cancer du foie, le mélanome, le cancer gastrique ou du pancréas.

D'autres inhibiteurs ont également été identifiés comme les inhibiteurs de tankyrase (comme le XAV939, JW55, WIKI4). Les tankyrases s'associent aux protéines de la famille AMOT et entraînent leur dégradation. Les inhibiteurs des tankyrases empêchent la liaison de la tankyrase avec les protéines AMOT. Ces dernières vont ainsi pouvoir se fixer sur YAP, favoriser sa dégradation et donc supprimer les propriétés oncogéniques de YAP (Wang et al., 2015b).

e) Voie MRTF

Le co-facteur de transcription MRTF peut induire le remodelage de la MEC par la génération de forces contractiles via l'activation de Rho et la polymérisation de l'actine (Johnson et al., 2014). La molécule CCG-1423 inhibe son activité transcriptionnelle en masquant sa séquence de localisation nucléaire (Hayashi et al., 2014). Dans le mélanome, le ciblage de la voie MRTF/SRF par différents inhibiteurs, dont la molécule CCG-1423, empêche la résistance thérapeutique induite par la GTPase Rac1 mutée P29 (Lionarons et al., 2019).

La toxicité induite par cet inhibiteur a entraîné le développement d'inhibiteurs de seconde génération comme le CCG-100602 et le CCG-203971 (Johnson et al., 2014). L'utilisation de ces inhibiteurs permet la diminution de l'expression du collagène de type I et de α -SMA induite par le TGF β dans les myofibroblastes (Johnson et al., 2014). La combinaison de CCG-222740, un inhibiteur de la voie Rho/MRTF, avec le Tramétinib réduit la viabilité cellulaire de cellules de mélanome mutées NRAS (Appleton et al., 2021). Le ciblage de MRTF pourrait devenir une approche intéressante pour cibler la réponse des cellules à la rigidité matricielle.

VIII. Conclusion

La rigidité matricielle entraîne l'activation de différentes voies de signalisation mécanosensibles dans la cellule tumorale pour augmenter son agressivité, sa progression et sa résistance thérapeutique. Beaucoup d'études se sont donc intéressées au ciblage de la rigidité matricielle dans le microenvironnement et des voies de la mécanotransduction dans la cellule comme approche antitumorale. De nombreux progrès ont été faits dans ce domaine mais aucune de ses approches n'a montré un avantage bénéfique pour les patients par rapport aux thérapies déjà existantes. Cependant un nombre croissant d'études montre que le ciblage de la mécanotransduction potentialise l'effet antitumoral des thérapies utilisées en clinique (Diaz Osterman et al., 2019; Rao et al., 2018). De nombreuses avancées restent encore à faire pour mieux comprendre le rôle et les acteurs de la mécanotransduction pour rendre son ciblage plus efficace.

Chapitre 3 :

Le mélanome cutané

I. La peau, un organe mécanosenseur

Dans le corps humain, l'organe le plus étendu est la peau qui représente environ 5% du poids total d'un individu. C'est un organe souple et flexible qui recouvre l'intégralité de la partie extérieure du corps, couvrant ainsi une surface de 3 à 6m². Elle subit à chaque mouvement un étirement et une compression multidirectionnels, ce qui en fait un organe dynamique. La peau est un organe sensoriel complexe dont les rôles sont variés et ne se limitent pas à cette seule fonction. Elle protège également le corps des agressions extérieures comme les infections par des microorganismes pathogènes, les blessures et les rayons nocifs du soleil (Tortora and Derrickson, 2012). La peau permet la thermorégulation du corps et contrôle le stockage de l'eau, des graisses et de la vitamine D (Ramos-e-Silva and da Silva Carneiro, 2007). La peau donne des indications sur l'état de santé global de l'individu par des signes physiques tels que la sudation, les changements de couleurs (rougeur, pâleur, jaunisse). De façon générale, elle sert de messenger en transmettant les informations venant de l'extérieur au cerveau. La peau subit de nombreux types de forces auxquels elle répond grâce à la constitution particulière de sa MEC.

La peau est constituée de trois couches qui sont, de la plus superficielle à la plus profonde : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Boer et al., 2016). Ces trois strates sont originaires des trois feuilletts embryonnaires, respectivement, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (figure 32).

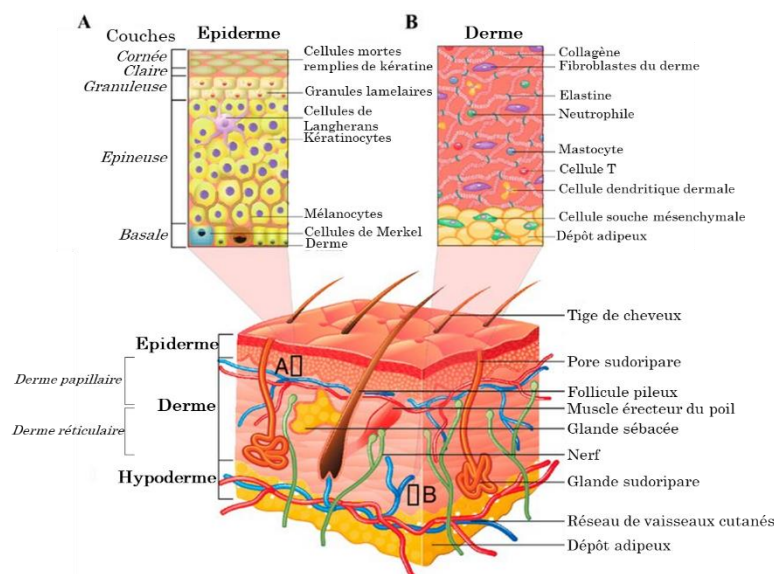


Figure 32 : Structure générale de la peau

Schéma détaillé de la peau et de ses différentes couches avec un zoom sur l'épiderme en (A) et sur le derme en (B).

A. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. Elle est en contact direct avec l'extérieur et joue un rôle de revêtement. Sa surface se déforme avec le mouvement permettant de traduire les forces qui lui sont appliquées par le réseau fibrillaire dermique sous-jacent (Carmichael, 2014).

Au niveau cellulaire, l'épiderme est composé majoritairement de kératinocytes (90% des cellules de l'épiderme) mais également de mélanocytes qui permettent la pigmentation de la peau, de cellules de Langerhans, les macrophages résidents de la peau, de cellules de Merkel, les cellules tactiles de la peau et de cellules inflammatoires (Tortora and Derrickson, 2012).

Les mélanocytes sont localisés dans la couche basale de l'épiderme, et sont connectés aux nombreux kératinocytes avoisinants dans cette même strate par des dendrites. Ils produisent la mélanine au sein d'organelles nommés mélanosomes (Paluncic et al., 2016). Ils transmettent ensuite cette mélanine aux kératinocytes pour les protéger des dommages à l'ADN induits par les rayons UV et donner sa coloration à la peau et aux poils. (Shain and Bastian, 2016).

La frontière entre l'épiderme et le derme sous-jacent s'établit grâce au dépôt d'une couche spécialisée de MEC appelée membrane basale. Cette dernière est composée d'un assemblage complexe de protéines matricielles comme du collagène IV, de la laminine, du nidogène, du perlécane, de sulfate d'héparane, des protéoglycanes et des protéines de jonctions (Yurchenco et al., 2004).

B. Le derme

Le derme, deuxième couche de la peau, est un tissu conjonctif épais. Le derme correspond à la partie la plus innervée et vascularisée de la peau. On y retrouve des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des récepteurs neuronaux tels que les récepteurs nerveux sensoriels des corpuscules de Merkel et Meissner (pour le toucher), des corpuscules de Pacini (pour la pression) et les corpuscules de Ruffini (mécanorécepteurs).

Cette couche de la peau est également constituée de fibroblastes qui produisent la MEC dont le rôle est de fournir la structure de base du derme (Marks et al., 2006). Les collagènes prédominants dans le derme sont le collagène de type I (80-90%), de type III (10-20%) et en moindre proportion du collagène de type IV. Viennent ensuite les fibres élastiques qui sont responsables des propriétés rétractiles de la peau. Enfin, l'élastine donne à la peau son élasticité et l'aide à retourner à sa position initiale après étirement ou enfoncement. Grâce à la composition particulière de sa MEC, le derme fournit la plupart de la résistance mécanique que subit la peau (Tobin, 2006).

C.L'hypoderme

L'hypoderme, la couche profonde de la peau, est un tissu conjonctif lâche qui forme des larges poches de tissu adipeux. Il assure les fonctions de réserve graisseuse, de protection, d'isolant thermique et d'amortisseur et il modèle la silhouette en fonction de l'âge, du sexe et de l'état nutritionnel de l'individu. Ce tissu est constitué de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes qui attirent les fluides dans le tissu pour lui donner ses propriétés viscoélastiques (Guimberteau et al., 2010).

Les différents types de cellules retrouvés dans l'hypoderme sont les fibroblastes, les adipocytes et les macrophages qui assurent l'homéostasie adipeuse et stimulent la thermorégulation durant l'exposition au froid ou l'exercice. Les adipocytes sont organisés en lobules et sont irrigués par les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

II. Le mélanome et les voies de signalisation associées à sa progression

Au sein de la peau, différents cancers peuvent se développer à partir des cellules qui la constituent parmi lesquels les plus majoritaires sont les carcinomes ou les mélanomes. Les carcinomes prennent leur origine des kératinocytes ou des cellules de Merkel, tandis que les mélanomes proviennent de la transformation des mélanocytes. Le mélanome ne représente que 10% des cancers cutanés mais à cause de sa forte agressivité, il est responsable de 80% des décès associés à ce type de cancer.

A. Généralités sur le mélanome

Décrit depuis l'Antiquité par Hippocrate comme « une tumeur noire mortelle », le mélanome est un cancer de la peau qui se développe à partir des mélanocytes, les cellules responsables de la pigmentation de la peau et issues de la crête neurale. C'est un cancer solide malin caractérisé par une hétérogénéité importante, une plasticité cellulaire, une forte capacité métastatique et une résistance aux traitements. Tout cela en fait le cancer cutané le plus mortel à l'heure actuelle (Gorantla and Kirkwood, 2014).

Différents types de mélanome ont été décrits : les mélanomes cutanés et non-cutanés comme les mélanomes muqueux ou intraoculaires car il existe des mélanocytes « classiques », qui sont localisés dans la peau, et des mélanocytes « non-classiques » que l'on retrouve notamment au niveau de l'œil, l'oreille, le cerveau ou le cœur (Colombo et al.). Les mélanomes non cutanés sont très rares et ne représentent que 5% des mélanomes.

Les mélanomes cutanés peuvent provenir d'un grain de beauté préexistant, appelé naevus, dans 20 à 30% des cas. Mais, dans la majorité des cas (~70%), ils se développent à partir d'un mélanocyte *de novo* (Cymerman et al., 2016). En France, d'après l'INCA (Institut National du Cancer), le mélanome cutané représente le 6^{ème} cancer le plus fréquent, avec 15 513 nouveaux cas et 1 975 décès en 2018 (figure 33) De plus c'est un cancer dont l'incidence reste en constante augmentation avec une augmentation du nombre de cas de 3,4% pour les hommes et de 2,4% chez la femme en moyenne par an (ref2).

La détection précoce du mélanome est le meilleur moyen de diminuer sa mortalité. Le mélanome cutané possède l'avantage d'être situé au niveau de la peau et donc d'être accessible au diagnostic par des approches non invasives, telles que l'auto-examen des nævi avec le classement ABCDE (Asymétrie, Bords irréguliers, Couleur non uniforme, Diamètre > 6mm, Evolution rapide) ou la dermoscopie, appareil optique fonctionnant comme une loupe pour permettre aux dermatologues de visualiser la morphologie de structures non visibles à l'œil nu. Cependant, l'analyse histopathologique des lésions suspectes reste le meilleur outil de diagnostic (Rastrelli et al., 2014).

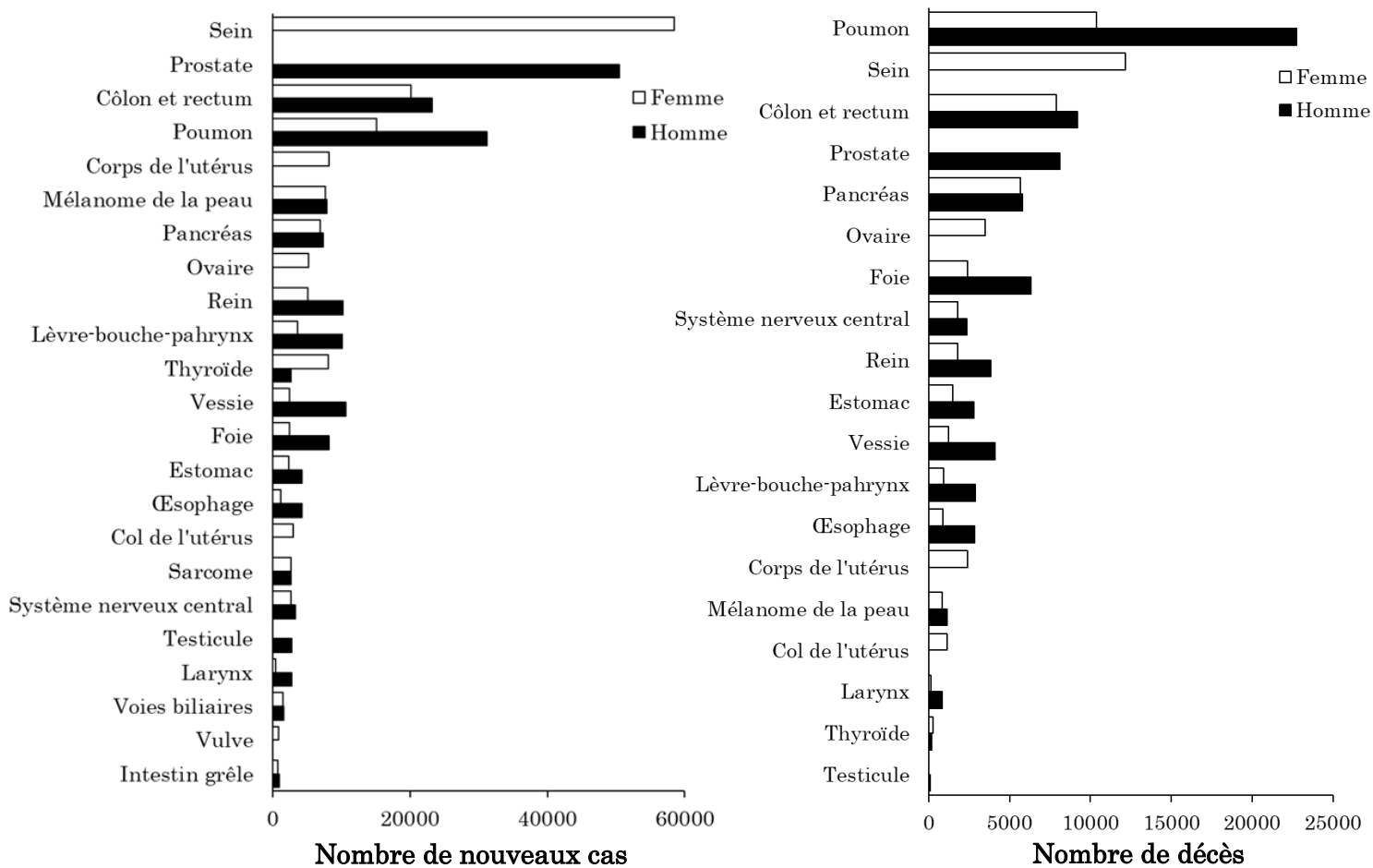


Figure 33 : Classement des tumeurs solides par incidence et mortalité en 2018 en France selon le sexe

Adapté de « INCA, ESTIMATIONS NATIONALES DE L'INCIDENCE ET DE LA MORTALITÉ PAR CANCER EN FRANCE MÉTROPOLITAINE ENTRE 1990 ET 2018 VOLUME 1 : TUMEURS SOLIDES ».

B. Facteurs de risques

Le mélanome est considéré comme un cancer multifactoriel pouvant apparaître à partir de susceptibilités individuelles ou d'expositions environnementales.

a) Les facteurs intrinsèques

Les facteurs de risque intrinsèques sont le nombre de naevi mélanocytaires, la prédisposition génétique et le phototype.

Les naevi mélanocytaires sont des accumulations bénignes de mélanocytes qui peuvent être congénitaux ou acquis. Environ 25% des mélanomes apparaissent à partir d'un naevus préexistant (Bevona et al., 2003). Le nombre total de naevi est positivement corrélé à un risque de mélanome et cela varie selon la taille et le type de naevi. En effet, les patients avec plus de 100 naevi ont 7 fois plus de risque de développer un mélanome. Des naevi larges (> 5 mm) ou géants (> 20 cm) sont également associés à un risque élevé de mélanome. (Gandini et al., 2005)

L'histoire familiale, c'est-à-dire une prédisposition génétique, représente un facteur de risque important pour cette maladie. Tsao *et al.*, ont décrit un modèle d'héritage autosomique dominant avec plusieurs membres d'une même famille affectés dans la première génération et les suivantes (Tsao and Niendorf, 2004). Les anomalies génétiques retrouvées dans ces familles sont des mutations du gène *CDKN2A* (ou p16) ou, de façon plus rare, de *CDK4*. Les patients présentant une prédisposition génétique développent un mélanome généralement avant 40 ans.

Enfin, le phototype de chaque individu influence la survenue de mélanome cutané. Ainsi les individus qui présentent un phototype clair, (cheveux roux, peau claire, nombreuses taches de rousseurs, yeux clairs, sensibilité au soleil, incapacité à bronzer) présentent un risque accru de développer un mélanome (Titus-Ernstoff et al., 2005).

b) Les facteurs extrinsèques

Le plus important facteur de risque environnemental pour le développement d'un mélanome est l'exposition aux rayons UV (UltraViolet) du soleil à cause de leurs effets génotoxiques. Elwood *et al.*, ont étudié la corrélation entre l'apparition d'un mélanome et l'exposition aux UV et ont conclu qu'une exposition intermittente au soleil est un déterminant important de l'apparition de mélanome (Elwood and Jopson, 1997). Ainsi, les coups de soleil répétés pendant l'enfance sont associés à un risque élevé de développer un mélanome. Une exposition à des UV artificiel est aussi associée à un risque d'apparition de mélanome car le taux d'UVA auquel on s'expose dans une cabine à UV est beaucoup plus importante que lors d'activités extérieures (Rastrelli et al., 2014).

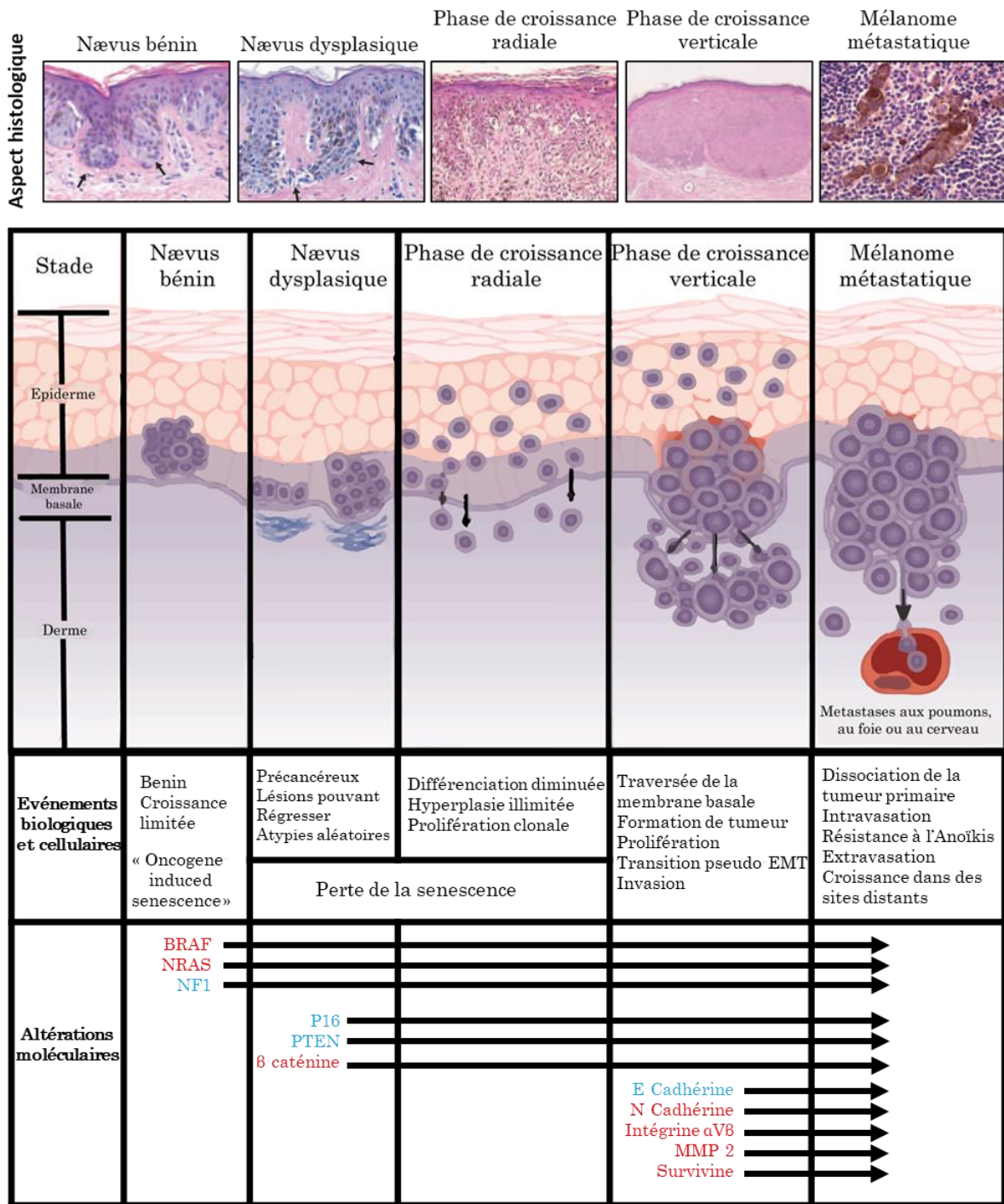


Figure 34 : La progression du mélanome et les différentes altérations génétiques associées

Première ligne, images de marquage H&E montrant les caractéristiques histopathologique de chaque étape de la progression du mélanome.

Deuxième ligne, schéma illustrant les étapes de la progression du mélanome avec les différentes altérations génétiques et lésions moléculaires retrouvées à chaque étape du développement du mélanome. En rouge les gènes surexprimés ou avec une mutation gain de fonction et en bleu les gènes dont l'expression diminue ou avec une mutation perte de fonction.

Adapté de (Gesbert and Larue, 2018; Miller and Mihm, 2006)

C. Progression du mélanome

a) Transformation du mélanocyte en mélanome métastatique

La transformation d'un mélanocyte en mélanome est un processus comportant plusieurs étapes résumées dans le modèle de Clark (Clark et al., 1969) (figure 34). A partir d'un mélanocyte seul ou d'un nævus préexistant, cela commence avec une phase de croissance horizontale (Radial Growth Phase, RGP) où les cellules acquièrent la capacité à proliférer à l'intérieur de l'épiderme, à cause de l'acquisition d'altérations génétiques (figure 33). Les cellules vont ensuite progresser vers un phénotype invasif par un mécanisme qui ressemble à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), nommé transition phénotypique (Hoek et al., 2006; Pedri et al., 2021).

Vient ensuite la phase de croissance verticale (Vertical Growth Phase, VGP) où les cellules acquièrent la capacité à envahir le derme sous-jacent et former un nodule expansible s'élargissant dans le derme papillaire. Les cellules vont envahir profondément la peau jusqu'à l'hypoderme pour finalement pénétrer l'endothélium des capillaires et entrer dans la circulation sanguine ou lymphatique, leur permettant d'aller former des métastases distantes du site primaire (Liu et al., 2014a).

Un des premiers sites de formation de métastases du mélanome est le ganglion lymphatique. Les cellules de mélanome sont capables de sécréter des facteurs solubles rendant le ganglion lymphatique plus permissif à leur arrivée, à la formation de métastases puis à leur dissémination vers de nouveaux organes (Riedel et al., 2016). Plus précisément, une étude récente du laboratoire a montré que ce sont les cellules de phénotype dédifférencié/invasif qui produisent ces facteurs solubles, entraînant un relâchement des fibroblastes du ganglion et donc son remodelage pour produire une niche métastatique pour le mélanome (Rovera et al., 2021) (*Annexe IV*).

La progression du mélanome intègre une série complexe d'événements moléculaires qui comprend différentes altérations génétiques.

b) Mutations initiatrices de la mélanomagenèse

Des études récentes utilisant le séquençage haut débit ont mis en évidence l'hétérogénéité du mélanome. En effet, un groupe de chercheurs du Cancer Genome Atlas (TCGA, the Cancer Genome Atlas) a décrit et classifié les patients atteints de mélanome en quatre groupes distincts en fonction du gène majoritairement muté dans leur tumeur (Cancer Genome Atlas, 2015). Les trois premiers groupes portent des mutations sur les gènes *BRAF*, *RAS* ou *NF1*. Ces mutations induisent une activation constitutive de la voie des MAP-Kinases (MAPK), une voie majeure de la prolifération. Le 4^{ème} groupe contient les patients qui ne portent aucune des 3 mutations précédentes.

1. BRAF

BRAF est une kinase de la voie des MAPK. Sa mutation dans le mélanome cutané représente 50% des cas. La mutation la plus fréquente de l'oncogène BRAF est la mutation V600E (39% des cas) et elle a été identifiée par H. Davies *et al.*, en 2002. C'est une substitution d'une Valine (V) en Acide Glutamique (E) sur le codon 600 (V600E) qui rend constitutivement actif son domaine kinase et active ainsi la voie MAPK en aval (Davies et al., 2002). La seconde mutation la plus fréquente de BRAF est la mutation BRAF^{V600K} où la Valine est substituée par la Lysine (K) qui entraîne également une augmentation de son activité kinase (Bucheit et al., 2013).

2. NRAS

Les protéines RAS font partie de la famille des petites protéines G et possèdent une activité GTPase intrinsèque, en amont de BRAF dans la voie des MAPK. Les mutations sur *NRAS* modifient l'hydrolyse de la GTP rendant ainsi la protéine constitutivement active. Plus de 28% des mutations somatiques sont retrouvées sur la Glutamine 61 (Q61) de NRAS. Cette mutation est mutuellement exclusive avec les mutations de *BRAF* dans les cellules de la tumeur primaire (Gesbert and Larue, 2018).

3. NF1

NF1 est un gène suppresseur de tumeur codant pour la neurofibromine, une protéine qui inhibe RAS en catalysant l'hydrolyse de RAS-GTP en RAS-GDP. Les mutations qui touchent *NF1* sont des mutations perte de fonction ou des délétions, ce qui entraîne une activation aberrante de RAS et de ses effecteurs, des acteurs majeurs des voies MAPK et PI3K/AKT. Les altérations de *NF1* sont retrouvées dans 14% des mélanomes cutanés (Andersen et al., 1993).

4. Autres mutations

Le 4^{ème} groupe de mélanome est hétérogène et caractérisé par l'absence des 3 mutations décrites précédemment. Ce groupe est nommé triple-WT ou triple-négatif. Parmi les mutations que l'on retrouve dans ce groupe, il y a des mutations ou amplification au niveau du récepteur KIT, en amont de la voie MAPK, ou sur les protéines GNAQ et GNA11, des sous-unités α de protéines G. On retrouve également des amplifications de *PDGFR α* (Platelet-Derived Growth Factor Receptor α) et de *VEGFR2* (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) ce qui entraîne une activation de la voie PI3K/AKT. Des amplifications de régulateurs de cycle cellulaire (CDK4 et Cycline D1), des mutations au niveau de HDM2, protéine impliquée dans le contrôle de p53 et une augmentation de l'expression du gène anti-apoptotique BCL2 ont également été décrites (Cancer Genome Atlas, 2015).

5. Mutations et voies secondaires

Dans les mélanocytes, la mutation V600E sur BRAF a été montrée comme induisant un arrêt du cycle et une entrée en sénescence, ce qui limite la progression des lésions précancéreuses (Michaloglou et al., 2005). De plus, la majorité des nævi expriment la mutation BRAF^{V600E}. Cela signifie que cette mutation n'est pas suffisante pour induire la transformation maligne du mélanocyte. Il faut donc d'autres altérations génétiques au mélanocyte pour échapper à la sénescence. C'est effectivement le cas avec des mutations ou des délétions au niveau de *CDK2NA*, régulateur du cycle cellulaire et de l'apoptose, des mutations sur *TP53*, jouant un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN, des altérations sur la voie PI3K/AKT avec des mutations ou délétions de *PTEN* dans le groupe muté sur BRAF ou une surexpression de AKT3 dans les groupes porteurs de mutations sur RAS ou NF1 (Cancer Genome Atlas, 2015). L'équipe du Dr Marine a montré que l'augmentation de l'expression de la protéine HDM4, régulatrice de p53, entraîne l'inactivation de la voie p53 dans la majorité des mélanomes cutanés (Gembarska et al., 2012). Le facteur de transcription β-caténine, de la voie Wnt, permet également de favoriser la prolifération des cellules de mélanome pour permettre le développement du mélanome et contourner la sénescence (Delmas et al., 2007).

c) Voies de signalisation impliquées dans la progression du mélanome

Des découvertes récentes sur les mécanismes de signalisation ont permis une meilleure compréhension de la biologie à la base de la progression du mélanome. Ces avancées ont été exploitées pour fournir les approches thérapeutiques du mélanome qui seront détaillées plus loin dans ce chapitre. Parmi les événements génétiques à l'origine du développement du mélanome, une grande variété de mutations des composants de voies de signalisation a été caractérisée.

1. La voie des MAP-Kinases

i. Rôle et activation physiologique

La voie de signalisation des MAP-Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) joue un rôle dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la prolifération cellulaire, la différenciation, le développement, la migration ou l'apoptose (Zhang and Liu, 2002). Cette voie peut être activée par différents signaux extracellulaires comme des facteurs de croissance, des facteurs mitogènes ou des cytokines.

Les kinases qui composent cette voie sont divisées en trois groupes : les ERK, les JNKs et les p38 kinases et sont appelées MAPK. Chaque MAPK est activée par phosphorylation d'une MAPK Kinase (MAPKK ou MAP2K) qui est à son tour phosphorylée par une MAPKK Kinase (MAPKKK ou MAP3K) (Figure 35). Ces kinases vont finalement conduire à l'activité des MAPK ERK, JNK ou p38 qui vont induire différentes réponses cellulaires en activant leurs substrats spécifiques, dont des facteurs de transcription (figure 35).

La voie MAPK ERK (figure 36) est celle qui a un impact important sur la progression du mélanome. En condition physiologique, dans la voie MAPK ERK, le rôle de la MAP3K est assuré par la famille des Raf qui sont des sérines/thréonine kinases. Elles sont caractérisées par un domaine de liaison à Ras/GTP. Les protéines Ras sont des petites GTPases localisées à la membrane plasmique. Ras/GTP recrute à son tour les kinases Raf à la membrane plasmique. Une fois activées, les différents isoformes de Raf phosphorylent la MAP2K MEK1/2. Les MEK actives phosphorylent ERK1/2, effecteurs finaux de la voie MAPK ERK. L'activation de ERK résulte en la phosphorylation d'un grand nombre de substrats à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. La localisation de ERK détermine ses substrats cibles. Dans le cytoplasme, ERK phosphoryle des protéines du cytosquelette, ce qui entraîne une modulation du mouvement cellulaire, du trafic intracellulaire et de l'adhésion (Pullikuth and Catling, 2007). Dans le noyau, ERK active une grande variété de facteurs de transcription comme p90^{RSK}, c-Fos, c-Myc et c-Jun (Shaul and Seger, 2007).

La voie MAPK ERK joue un rôle important dans le renouvellement constant des kératinocytes (Khavari and Rinn, 2007). Dans les mélanocytes, cette voie est aussi impliquée dans la balance entre prolifération et différenciation (Wellbrock and Arozarena, 2016). Le facteur de transcription MITF est une cible nucléaire de ERK et régule la fonction mélanocytaire comme la production de mélanine, la survie et la morphologie cellulaire (Widlund and Fisher, 2003). Une activation transitoire de ERK induit une différenciation mélanocytaire alors qu'une activation soutenue induit leur prolifération (Wellbrock et al., 2002). Cela montre qu'une dérégulation de la voie MAPK ERK conduisant à son activation maintenue est intimement liée à la progression du mélanome.

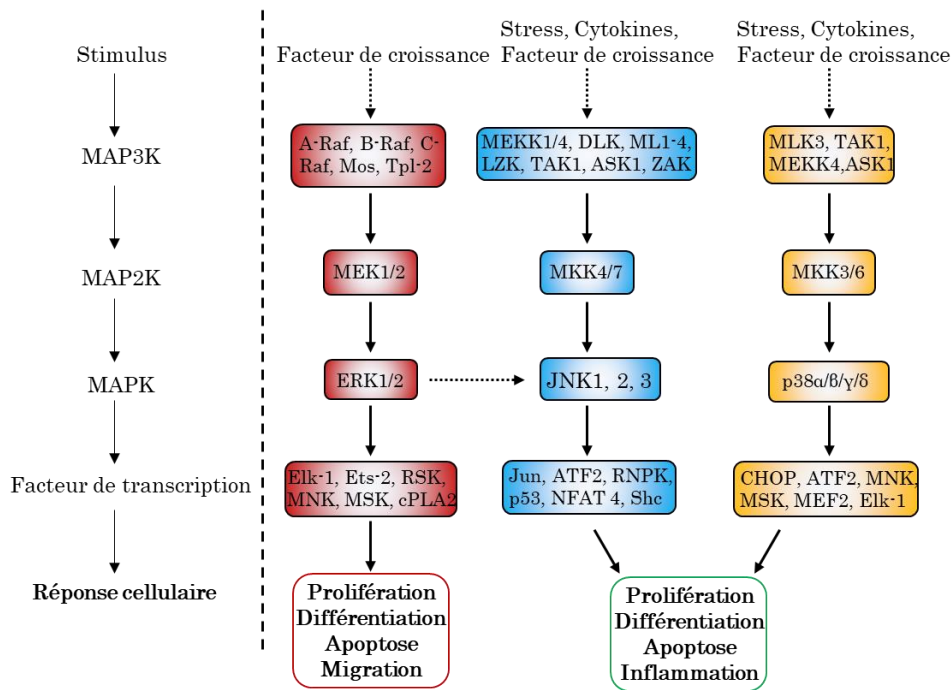


Figure 35 : Les voies MAP-Kinases

Adapté de (Dhillon et al., 2007; Morad et al., 2021; Roberts and Der, 2007)

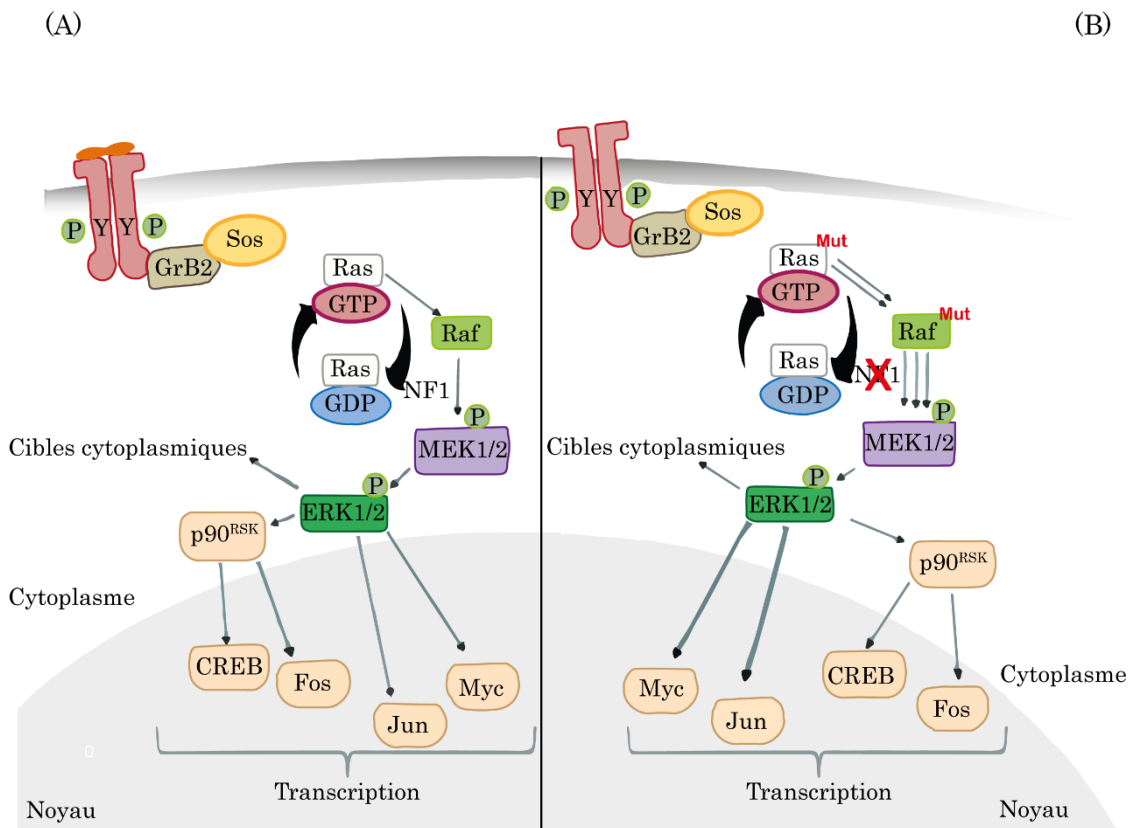


Figure 36 : La voie MAP-Kinase ERK en physiologie et dans le mélanome

Adapté de (Dantonio et al., 2018)

ii. Rôle et altérations dans le mélanome

Durant la progression tumorale, la voie MAPK peut être altérée à différents niveaux. Des altérations de cette voie, incluant des mutations de certaines molécules effectrices, peuvent conduire à la suractivation de la cascade de signalisation et entraîner une conséquence sur des fonctions pro-oncogéniques comme la prolifération cellulaire, la survie, l'invasion, la formation de métastases ou l'angiogenèse (Dhillon et al., 2007). En plus des mutations initiatrices du mélanome qui touchent 3 protéines importantes de la voie MAPK ERK, d'autres protéines sont également impliquées dans la progression du mélanome (figure 36).

En plus de MITF, la famille des facteurs de transcription AP-1 (qui inclut c-Jun et c-Fos) fait aussi partie des cibles directe de la voie MAPK et est grandement associée à la progression du mélanome en agissant sur la prolifération, la migration, l'apoptose et la survie cellulaire (Kappelman et al., 2014). c-Jun est considéré comme le facteur de la famille AP-1 le plus important dans le mélanome et il peut être activé à la fois par les voies MAPK JNK et MAPK ERK pour promouvoir la prolifération cellulaire (Smalley, 2003). En plus des altérations génétiques, des modifications épigénétiques peuvent aussi contrôler la voie MAPK dans le mélanome. C'est le cas notamment de *miR-524-5p*, un micro-ARN (miARN) qui cible les transcrits de *BRAF* et *ERK2* et dont l'expression est diminuée dans le mélanome (Liu et al., 2014b). Il existe d'autres miARN qui agissent également comme des suppresseurs de tumeur dans le mélanome comme *miR-340* qui cible différents composants de la voie MAPK ERK (Poenitzsch Strong et al., 2014).

Dans les mélanomes triple sauvages qui présentent une surexpression de différents RTK (KIT, PDGFR α , ERBB4), les voies MAPK ERK et PI3K/AKT sont activées, suggérant une dépendance importante de ces voies dans le mélanome (30707374, (TCGA, the Cancer Genome Atlas))

2. La voie PI3K/AKT

i. Rôle et activation physiologique

La famille des PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase) est composée de kinases lipidiques qui sont activés par divers stimuli ou stress et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques incluant la survie cellulaire, la croissance, la différenciation, la prolifération, la transcription et la traduction (Liu et al., 2009). Cette voie de signalisation transduit le signal provenant de différents facteurs de croissance et cytokines, faisant de cette voie l'effectrice la plus importante des RTK et récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Figure 37). La PI3K a été associé au développement de différentes pathologies comme le diabète, l'auto-immunité, l'inflammation et le cancer (Liu et al., 2009).

Trois classes différentes de PI3Ks ont été décrites. La classe I de PI3K est la mieux caractérisée et est considérée comme principal activateur de la voie classique PI3K-AKT. Elle est composée d'hétérodimères de PI3K contenant une sous-unité régulatrice (p85) et une sous-unité catalytique (p110) (Martini et al., 2014). Après stimulation, la sous-unité p85 de PI3K interagit avec la partie intra-cellulaire du récepteur activé. Cette interaction permet l'activation de la sous-unité p110 qui va s'associer avec les lipides de la membrane. PI3K activé mène à la formation de PIP₃, un second messager essentiel au recrutement de la sérine/thréonine kinase AKT à la membrane. Après son recrutement à la membrane plasmique, AKT subit un changement conformationnel qui lui permet d'être phosphorylé par PDK1 et PDK2 et donc activé. Une fois activé, il va réguler d'importants comportements cellulaires comme l'apoptose, la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, le métabolisme du glucose, la croissance cellulaire, la motilité, l'invasion et l'angiogenèse (figure 37) (Liu et al., 2009; Martini et al., 2014).

La cible principale de AKT est mTOR qui exerce ses fonctions en formant 2 complexes : mTORC1 composé des protéines RAPTOR, mLST8 et PRAS40 ; et mTORC2 avec les protéines RICTOR, MSIN1 et mLST8. Dans un contexte physiologique, mTOR régule la croissance cellulaire et la prolifération en contrôlant la disponibilité des nutriments, l'énergie cellulaire, le niveau d'oxygène et les signaux mitotiques (Laugier et al., 2015).

Comme beaucoup d'autres voies de signalisation, PI3K-AKT possède des régulateurs pour contrôler et prévenir d'une activation persistante et à long terme. Le principal régulateur négatif de PI3K est le suppresseur de tumeur PTEN, qui bloque l'activité de PI3K par son activité lipide phosphatase en transformant PIP₃ en PIP₂ (Wu et al., 2003).

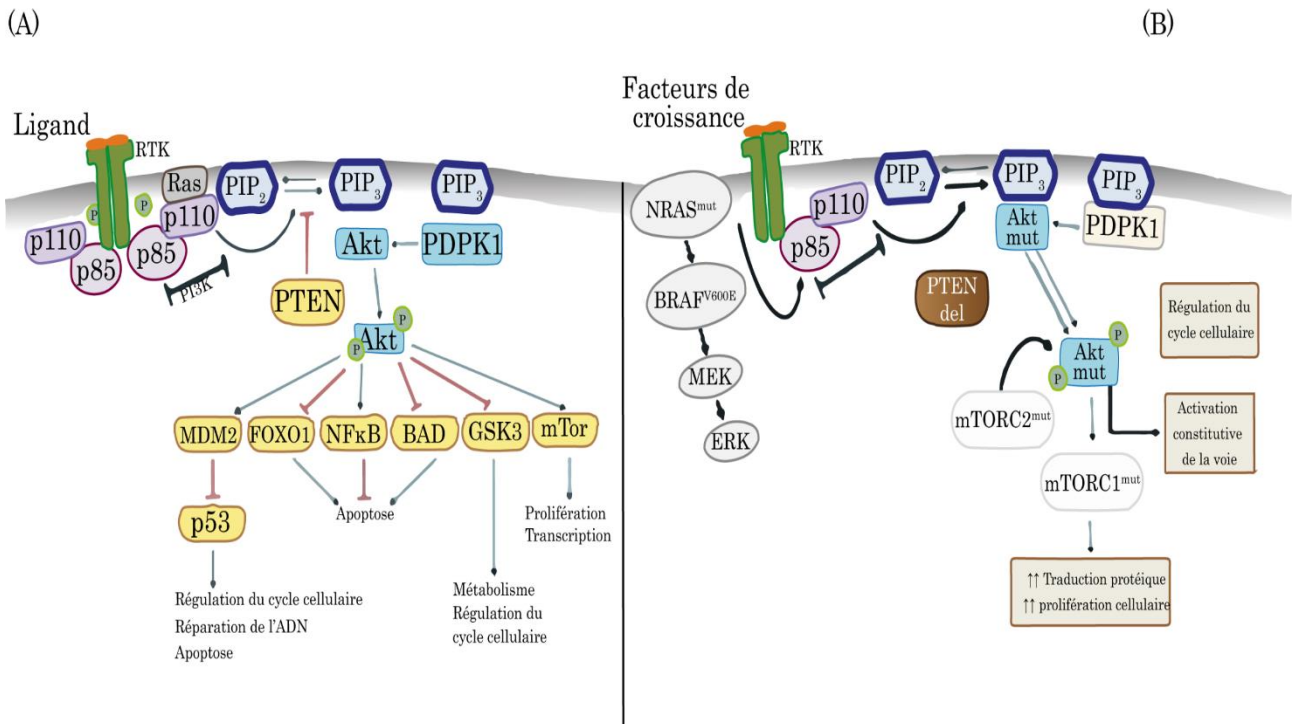


Figure 37 : La voie PI3K/AKT en physiologie et dans le mélanome

Adapté de (Dantonio et al., 2018)

ii. Rôle et altérations dans le mélanome

La voie de signalisation PI3K a été montrée comme étant surexprimée dans différents types de cancers, incluant le mélanome, pour protéger la tumeur de conditions de stress qui pourraient conduire à la mort cellulaire et donc une régression tumorale (Madhunapantula et al., 2011). Les événements oncogéniques qui activent PI3K-AKT peuvent inclure des mutations ou des modifications du nombre de copies du gène de certains constituants de la voie. Des mutations dans les constituants de voies de signalisation adjacentes qui interagissent avec la voie PI3K/AKT, comme des mutations sur Ras peuvent aussi avoir comme conséquence d'activer cette voie.

Des mutations du gène *PI3K* sont relativement rares dans le mélanome (~3%) (Omholt et al., 2006). AKT3 est surexprimé dans 43 à 60% des mélanomes non familiaux et est responsable de la progression de la maladie, de la formation de métastase et du développement de résistance aux traitements (Davies et al., 2008). De plus, une étude du laboratoire a montré que, dans le mélanome, la voie PI3K/AKT peut être activée par la production de la protéine SPARC (secreted protein acidic rich in cysteine) en régulant la survie dépendante de p53 et l'invasion tumorale (Fenouille et al., 2011; Fenouille et al., 2012). Lié à cela, la survie des patients est inversement corrélée au niveau d'activité de AKT.

Les mutations de *MTOR* n'ont pas fait l'objet d'études approfondies, mais une étude a montré qu'il est fréquemment muté dans les patients atteints de mélanome. De plus, les patients porteurs de ces mutations avaient un taux de survie plus faible, ce qui suggère qu'elles sont de mauvais pronostic pour la pathologie (Kong et al., 2016). RICTOR, le constituant du complexe mTORC2, a aussi été retrouvé surexprimé dans le mélanome où il permet de stimuler la croissance cellulaire (Laugier et al., 2015).

En plus des mutations ponctuelles, la voie PI3K-AKT peut aussi être hyper activée dans le mélanome à cause d'une perte d'activité du régulateur négatif PTEN. La fonction de PTEN est perdue dans 10 à 30% des mélanomes, entraînant l'activation constitutive de la voie PI3K (Wu et al., 2003). De façon intéressante, les mutations et délétions du gène *PTEN* sont mutuellement exclusives dans les mélanomes porteurs de la mutation activatrice de NRAS (Tsao et al., 2000). De plus, ~20% des patients avec la perte de fonction de PTEN sont aussi porteurs de la mutation *BRAF^{V600E}* (Tsao et al., 2004) (figure 37).

3. Autres voies de signalisations

D'autres voies sont également impliquées dans la progression du mélanome. On retrouve, notamment, la voie en aval du gène *CDKN2A* qui code pour p16INK4 et p14ARF et qui régule la prolifération et l'entrée dans le cycle cellulaire. L'activation de cette voie coopère avec les mutations de BRAF et de NRAS dans la transformation des mélanocytes (Kannan et al., 2003). De plus, la voie MAPK ERK stimule la voie CDK4 en augmentant l'expression de la cycline D1 (Filmus et al., 1994). On retrouve également des mutations sur CDK4 (R24C) dans les mélanomes familiaux qui abolissent l'interaction avec p16^{INK4A} rendant ainsi CDK4 constitutivement actif (Rane et al., 2002).

La voie Wnt canonique contrôle l'expression de c-Myc, facteur de croissance qui régule l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire comme les CDK et les inhibiteurs de CDK. Les tumeurs de mélanome présentent une activation de la voie Wnt/ β -caténine, pour induire la prolifération cellulaire. L'étude du Dr Damsky a montré, dans un modèle génétique de mélanome *in vivo*, que quand *BRAF* est muté, PTEN est très souvent délété et β -caténine est stabilisé, entraînant une augmentation de l'apparition des métastases (Damsky et al., 2011). Cette voie régule également la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses et cela affecte directement l'angiogenèse tumorale en régulant l'expression de facteurs de croissance pro-angiogéniques (Zhang et al., 2001). La voie canonique Wnt peut coopérer avec la voie MAPK pour réguler l'expression et l'activité du facteur de transcription MITF, associé à la prolifération du mélanome (Widlund et al., 2002).

L'activité de NF- κ B dans le mélanome peut entraîner l'induction de cytokines comme CXCL1 (C-X-C motif chemokine ligand 1) qui régule la survie et l'apoptose (Madonna et al., 2012). NF- κ B interagit aussi avec d'autres voies de signalisation qui sont également perturbées dans le mélanome comme la voie PI3K/AKT. La délétion de *PTEN* favorise donc l'activation constitutive de la voie canonique de NF- κ B (Madrid et al., 2001).

Une étude récente de l'équipe du Dr Larue a montré que le facteur de transcription BRN2, connu pour réguler l'invasion du mélanome, agit comme un suppresseur de tumeur dans le mélanome. En effet, la perte BRN2 entraîne l'initiation tumorale dans un modèle murin de mélanome muté pour *BRAF* et *PTEN*. Au niveau mécanistique, cela est dû à une répression de la transcription de *PTEN* par BRN2, ce qui a pour conséquence de réprimer la voie de signalisation PI3K (Hamm et al., 2021).

Des travaux récents du laboratoire ont permis de montrer que les cellules de mélanome de type invasif secrètent en quantité importante la PTX3 (long pentraxin 3), un médiateur de l'inflammation. PTX3 contrôle la migration et l'invasion tumorale en activant la voie NF- κ B par le récepteur TLR4 (Rathore et al., 2019). De plus, notre équipe a également montré que la voie NF- κ B non canonique est régulée par les DDR (discoidin domain receptor) pour permettre la résistance thérapeutique du mélanome (Berestjuk et al., 2019) (*Annexe II*).

La voie JAK-STAT est hyperactivée dans le mélanome, où STAT3 déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques et de gènes qui supportent la survie cellulaire (Messina et al., 2008). STAT1 joue aussi un rôle dans le développement du mélanome, en régulant la migration et la formation de métastases des cellules de mélanomes (Schultz et al., 2010).

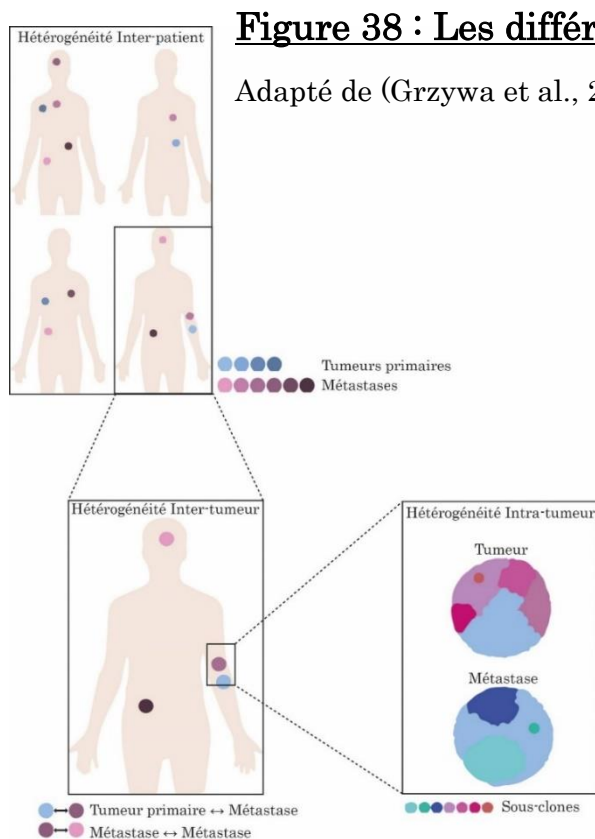
La voie YAP/TAZ est une voie importante dans la progression du mélanome comme précisé dans le *Chapitre 2*. Cette voie est activée par les mutations GNAQ/11 dans le mélanome uvéal et est impliquée dans son initiation et sa progression (Li et al., 2019a). YAP/TAZ est également impliquée dans la progression, la formation de métastase et la résistance thérapeutique du mélanome cutané (Girard et al., 2020; Kim et al., 2016b; Lecacheur et al., 2020; Liu-Chittenden et al., 2012; Miskolczi et al., 2018) (*Article 1*).

Dans le contexte du mélanome, la voie TGF β a été largement impliquée dans la progression de la maladie, la réponse immunitaire antitumorale, les capacités invasives et le remodelage tissulaire (Van Belle et al., 1996). De façon intrigante, la voie TGF β a des rôles opposés pendant la carcinogenèse. A des stades précoces, elle agit comme suppresseur de tumeur en stimulant des gènes pro-apoptotiques en réponse aux mutations oncogéniques (Javelaud et al., 2008). A l'inverse, pendant les stades plus avancés, la voie TGF β agit comme un promoteur de la croissance tumorale, dès que le mélanome acquiert une résistance aux activités anti-prolifératives du TGF β . Cet effet peut être dû à l'expression importante, dans les cellules de mélanome, des protéines SKI et Sno qui sont capables d'interférer avec la transcription de p21 dépendante de SMAD, p21 étant responsable de l'arrêt du cycle cellulaire (Javelaud et al., 2008). De plus le TGF β est capable d'influencer le stroma tumoral en stimulant les fibroblastes à produire de la matrice au sein de la tumeur, en diminuant la mort cellulaire et, par conséquent, en facilitant la croissance tumorale et les capacités métastatiques (Berking et al., 2001). TGF β est aussi capable de réprimer la réponse immunitaire antitumorale en agissant sur chacune des étapes clés de la réponse immunitaire. Il va à la fois inhiber la différenciation des lymphocytes T responsables de cette réponse antitumorale et augmenter le nombre de Treg et la différenciation des macrophages vers un phénotype M2 protumoral (M2) (Yang et al., 2010).

En plus du TGF β , d'autres signaux du microenvironnement tumoral peuvent influencer le développement, la progression et la résistance thérapeutique du mélanome et sont des paramètres importants à prendre en compte pour l'identification cibles thérapeutiques efficaces pour son traitement.

D. Hétérogénéité phénotypique et plasticité cellulaire du mélanome

L'hétérogénéité du mélanome ainsi que sa plasticité font de lui un cancer très agressif et récidivant. L'hétérogénéité s'observe tout d'abord d'un patient à l'autre avec une évolution différente des tumeurs en fonction de leur mode de vie. Elle peut être aussi intra-individuelle et s'expliquer par l'évolution darwinienne de la cellule unique (Nowell, 1976) (figure 38). La métastase est très souvent différente de la tumeur primaire à la fois au niveau génétique, avec l'apparition de nouvelles mutations, ou au niveau phénotypique. Enfin, au niveau intra-tumoral, des cellules de phénotypes différents coexistent dans la tumeur (figure 38). Ce phénomène peut être la conséquence d'une réponse adaptative après traitement avec les thérapies ciblées (Konieczkowski et al., 2014; Van Allen et al., 2014). Différentes études ont, en effet, montré des profils d'expression géniques différents dans des biopsies de patients avant et pendant le traitement ou au moment de la rechute (Johannessen et al., 2013; Rambow et al., 2018). L'hétérogénéité tumorale explique en grande partie les différentes réponses des patients.



a) Le switch phénotypique ou la plasticité phénotypique

Les mélanomes sont des tumeurs très plastiques avec une forte capacité à former des métastases. Cette capacité est permise grâce à un phénomène de différenciation transcriptionnelle réversible appelé plasticité phénotypique ou « switch phénotypique ». Le switch phénotypique est un terme général utilisé pour décrire la transition d'un phénotype à un autre sans définir le sens de cette transition. Les cellules peuvent passer d'un phénotype prolifératif à un phénotype invasif, et inversement, grâce à l'acquisition de modifications transcriptionnelles (figure 39) et en passant par différents phénotypes intermédiaires entre ces deux phénotypes. Cette transition a lieu à différentes étapes de la progression du mélanome dès la tumeur primaire pour aller former les premières métastases jusqu'aux métastases elles-mêmes qui ont besoin de ce switch phénotypique pour s'établir dans le nouvel organe et ainsi continuer à disséminer pour former de nouvelles métastases (figure 39). Cette capacité à osciller d'un état à l'autre fait du mélanome un cancer très plastique qui s'adapte rapidement aux stress qu'il rencontre. Cette plasticité phénotypique est indépendante du statut mutationnel des cellules (Hoek et al., 2006). Ce switch phénotypique du mélanome possède des similitudes avec l'EMT que l'on observe dans les cancers épithéliaux, même si le terme ne peut pas être utilisé car les cellules de mélanome ne sont pas des cellules épithéliales.

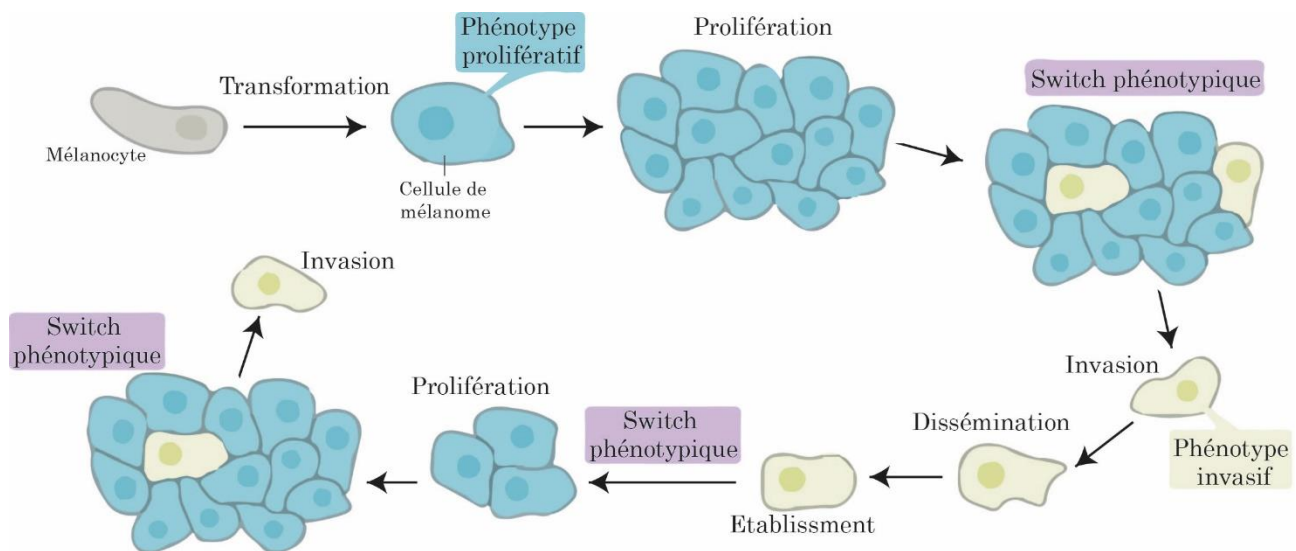


Figure 39 : Le switch phénotypique pendant la progression du mélanome

Adapté de (Arozarena and Wellbrock, 2019)

b) Marqueurs et caractéristiques du switch phénotypique

Le switch phénotypique a été mis en évidence par Bittner et collaborateurs, par une analyse transcriptomique à partir de lignées de mélanome ou de biopsies de patients qui a permis de caractériser 2 signatures transcriptomiques différentes (Bittner et al., 2000). Plus particulièrement, ils ont identifié un groupe de gènes liés aux marqueurs mélanocytaires *EDNRB* (endothelin receptor type B) et *MLANA* (melan-A) et un groupe exprimant *WNT5A* et *AXL*. Les cellules exprimant *WNT5A* et *AXL* présentent une augmentation de leur invasion *in vitro*. Cette observation du switch phénotypique a été confirmée *in vivo* par le Dr Hoek dans des xénogreffes sur des souris immunodéficientes par la mesure de la croissance tumorale associée à l'expression de MITF par marquage immunohistologique (Hoek et al., 2008). D'autres études ont continué de caractériser ces différentes populations pour définir le phénotype « dédifférencié » (à l'origine « invasif ») et le phénotype « mélanocytique » (à l'origine « prolifératif ») (figure 40).

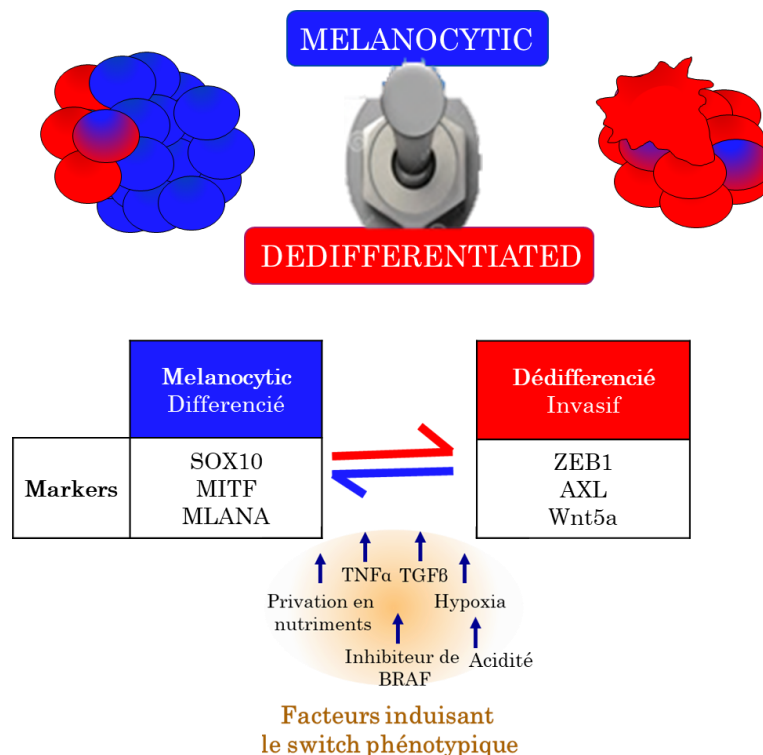


Figure 40 : Le switch phénotypique

Le switch phénotypique est le passage, de façon réversible, d'un état prolifératif à un état invasif. Chacun des phénotypes est caractérisé par l'expression de différents marqueurs. L'état prolifératif correspond aux cellules différenciées avec des marqueurs mélanocytaires de la pigmentation comme MITF, SOX10 ou MLANA. Le phénotype invasif qualifie les cellules dédifférenciées avec l'expression de marqueurs mésenchymateux comme AXL, WNT5A ou ZEB1. Ce phénotype est associé à une plus grande résistance aux traitements. Différents facteurs extrinsèques du microenvironnement peuvent induire ce switch phénotypique comme des facteurs sécrétés (TGF β ou TNF α), la carence en nutriment, l'hypoxie ou les inhibiteurs de BRAF. Cette plasticité phénotypique fait partie des processus d'échappement thérapeutique du mélanome.

Le phénotype « dédifférencié - invasif » est lié à l'expression de marqueurs mésenchymateux comme AXL, ZEB1, JUN, WNT5A ou la fibronectine (Arozarena and Wellbrock, 2019; Caramel et al., 2013). En plus d'être invasives, les cellules qui présentent ce phénotype prolifèrent lentement et sont résistantes aux thérapies ciblées. Cela est dû à leur capacité proliférative réduite qui fait qu'elles sont moins sensibles à l'arrêt de prolifération induit par les inhibiteurs de BRAF et de MEK mais également grâce à l'expression de RTK (comme AXL) qui leur permet d'activer des voies alternatives à la voie des MAPK pour leur survie (Fallahi-Sichani et al., 2017; Muller et al., 2014; Verfaillie et al., 2015). Notre équipe a montré que la protéine matricielle SPARC est également un marqueur du phénotype invasif (Fenouille et al., 2012). Une étude récente a montré que le récepteur à la neutrophine CD271 régule le switch phénotypique du mélanome en diminuant la prolifération des cellules et en augmentant leur invasion (Restivo et al., 2018). De plus, la résistance innée aux immunothérapies est associée à un phénotype mésenchymateux dédifférencié (Hugo et al., 2016). Le mélanome semble donc capable d'échapper aux 2 stratégies thérapeutiques de la même façon, c'est-à-dire grâce à sa plasticité et sa transition vers un phénotype dédifférencié.

Le facteur de transcription MITF joue un rôle central pour le phénotype mélanocytaire-prolifératif et est absent dans le phénotype dédifférencié-invasif. Les cellules de type « mélanocytaire » expriment des marqueurs mélanocytaires associés à MITF comme SOX10, EDNRB et MLANA. Les cellules de ce phénotype présentent une prolifération importante, une faible capacité invasive et sont sensibles aux thérapies ciblées (Muller et al., 2014).

Les facteurs de transcription de l'EMT, ZEB1 et ZEB2, sont des marqueurs du switch phénotypique du mélanome, mais contrairement à l'EMT, ils ont des rôles opposés. ZEB1 est associé au phénotype « dédifférencié – invasif », tandis que ZEB2 est impliqué dans la prolifération et l'inhibition des propriétés invasives des cellules de mélanome (Caramel et al., 2013; Vandamme et al., 2020).

L'étude de Hoek *et al.*, a mis en évidence la présence de 3 sous-populations de mélanome (cohorte A, B et C) (Hoek et al., 2006). La cohorte A est caractérisée par l'expression des marqueurs mélanocytaires d'un phénotype prolifératif tandis que la cohorte C est associée à l'expression de marqueurs mésenchymateux du phénotype invasif. La cohorte B correspond à un phénotype intermédiaire peu invasif. D'autres études récentes ont confirmé la présence de cette sous-population intermédiaire (Wouters et al., 2020). Ensuite 4 sous-populations de cellules de mélanome ont été identifiées au lieu des 2 sous-populations précédemment décrites. Notamment, l'étude de Tsoi *et al.*, qui, en analysant plusieurs lignées de mélanome et biopsies de patients, ont mis en évidence 4 populations. La population C1 regroupe les cellules indifférenciées présentant des marqueurs inflammatoires et de type invasif. La population C2 comprend des cellules avec des marqueurs de la crête neurale. Des cellules exprimant à la fois des marqueurs de la crête neurale et des marqueurs de la pigmentation font partie de la population C3. Enfin, la population C4 rassemble les cellules plus différenciées de type mélanocytaire avec l'expression de marqueurs de la pigmentation (Tsoi et al., 2018).

Ces différentes sous-population de cellules sont caractérisées par des régions de chromatine différentes, comparables à des types cellulaires déjà identifiés. Les enhancers actifs dans les cellules « prolifératives » sont similaires à ceux activés dans les mélanocytes. Tandis que les enhancers actifs dans les cellules « invasives » sont les mêmes que ceux des fibroblastes de peau (Verfaillie et al., 2015). Ce changement de chromatine est également associé à des modifications différentes des histones. Par exemple, la modification activatrice H3K27ac est associée à un promoteur ouvert et actif de SOX10 dans les cellules « prolifératives » ; tandis que dans les cellules « invasives », le promoteur de SOX10 porte une modification inhibitrice H3K27me. Le phénotype intermédiaire est également caractérisé par un état de chromatine différent et est régulé par différents facteurs de transcription tels que SOX6, NFATC2 ou EGR3 (Wouters et al., 2020).

L'étude de l'équipe du Dr Marine a également mis en évidence 4 sous-populations en réponse aux traitements avec des inhibiteurs de BRAF et MEK, par une approche de séquençage des ARNm sur cellules uniques dans un modèle de xéno-greffes de tumeurs de patients de mélanome (Rambow et al., 2018). Une revue récente propose qu'il y ait en fait 6 différentes sous-populations de cellules de mélanome si on recoupe leurs travaux avec ceux de Tsoi *et al.* (Rambow et al., 2019) (figure 41).

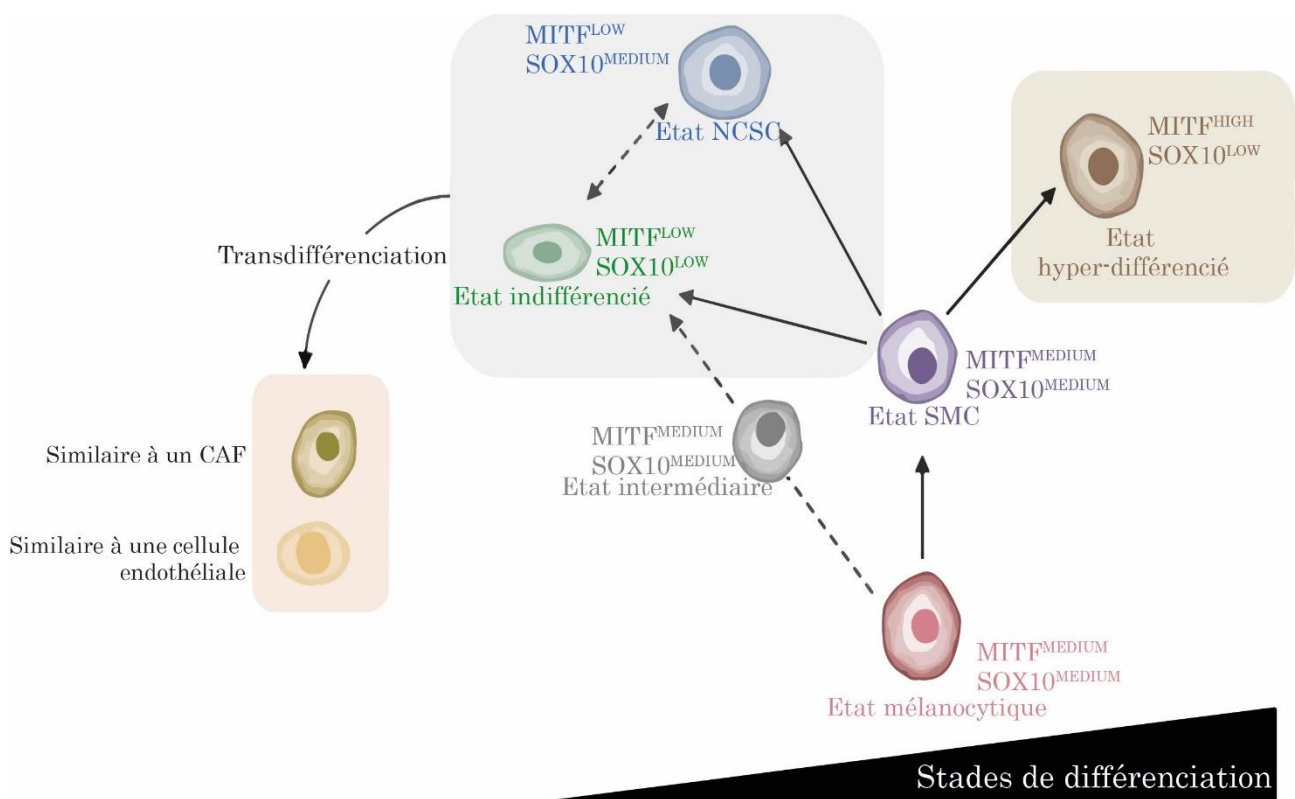


Figure 41 : Les six différentes sous-population dans le mélanome et leur possible hiérarchie.

Adapté de (Rambow et al., 2019)

Une coopération peut avoir lieu entre ces populations cellulaires notamment pour promouvoir l'invasion des cellules. L'étude de Chapman *et al*, a montré, dans un modèle poisson-zèbre, que les cellules invasives expriment la protéase MT1-MMP, produisent de la MEC et envahissent avec des cellules peu invasives. Ils ont défini cela comme de l'invasion coopérative. De plus, il est intéressant de noter que durant cette invasion coopérative, les cellules faiblement invasives ne perdent pas l'expression de MITF, signifiant ainsi que le switch phénotypique n'est pas nécessaire pour l'invasion (Chapman et al., 2014). Récemment, deux études ont confirmé la coopération entre les cellules invasives et prolifératives dans la formation de métastases du mélanome (Campbell et al., 2021; Rowling et al., 2020). Plus précisément, l'étude de Campbell montre que les cellules invasives et prolifératives forment spontanément des clusters organisés, avec les cellules prolifératives entourant les cellules invasives. De façon intéressante, ils montrent que ces clusters hétérogènes existent chez les patients, plus spécifiquement parmi les cellules tumorales circulantes dans le sang. Au niveau mécanistique, ils ont identifié le facteur de transcription TFAP2 (Transcription Factor AP-2 Alpha) comme important régulateur de la formation de ces clusters hétérogènes et des capacités métastatiques des cellules (Campbell et al., 2021).

c) Facteurs d'induction du switch phénotypique

La transition phénotypique peut avoir lieu à la suite d'altérations génétiques ou épigénétiques au sein à la cellule tumorale mais peut également être influencée par le microenvironnement tumoral (figure 40). En retour ces cellules modèlent le microenvironnement tumoral par les différents facteurs qu'elles sécrètent ainsi que leurs interactions cellulaires.

Le switch phénotypique peut être induit par un contact direct avec des cellules stromales. Les CAF peuvent induire ce switch comme cela a été montré dans une étude de Seip *et al*, où une coculture de cellules de mélanome avec des CAF entraîne l'induction d'un phénotype invasif dans les cellules de mélanome (Seip et al., 2016). De plus, le TGF β produit par les CAF peut également induire la dédifférenciation des cellules de mélanome via la voie YAP-TEAD (Miskolczi et al., 2018) ou la voie SMAD (Schlegel et al., 2015).

Le TNF α produit par les neutrophiles, les lymphocytes T activés et les cellules myéloïdes induit la diminution de l'expression de MITF en faveur de l'expression de JUN (Riesenberg et al., 2015).

Les différentes conditions physiologiques du microenvironnement peuvent influencer le switch phénotypique. Le microenvironnement, par les différentes cellules qui y sont présentes et les facteurs qui sont sécrétés, régule la disponibilité de l'oxygène et des nutriments. Au niveau de vaisseaux sanguins non fonctionnels, l'hypoxie est augmentée et stimule l'apparition d'un phénotype dédifférencié qui consomme peu d'oxygène et peut donc mieux survivre à l'hypoxie (Cheli et al., 2012).

Comme la consommation d'oxygène est directement lié à la production d'énergie intracellulaire à partir des nutriments, la disponibilité des nutriments est également un facteur important dans la régulation du phénotype dans le mélanome. Par exemple, une restriction en glucose entraîne une diminution du flux glycolytique et l'accumulation de ROS (reactive oxygen species) via la répression de MITF induite par ATF4 et un passage à un phénotype invasif MITF^{low}-AXL^{high} (Ferguson et al., 2017). La restriction en glutamine induit également le phénotype invasif (Falletta et al., 2017). Le switch phénotypique peut également être induit par l'acidification du microenvironnement. En effet, un pH faible (de 6,7) induit un phénotype quiescent et un arrêt de la prolifération. L'acidose conduit également à une répression de MITF et active l'expression de AXL correspondant au phénotype dédifférencié invasif (Bohme and Bosserhoff, 2020). De plus, il a été montré qu'un microenvironnement âgé favorise le switch phénotypique. En effet, les fibroblastes âgés sécrètent une protéine antagoniste de Wnt, sFRP2, qui entraîne une diminution de β -caténine et de MITF (Kaur et al., 2016).

Enfin, le switch phénotypique peut être induit par les thérapies ciblées. En effet, les inhibiteurs de la voie MAPK peuvent induire un phénotype dédifférencié, peu prolifératif et tolérant aux traitements (Menon et al., 2015; Tsoi et al., 2018). Des études *in vitro* ont montré que l'état dédifférencié induit par les thérapies ciblées peut être transitoire mais un traitement prolongé avec les inhibiteurs de BRAF peut stabiliser cet état (Shaffer et al., 2017; Sharma et al., 2010; Su et al., 2017) par des mécanismes de reprogrammation génétique, comme ceux observés dans les tumeurs de patients développant une résistance acquise (Hugo et al., 2015). Plus précisément, les inhibiteurs de BRAF induisent une augmentation des capacités invasives associée à une réorganisation du cytosquelette d'actine (Kim et al., 2016b; Klein and Higgins, 2011) et un remodelage matriciel via l'augmentation de l'expression de différents MMP (Diazz et al., 2020 ; Girard et al., 2020; Lecacheur, 2020 #1859; Leight et al., 2015 ; Marusak et al., 2020; Rice et al., 2017; Sandri et al., 2016) (Article 1). Une récente étude du laboratoire a montré que l'induction du switch phénotypique vers un phénotype dédifférencié invasif par les inhibiteurs de BRAF est régulée par le cluster de miR-143/145, via l'inhibition de la Fascin1. De façon intéressante, la réexpression de Fascin1 dans les cellules résistantes de type dédifférencié invasives les fait transiter vers un phénotype mélanocytaire (Diazz et al., 2021) (Annexe III). Les signaux mécaniques du microenvironnement tumoral permettent également d'induire la transition vers un phénotype différencié en l'absence de TGF β . Cependant, ces mêmes signaux mécaniques peuvent induire une transition vers un phénotype dédifférencié en présence de TGF β (Miskolczi et al., 2018). Les inhibiteurs de BRAF peuvent induire un phénotype « ultra pigmenté/hyper-différencié » caractérisé par un niveau élevé de MITF et de ses gènes cibles (Smith et al., 2017) et une résistance aux traitements (Muller et al., 2014; Rambow et al., 2019).

E. Conclusions sur la progression du mélanome

De toutes les voies de signalisation précédemment décrites, seule la voie des MAPK ERK est une cible thérapeutique utilisée actuellement dans le traitement du mélanome. Le mélanome déclenche aussi l'activité aberrante d'autres voies de signalisation comme la voie PI3K/AKT, en réduisant l'activité de PTEN, la voie Wnt, la voie NF- κ B, la voie JAK-STAT et la voie TGF β . De plus, ces voies de signalisation interagissent entre elles pour créer une homéostasie propre au mélanome pour l'aider à progresser. Ces interactions rendent difficile la possibilité de trouver des thérapies efficaces.

En plus des voies de signalisation intrinsèques activées dans les cellules de mélanome, il est également important de prendre en compte leur microenvironnement, qui forme un contexte complexe, varié et dynamique selon la tumeur primaire ou les différentes niches métastatiques. Ce dernier joue un rôle important à chaque étape de progression du mélanome et plus particulièrement il joue un rôle dans le switch phénotypique.

Etant donné que le mélanome utilise tous ces mécanismes intrinsèques et extrinsèques pour sa progression, augmenter les connaissances dans ce domaine est essentiel pour pouvoir trouver un traitement efficace qui ciblerait ces voies à leurs jonctions et les interactions entre le mélanome et son microenvironnement, rendant le traitement plus efficace pour bloquer le mélanome (Dantonio et al., 2018).

III. Les traitements du mélanome

Le mélanome est un cancer très agressif du fait de son hétérogénéité, sa grande plasticité et sa résistance aux traitements. La prévention et le dépistage sont les meilleurs moyens d'empêcher le développement de ce cancer. Lorsqu'il est localisé au niveau de la peau, le mélanome peut être enlevé par exérèse chirurgicale avec un très bon taux de survie des patients (Conic et al., 2018). Le traitement du mélanome devient plus difficile lorsqu'il commence à envahir le derme et former des métastases. Lorsqu'il est diagnostiqué à un stade métastatique tardif, le taux de survie des patients est d'environ 15%.

Avant l'identification de la mutation BRAF^{V600E} et le développement d'inhibiteurs spécifiques de cette kinase pour le traitement, le mélanome était de très mauvais pronostic. Le seul traitement était la chimiothérapie avec l'agent alkylant Dacarbazine qui inhibe la synthèse d'ADN entraînant l'arrêt de la prolifération cellulaire. Le taux de réponse ne dépassait pas 10% et la survie des patients n'était pas améliorée (Eggermont and Kirkwood, 2004).

A partir de 2011 avec le développement des thérapies ciblées et de 2015, avec le développement des immunothérapies, le traitement proposé dépend de la présence ou non de la mutation BRAF^{V600E} chez les patients atteints d'un mélanome au stade avancé et non résecable. Les patients non porteurs d'une mutation sur BRAF sont traités avec les immunothérapies, la seule option thérapeutique pour eux. En revanche, les patients porteurs d'une mutation sur BRAF peuvent être traités avec une combinaison d'inhibiteurs de BRAF muté et de MEK, dans le cas de patients présentant une croissance rapide de la tumeur. Ils peuvent également être traités en première ligne avec les immunothérapies, dans le cas où ils présentent une progression tumorale lente car la réponse à ce traitement est plus longue mais peut être plus durable (Bai and Flaherty, 2021) (figure 42).

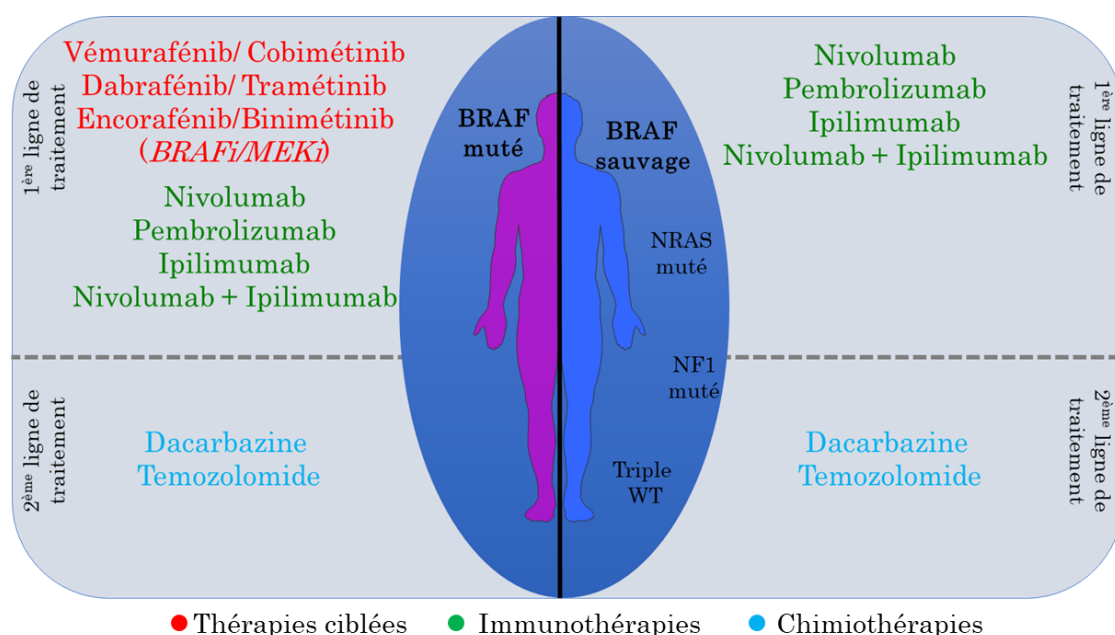


Figure 42 : Les traitements actuels du mélanome

Adapté de (Kozar et al., 2019)

A. Thérapies ciblées

a) Les inhibiteurs de BRAFV600

L'identification de la mutation sur BRAF, qui induit l'activation constitutive de la voie MAPK dans plus de 50% des patients atteints de mélanome, a entraîné la production de petites molécules inhibitrices agissant sur les formes mutées BRAFV600, appelées thérapies ciblées (Ascierto et al., 2012). Ces inhibiteurs sont des compétiteurs réversibles de l'ATP. Ils se fixent sur le domaine actif de la kinase pour bloquer l'accès à l'ATP, entraînant l'inhibition de l'activité kinase de BRAF et de la signalisation MAPK en aval (Waizenegger et al., 2016) .

Le Vémurafénib est le premier inhibiteur de BRAF ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) à avoir été administré aux patients atteints de mélanome à un stade avancé, en 2011 (figure 43). Cet inhibiteur permet une régression significative de la tumeur par rapport aux chimiothérapies. La survie sans progression des patients est également améliorée avec 6,9 mois dans le groupe traité avec le Vémurafénib contre 1,6 mois pour les patients traités avec la dacarbazine (Chapman et al., 2011) (Essai clinique de phase 3 : BRIM-3). Cependant différents effets secondaires apparaissent comme des éruptions cutanées, des anomalies hépatiques, une neutropénie, de la fatigue, des nausées, des réactions de photosensibilité ou l'apparition de carcinome épidermoïde (McArthur et al., 2014; Young et al., 2012). De plus, les patients ont des risques de développer un second mélanome à la suite du traitement (Boussemart et al., 2016). L'activation paradoxale de la voie des MAPK dans les cellules de mélanome non mutées BRAF avec le traitement (Gibney et al., 2013) et dans les kératinocytes (Su et al., 2012) pourrait être responsable des effets cancérogènes.

Un autre inhibiteur de BRAF, le Dabrafénib, a reçu une AMM deux ans plus tard. Il induit moins d'effets secondaires, notamment une diminution de l'apparition de carcinome épidermoïde et possède un meilleur potentiel antitumoral que le Vémurafénib (Menzies et al., 2012). En effet, la survie sans progression des patients passe de 2,5 mois pour le groupe traité avec la Dacarbazine à 5,1 mois pour le groupe traité avec le Dabrafénib (Hauschild et al., 2012)(Essai clinique de phase 3 : BREAK-3).

Même si ces inhibiteurs sont responsables d'une très bonne réponse avec une réduction tumorale, les effets ne durent pas à long terme à cause des mécanismes de résistance qui se développent et qui seront détaillés dans la section IV.

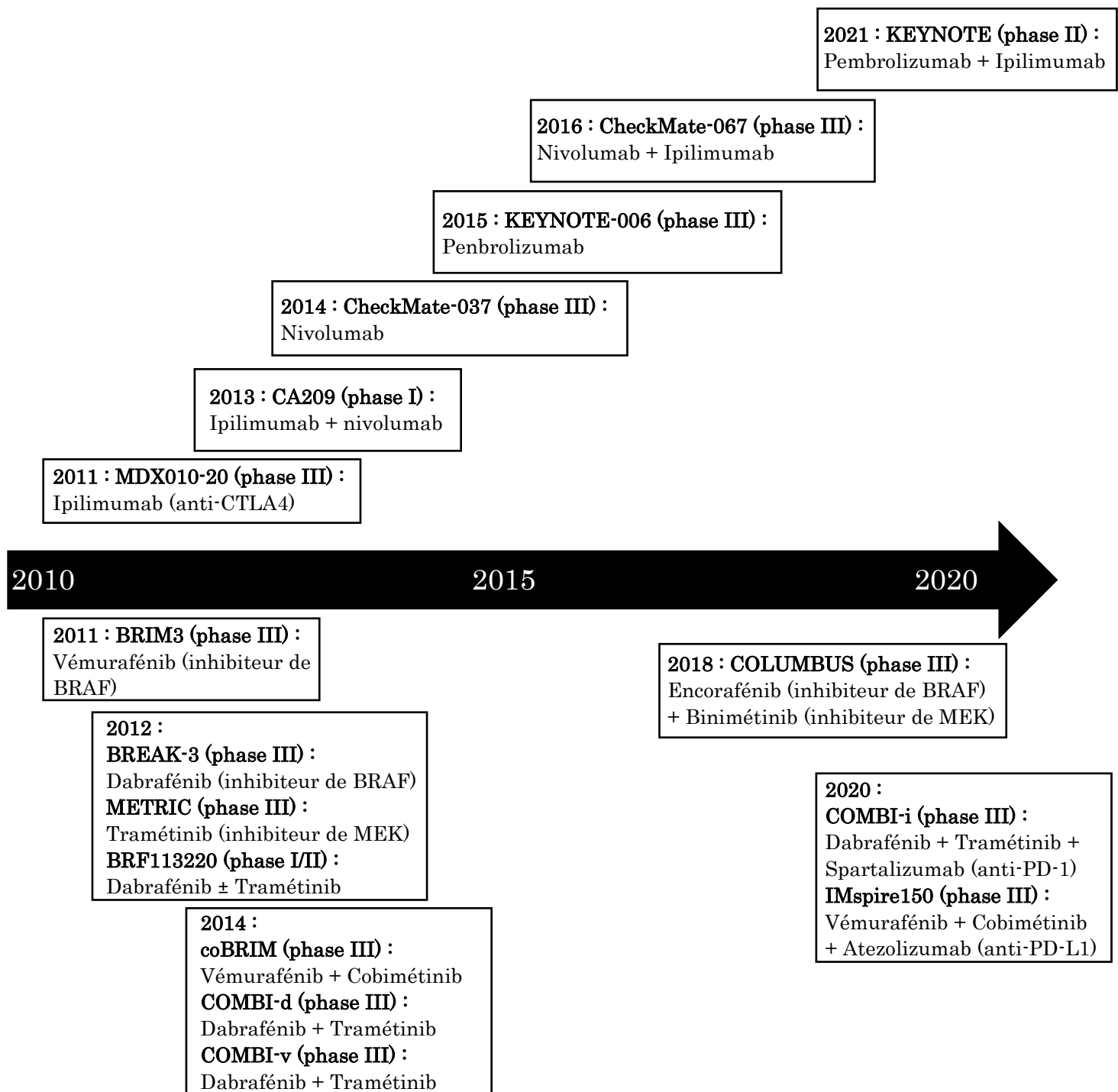


Figure 43 : Les différents essais cliniques dans le mélanome pour les immunothérapies et les thérapies ciblées entre 2011 et 2021

Adapté de (Curti and Faries, 2021; Luke et al., 2017)

b) La combothérapie : inhibiteurs de BRAFV600 + inhibiteurs de MEK

A cause de la réactivation fréquente de la voie MAPK en réponse aux traitements avec les inhibiteurs de BRAF, des inhibiteurs de MEK ont été développés, MEK étant le seul effecteur de BRAF. Parmi les inhibiteurs de MEK, on trouve le Tramétinib, un inhibiteur allostérique réversible de MEK1/2. Les mélanomes mutés BRAF sont plus sensibles à l'inhibition de MEK que les mélanomes mutés NRAS ou des autres groupes (Solit et al., 2006). Des essais ont été réalisés avec l'utilisation d'inhibiteurs de MEK seul. Même si leur effet sur la survie sans progression était significatif (4,8 mois pour le groupe traité avec le Tramétinib contre 1,5 mois pour le groupe traité avec la chimiothérapie), leur efficacité était trop faible comparée aux inhibiteurs de BRAF seuls pour les utiliser en clinique (Flaherty et al., 2012) (Essai clinique de phase 3 : METRIC). La combinaison d'inhibiteurs de BRAF avec des inhibiteurs de MEK a donc été envisagée par la suite (figure 43).

Entre 2014 et 2015, l'utilisation de l'association d'inhibiteurs de BRAF muté et de MEK pour le traitement des mélanomes avancés mutés BRAF a été acceptée après des essais cliniques concluants. Le premier essai a combiné le Dabrafénib et le Tramétinib (Long et al., 2015)(COMBI-d et COMBI-v). Cette combinaison entraîne une survie sans progression de 11 mois contre 8,8 mois pour les patients traités avec le Dabrafénib seul. L'apparition de carcinome et les autres effets secondaires sont moins fréquents (Schadendorf et al., 2015) (Essai clinique de phase 3 : COMBI-d). La combinaison Vémurafénib et Cobimétinib a ensuite été testée en essai clinique (coBRIM). Cette combinaison a montré que la survie sans progression était de 9,9 mois pour les patients traités avec la bi-thérapie contre 6,2 mois pour les patients traités avec le Vémurafénib seul. Les deux combinaisons d'inhibiteurs de BRAF et de MEK fournissent les mêmes bénéfices cliniques pour les patients en augmentant la survie globale, la survie sans progression et en diminuant significativement les effets indésirables comme l'apparition de carcinomes, ce qui a un effet important sur l'amélioration de la qualité de vie des patients (Larkin et al., 2014).

Plus récemment, en 2018, un nouveau couple d'inhibiteurs de BRAF (Encorafénib) et de MEK (Binimétinib) a reçu une AMM. Son essai clinique de phase 3 (COLUMBUS) a montré une meilleure efficacité avec une survie médiane de 33,6 mois pour cette combinaison contre 16,9 mois pour le Vémurafénib (Dummer et al., 2018a; Dummer et al., 2018b). Cette combinaison thérapeutique présente également moins de toxicité (frissons, fièvre ou photosensibilité) comparée aux autres combinaison thérapeutique.

Ces trois options combinant un inhibiteur de BRAF muté et un inhibiteur de MEK font partie de l'arsenal thérapeutique de première ligne pour les patients porteurs de la mutation BRAF^{V600}, dans le cas où la croissance tumorale est rapide et a besoin d'être stoppée rapidement.

B. Immunothérapies

La deuxième option thérapeutique, pour les patients atteints de mélanome dépourvu de mutation sur BRAF ou pour les patients porteurs de la mutation sur BRAF à progression lente, est l'immunothérapie. Elle est également la deuxième ligne de traitement pour les patients porteurs de la mutation BRAF^{V600} non répondeurs ou qui ont développé une résistance aux thérapies ciblées (figure 42).

Les cellules immunitaires sont censées reconnaître les cellules tumorales et les détruire. Pourtant les cellules tumorales développent des méthodes d'échappement au système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011). Les cellules tumorales détournent à leur avantage 2 systèmes de contrôle et d'inactivation du système immunitaire : la voie CTLA-4 et l'interaction PD-1/PD-L1 (programmed death ligand 1) (Furue et al., 2018).

L'immunothérapie permet d'activer le système immunitaire pour provoquer la destruction des cellules tumorales. Dans ce but, différents anticorps monoclonaux ont été développés pour cibler les points de contrôle immunologiques : les anti-CTLA-4 et les anti-PD1.

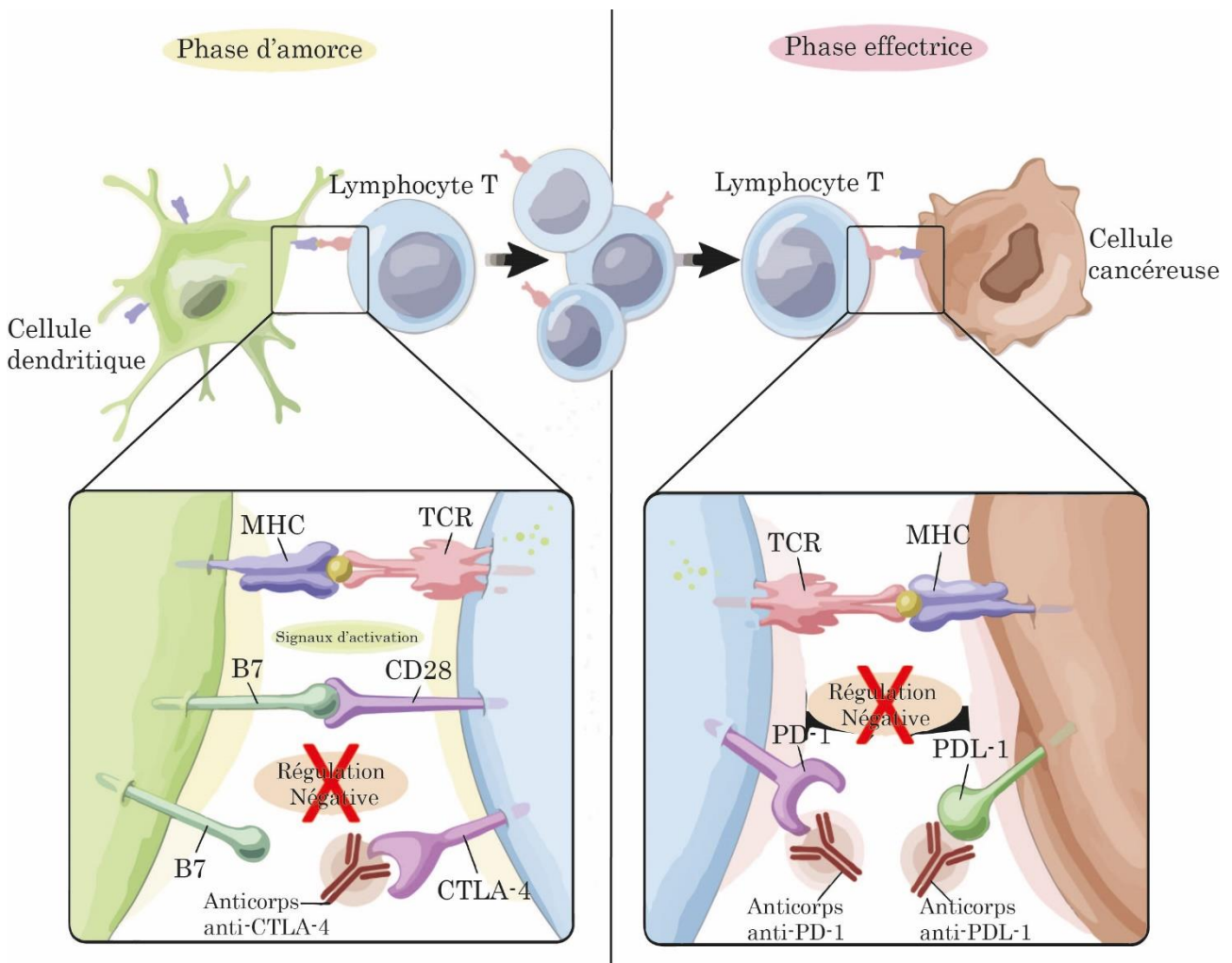


Figure 44 : Les immunothérapies anti-CTLA-4 et anti-PD-1/PD-L1

Adapté de (Ribas, 2012)

a) Les anti-CTLA-4

Le récepteur CTLA-4 des lymphocytes T empêche l'activation des cellules T quand il se lie à un de ses ligands, les molécules B7 (CD80 et CD86) présentes sur les cellules présentatrices d'antigène (comme les cellules dendritiques). Dans ce cas, les lymphocytes T arrêtent de proliférer et ne peuvent plus jouer leur rôle antitumoral (Ribas, 2012).

Les anticorps anti-CTLA-4 permettent d'inhiber l'interaction entre CTLA-4 et B7, forçant ainsi la liaison de B7 à CD28 (figure 39). L'anticorps monoclonal Ipilimumab est utilisé dans le mélanome et permet d'améliorer la survie globale des patients, avec une survie de 11 mois (Hodi et al., 2010) (Essai clinique de phase 3 : CA184). Cependant le taux de réponse est faible (seulement 15%) et il y a une forte toxicité pour les patients (fatigue, nausée, vomissement, démangeaison de la peau) (figure 43).

b) Les anti-PD-1/PD-L1

Le récepteur PD-1, présent à la surface des lymphocytes T et interagit avec les ligands PD-L1 et PD-L2 présents sur les cellules tumorales ou stromales, empêchant ainsi l'activité antitumorale des lymphocytes T.

Les deux anticorps monoclonaux dirigés contre PD-1 utilisés dans le traitement du mélanome pour inhiber l'interaction entre PD-1 et son ligand sont le Nivolumab et le Pembrolizumab. Ces anticorps se lient au récepteur pour inhiber son activité et restaurer l'activité cytotoxique des lymphocytes T contre les cellules tumorales (figure 39). L'utilisation de ces anticorps induit une augmentation significative de la survie globale des patients atteints de mélanome avec un taux de survie sans progression à 6 mois de 47,3% pour le Pembrolizumab contre 26,5% pour l'Ipilimumab. Le taux de réponse est également plus élevé avec 38% de réponse pour le Pembrolizumab contre 11,9% de réponse pour l'Ipilimumab et la toxicité est plus faible (avec une fréquence des effets secondaires de haut grades moins importante) (Robert et al., 2015; Topalian et al., 2014) (figure 43).

Il existe également des anticorps dirigés contre PD-L1 qui permettent d'empêcher l'interaction de PD-L1 avec son récepteur PD-1 comme le Durvalumab, l'Avelumab, l'Atézolizumab (Domingues et al., 2018). Ces anticorps font l'objet d'études cliniques cependant ils ne font pas partie de l'arsenal thérapeutique utilisé contre le mélanome mais ils sont utilisés comme traitement dans d'autres cancers comme le cancer du poumon ou le carcinome de la tête et du cou (Buder-Bakhaya and Hassel, 2018; Keilholz et al., 2019; Sullivan et al., 2019).

De plus, il y a également une amélioration de la survie pour les patients porteurs de la mutation sur BRAF qui avaient développé des résistances aux thérapies ciblées (Lin and Fisher, 2017). Les réponses obtenues avec les thérapies ciblées sont généralement plus rapides que celles obtenues avec les immunothérapies, c'est pourquoi les thérapies ciblées restent le traitement de première ligne pour les patients mutés BRAF (Seth et al., 2020; Ugurel et al., 2020).

C. Combinaison Immunothérapies + Thérapies ciblées

Des essais récents cliniques de phase 3 tentent de combiner les immunothérapies avec les thérapies ciblées pour les patients porteurs d'une mutation sur BRAF : COMBI-i pour la combinaison Dabrafénib/Tramétinib + Spartalizumab (anti-PD-1) (Dummer et al., 2020) ou IMspire-150 pour la combinaison Vémurafénib/Cobimétinib + Atezolizumab (anti-PD-L1) (Gutzmer et al., 2020).

L'essai COMBI-i a présenté des résultats prometteurs avec une réponse complète pour 44% des patients. Cette étude est actuellement complétée par l'ajout d'un groupe témoin traité avec la combinaison Dabrafénib/Tramétinib (figure 43).

En parallèle, l'essai IMspire-150, combinant Vémurafénib/Cobimétinib et l'Atezolizumab, un anti-PD-L1, a montré des résultats très encourageants, avec une augmentation de la survie sans progression qui passe de 10,6 mois, avec la combothérapie, à 15,1 mois avec l'ajout de l'Atezolizumab (Gutzmer et al., 2020). L'utilisation d'une combinaison entre les immunothérapies et les thérapies ciblées semble donc très prometteuse pour les patients atteints de mélanomes avancés et métastatiques.

IV. Les mécanismes de résistance thérapeutique

A. La résistance thérapeutique intrinsèque

La résistance thérapeutique constitue un obstacle majeur à la prise en charge efficace et durable des patients atteints de mélanome métastatique. On distingue deux types de résistance aux traitements actuels : la résistance innée et la résistance acquise. La résistance innée concerne 10% des patients pour les thérapies ciblées et 20% pour les immunothérapies. La résistance peut également être acquise en réponse au traitement. De ces deux types de résistance, on distingue les mécanismes de résistance intrinsèques, c'est-à-dire résultant de modifications internes à la cellule tumorale, et les mécanismes de résistance extrinsèques font intervenir le microenvironnement tumoral.

a) Résistance aux thérapies ciblées

Le ciblage de BRAF^{V600} dans le mélanome par les thérapies ciblées mène à des mécanismes de résistance qui peuvent être classés en deux groupes : les mécanismes génétiques et les mécanismes non génétiques, qui concernent des modifications épigénétiques ou transcriptomiques. Les mécanismes de résistance génétiques concernent 51 à 58% des patients (Arozarena and Wellbrock, 2017; Kakadia et al., 2018). Ces deux types de résistance mènent soit à la réactivation de la MAPK ERK, soit à l'augmentation de l'expression de MITF, soit à l'activation de voies de survie alternatives comme la voie PI3K/AKT ou la voie c-Jun (figure 45).

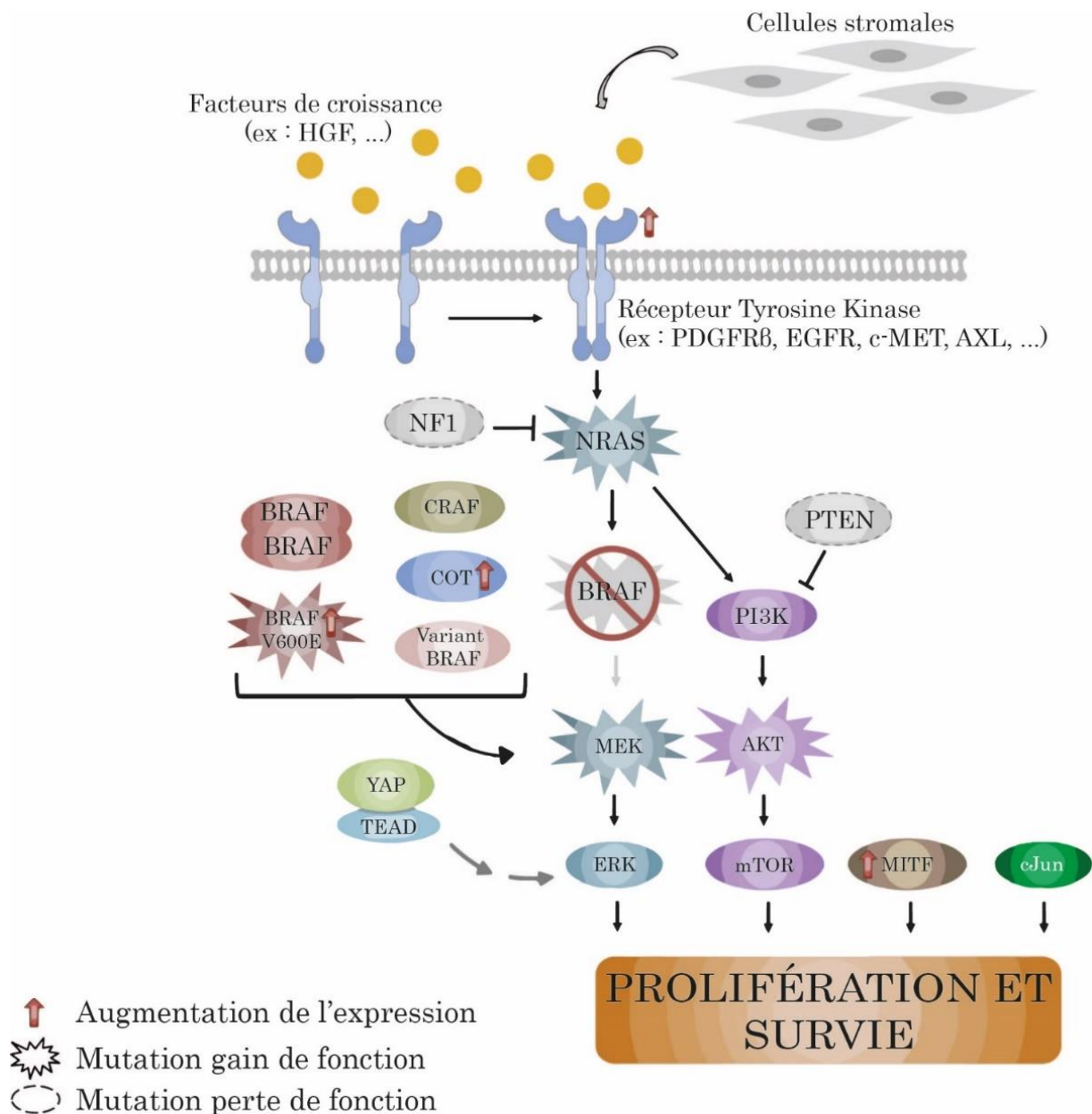


Figure 45 : Mécanismes de résistances intrinsèques aux thérapies ciblées avec la réactivation de la voie des MAPK ERK et l'activation de la voie PI3K/AKT

1. Réactivation de la voie des MAP Kinases ERK

Bien que les inhibiteurs de BRAF et de MEK inhibent efficacement la voie MAPK en diminuant l'activation de ERK et donc la prolifération des cellules portant la mutation BRAF^{V600}, une réactivation de cette voie a lieu dans 80% des cas de résistance aux thérapies ciblées. Les tumeurs dépendent donc fortement de la voie MAPK ERK et s'adaptent rapidement à son inhibition (Moriceau et al., 2015). Les principaux mécanismes de réactivation de la voie MAPK ERK sont des altérations sur BRAF, NRAS, MEK ou NF1 (figure 45). Parmi les altérations de BRAF, on retrouve une amplification du gène *BRAF* (Shi et al., 2012), la production d'une forme tronquée de BRAF (Poulikakos et al., 2011) qui empêche la liaison de l'inhibiteur ou une mutation secondaire (Wagenaar et al., 2014). Des mutations activatrices, en amont de BRAF, sur NRAS activent la voie MAPK ERK en utilisant un autre isoforme de RAF (CRAF), contournant ainsi l'inhibition de BRAF (Nazarian et al., 2010). Ces mutations (Q61K et Q61R) sont similaires à celles retrouvés dans les tumeurs primaires mutées NRAS. Des mutations activatrices sur MEK1 et MEK2, en aval de BRAF, peuvent également permettre la résistance (Villanueva et al., 2013). Des mutations pertes de fonction de NF1 entraînent une résistance chez les patients (Whittaker et al., 2013). De plus, l'expression de l'isoforme CRAF permet aussi de réduire la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF conduisant ainsi à la résistance via l'activation directe de MEK (Doudican and Orlow, 2017). La kinase COT, appelée aussi MAP3K8, peut activer directement MEK de façon indépendante de RAF (Gruosso et al., 2015). La kinase ERK peut être activée par d'autres voies que la voie MAPK, notamment la voie YAP-TAZ. En effet, une étude de l'équipe du Dr Eckert a montré que les protéines YAP, TAZ et TEAD sont impliqués dans le maintien de la phosphorylation de ERK malgré l'inhibition de la voie par le Vémurafénib (Fisher et al., 2017). De même, la mutation de la GTPase RAC1 (P29S) permet la réactivation de ERK (Krauthammer et al., 2012). Selon la mutation que l'on retrouve sur NRAS, cette dernière peut induire l'activation d'une voie de survie alternative : la voie PI3K/AKT (Grill and Larue, 2016).

2. Activation de voies de survie alternatives à la voie des MAP-Kinases

i. La voie PI3K/AKT

En plus de la voie MAPK ERK, la voie PI3K/AKT est la plus communément activée dans la résistance des mélanomes (figure 45). Une augmentation de la voie PI3K peut être due à la perte de fonction par délétion ou mutation de PTEN, dans 10% des cas de mélanomes, ou par la surexpression de différents récepteurs tyrosine kinase (RTK) (Nazarian et al., 2010; Paraiso et al., 2011). L'accumulation des RTK à la surface de la cellule augmente des voies de prolifération et de survie permettant aux cellules de passer outre l'inhibition de la voie ERK (Miller et al., 2016).

Les RTK dont l'expression est augmentée en réponse aux thérapies ciblées sont l'IGFR, MET (récepteur du HGF), PDGFR β ou EGFR (Nazarian et al., 2010; Straussman et al., 2012; Villanueva et al., 2010). La surexpression de ces différents récepteurs a été montré au niveau transcriptomique dans l'étude de Nazarian *et al.* De plus, à la suite du traitement avec les inhibiteurs de BRAF, le récepteur ERBB3 devient hyper phosphorylé, ce qui mène à la survie des cellules de mélanome mutées BRAF par l'activation de AKT (Abel et al., 2013). Le récepteur ALK est également surexprimé dans les mélanomes résistants. Quand ALK est activé par son ligand FAM150A, il active la voie PI3K/AKT qui va conférer une résistance aux inhibiteurs de BRAF (Janostiak et al., 2019). Les cellules de mélanome résistantes aux inhibiteurs de BRAF présentent une surexpression de AXL. L'inhibition de AXL entraîne une diminution de l'activité de AKT ainsi qu'une inhibition de la croissance des tumeurs dans un modèle murin de xénogreffes, seulement dans les cellules qui expriment une forme sauvage de PTEN (Boshuizen et al., 2018; Zuo et al., 2018). La voie PI3K est aussi impliquée dans les mécanismes d'échappement à la mort cellulaire en contrôlant l'expression de régulateurs de l'apoptose comme BCL2 ou BIM (Paraiso et al., 2011).

ii. MITF

MITF, le facteur de transcription majeur des mélanocytes, est également un régulateur de gènes anti-apoptotiques comme *BCL2A1* et *BCL2* (Haq et al., 2013). Un taux élevé de MITF permet aux cellules de mélanome d'échapper à la mort cellulaire induite par les inhibiteurs de BRAF et MEK, même lorsque la voie MAPK est complètement bloquée (Wellbrock and Arozarena, 2015). De plus, l'expression de MITF est augmentée en réponse aux thérapies ciblées, de façon dépendante de la voie des MAPK. Cette induction de MITF permet aux cellules d'entrer dans une phase de tolérance à l'inhibition des MAPK dans les étapes précoces des traitements (Smith et al., 2016). A la fois un fort taux et un faible taux d'expression de MITF sont associés à la résistance aux thérapies. Un faible taux de MITF va entraîner l'expression du récepteur AXL et un switch vers un phénotype « dédifférencié – invasif » plus résistant au traitement (Muller et al., 2014). Pour lier ces deux phénotypes, le modèle de « Rhéostat de MITF » a été proposé (Carreira et al., 2006) (figure 46).

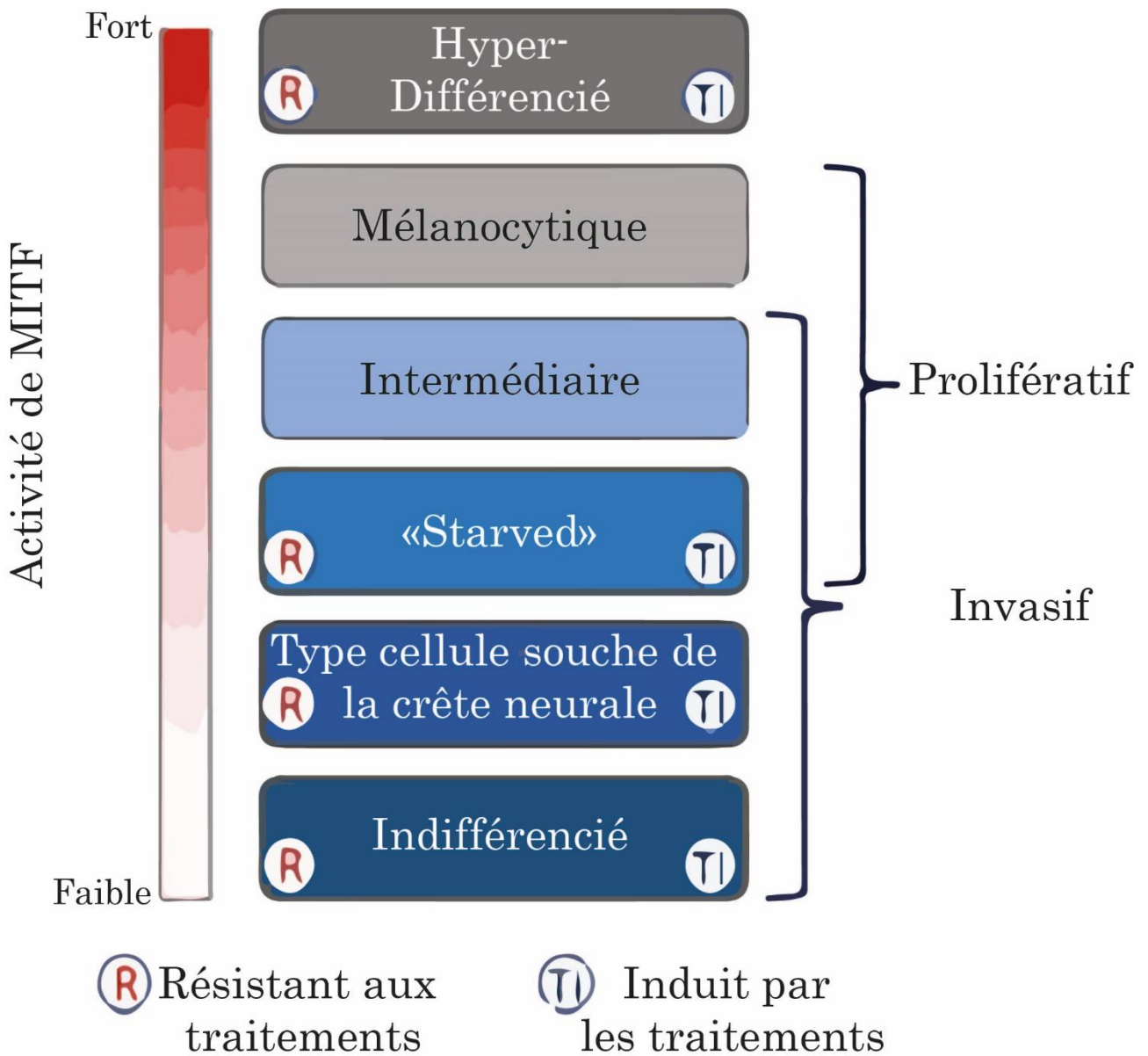


Figure 46 : Le modèle du rhéostat de MITF et le niveau de résistance aux thérapies ciblées associé.

Adapté de (Rambow et al., 2019)

i. La voie c-Jun

c-Jun est le principal facteur de transcription de la famille AP-1 à être impliqué dans la progression du mélanome (cf *plus haut dans ce chapitre*). Ce facteur de transcription joue un rôle important dans la réponse adaptative des cellules aux inhibiteurs de BRAF et de MEK. L'expression de c-Jun est corrélée négativement à celle de MITF, comme cela a été montré dans l'étude de Sun *et al*, où la surexpression de PDGFR β , EGFR et TGFBR est associée à une augmentation de l'activité de c-Jun dans les cellules qui n'expriment pas SOX10 et MITF (Sun et al., 2014). En réponse au Vémurafénib, une induction de c-Jun a été observée dans les cellules mutées BRAF (Delmas et al., 2015). De plus, la surexpression de c-Jun est retrouvée dans les cellules présentant un phénotype de type mésenchymateux invasif (Ramsdale et al., 2015). Enfin, Titz et collaborateurs ont montré que c-Jun est augmenté rapidement dans les cellules sensibles en réponse au Vémurafénib ou Dabrafénib. Son expression élevée se maintient dans les cellules résistantes et en comparant les tumeurs de patients de patients au début du traitement ou au moment de la rechute (Titz et al., 2016).

b) Résistance aux immunothérapies

Les mécanismes de résistance mis en place par les cellules cancéreuses affectent principalement les lymphocytes T. Ceux-ci peuvent entraîner soit la production insuffisante de lymphocytes T antitumoraux, soit leur perte de fonction ou empêcher la production de lymphocytes T mémoires (Jenkins et al., 2018). De nombreuses évidences suggèrent que des voies de signalisation au sein de la cellule tumorale peuvent contribuer à la résistance aux immunothérapies (Kalbasi and Ribas, 2020). D'une manière générale, les cellules de mélanome vont activer des voies de signalisation rendant les lymphocytes T inactifs et cela malgré la présence des immunothérapies. La mutation BRAFV600E peut promouvoir l'immunosuppression grâce à l'augmentation d'expression d'IL-1 (Khalili et al., 2012). Dans des modèles murins de mélanome, la voie β -caténine entraîne une diminution de l'infiltration des cellules T menant à la résistance à la fois aux anti-PD-L1 et aux anti-CTLA-4 (Spranger et al., 2015). La perte de *PTEN* a aussi été corrélée avec la diminution de l'infiltration des lymphocytes T dans le mélanome, associé à un mauvais pronostic pour les patients traités avec les immunothérapies (Peng et al., 2016). Enfin, la voie JAK/STAT3 peut induire une désensibilisation de la cellule tumorale à l'IFN γ produite par les lymphocytes T et induisant normalement un arrêt de la prolifération (Zaretsky et al., 2016). De plus, les populations de cellules exprimant peu de JAK1/JAK2 peuvent également ne pas exprimer le HLA de classe et empêchent donc leur reconnaissance par les lymphocytes T (Sucker et al., 2017) (figure 42).

D'autres facteurs extrinsèques à la tumeur peuvent également intervenir dans la résistance aux immunothérapies. Ces facteurs peuvent être liés à l'hôte comme le type de métabolisme, le microbiote intestinal ou tumoral, ou l'obésité, le diabète ou l'âge. Les facteurs extrinsèques peuvent également provenir des cellules du microenvironnement tumoral comme les CAF, les Treg, les TAM ou les cellules myéloïdes suppressives, qui peuvent sécréter un milieu riche en cytokines immunosuppressives (Chacon et al., 2021 ; Morad et al., 2021) (figure 47).

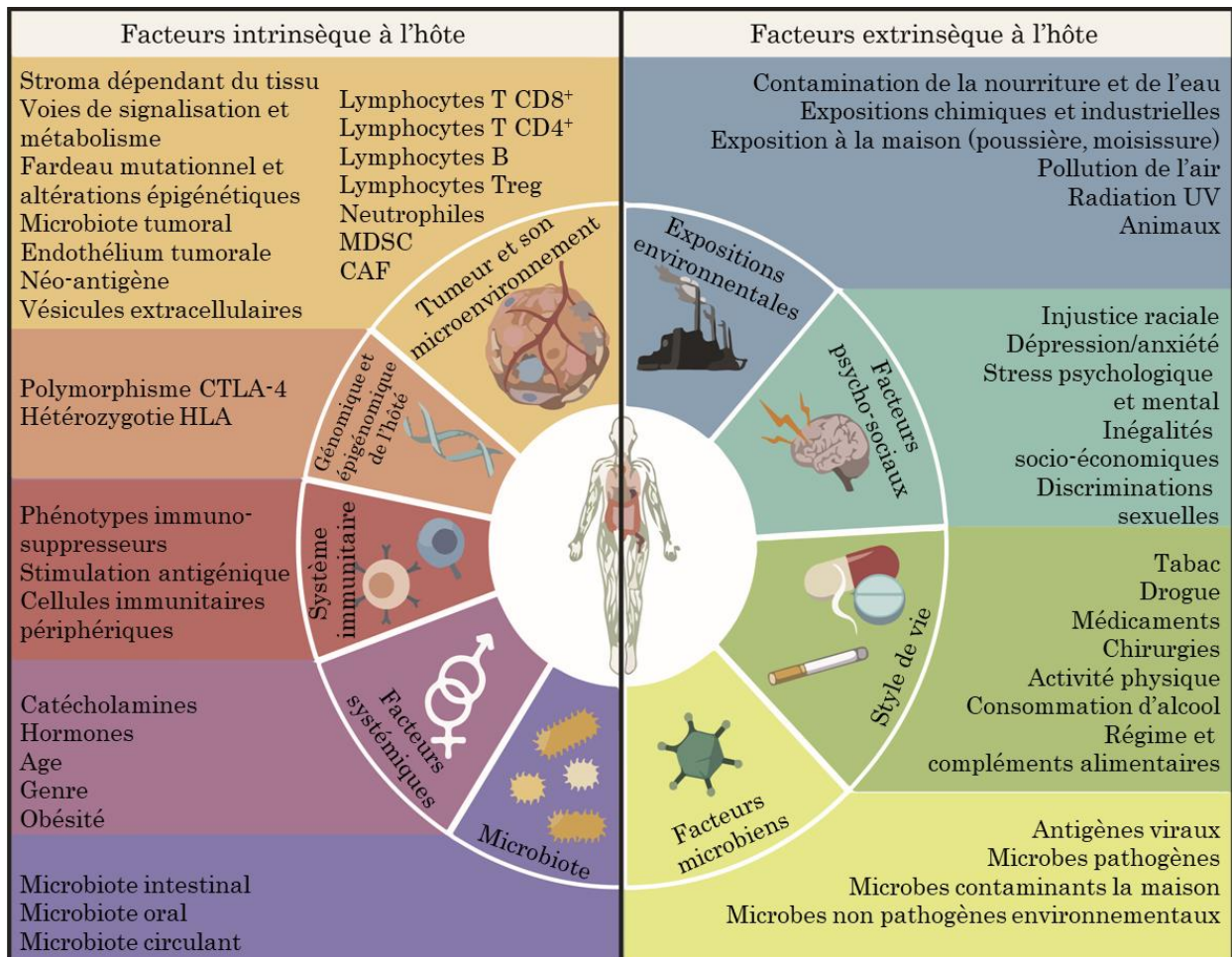


Figure 47 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques dans la résistance aux immunothérapies

Adapté de (Morad et al., 2021)

c) Cross-résistance aux thérapies ciblées et immunothérapies

De plus en plus d'études commencent à définir des mécanismes de résistance croisées aux thérapies ciblées et aux immunothérapies. Les principales études se sont intéressées majoritairement à la résistance aux thérapies ciblées qui a pour conséquence une résistance aux immunothérapies. L'étude de Hugo et *al.* montre que les tumeurs présentant une résistance non-génétique, avec un fort taux de méthylation, sont associées à une augmentation de l'expression de c-MET, de YAP et une diminution de l'expression de LEF1. Cela s'accompagne d'une diminution du nombre de lymphocytes T CD8⁺ dans les tumeurs traitées par les MAPKi (Hugo et al., 2015). Dans une seconde étude de cette équipe, ils montrent que la signature transcriptomique obtenues dans les tumeurs résistantes aux immunothérapies est similaire à celle obtenues après traitement avec les thérapies ciblées (Hugo et al., 2016).

Une autre étude a montré que la voie ROCK/Myosine II est importante dans la résistance aux thérapies ciblées et aux immunothérapies. Les thérapies ciblées induisent l'activation de cette voie de signalisation et rendent les cellules de mélanome résistantes aux immunothérapies. Le ciblage de la voie ROCK/Myosine II resensibilise les cellules aux thérapies ciblées à cause de l'apparition de ROS léthaux et de dommage à l'ADN. Le ciblage de cette même voie resensibilise également les cellules aux immunothérapies en limitant l'activité immunosuppressive des cellules cancéreuses sur les cellules immunitaires, notamment en diminuant leur sécrétion de TGFβ (Orgaz et al., 2020).

Une étude récente du laboratoire du Dr Obenauf a également montré ce phénomène de cross-résistance aux immunothérapies après traitement et rechute avec les thérapies ciblées (Haas et al., 2021). La résistance aux immunothérapies induite par les thérapies ciblées est due à l'acquisition d'un microenvironnement immunosuppresseur instruit par les cellules tumorales. Ce microenvironnement manque de cellules dendritiques CD103⁺ et leur rajout dans les tumeurs permet d'empêcher la cross-résistance. De façon intéressante, cette résistance ne vient pas seulement de la réactivation de la voie MAPK ERK mais de sa suractivation qui va favoriser l'échappement immunitaire.

Les cellules dédifférenciées MITF^{LOW}/AXL^{HIGH}, qui sont bien décrites comme résistantes aux thérapies ciblées, sont également résistantes aux immunothérapies via la perte du CMH de classe I (Lee et al., 2020).

Ces différentes études permettent de comprendre pourquoi que le traitement en seconde ligne par l'immunothérapie des patients ayant rechuté aux thérapies ciblées n'est pas si efficace. Ces études suggèrent que les patients soient directement traités par les immunothérapies ou alors que le traitement avec les thérapies ciblées soit bref pour éviter les rechutes, avant de passer aux immunothérapies pour traiter les patients ou plus simplement d'utiliser les deux traitements en même temps.

B. La résistance extrinsèque

La résistance conférée par le microenvironnement (Environment-Mediated Drug Resistance, EM-DR) est une forme de résistance non-génétique *de novo* qui protège les cellules tumorales des effets initiaux des thérapies. Des évidences montrent que l'EM-DR provient d'un dialogue réciproque entre les cellules tumorales et le microenvironnement. Il se divise en deux groupes : la résistance conférée par les facteurs solubles présents dans le microenvironnement (Soluble Factor Mediated Drug Resistance, SFM-DR) et la résistance provenant de l'adhésion des cellules à d'autres cellules ou à la MEC du microenvironnement (Cell Adhesion Mediated Drug Resistance, CAM-DR) (figure 48).

a) Résistance conférée par les facteurs solubles

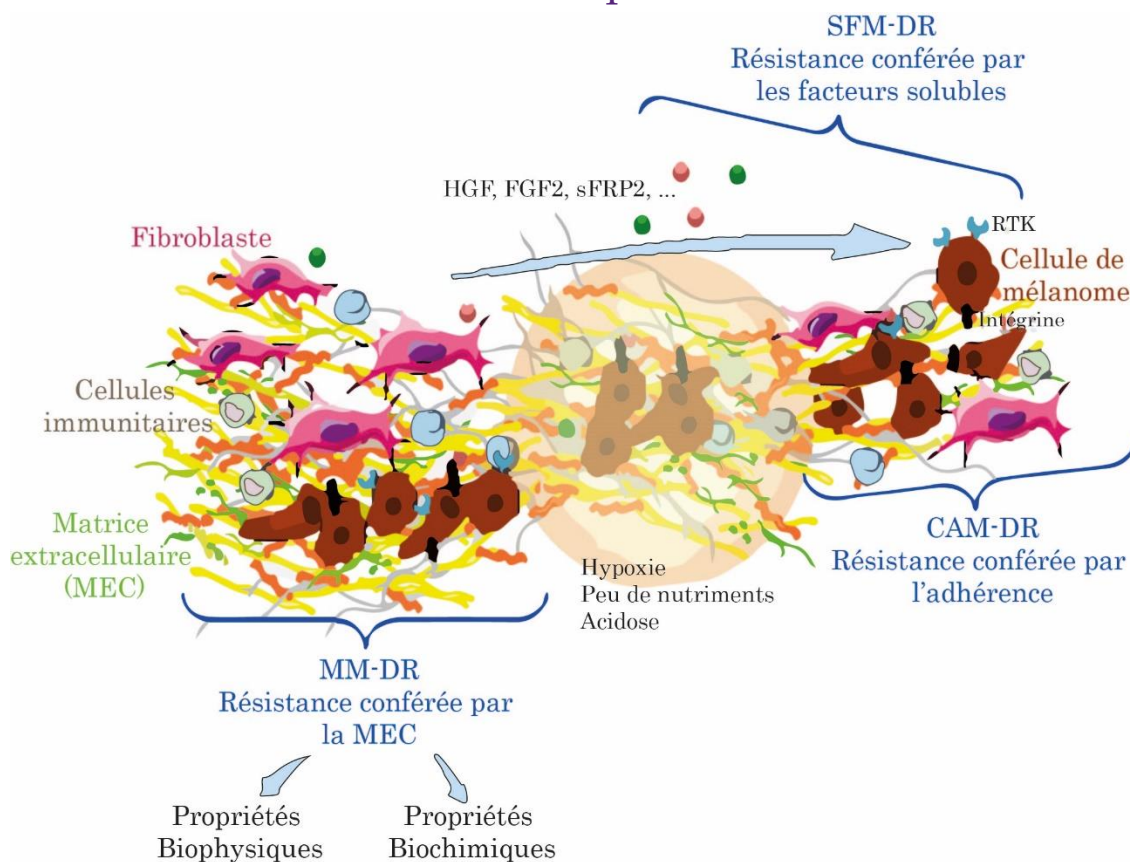


Figure 48 : Les différents types de résistances conférées par le microenvironnement

A l'origine, la résistance conférée par le microenvironnement tumoral concerne la résistance médiée par les facteurs solubles (SFM-DR) et la résistance médiée par l'adhésion cellulaire aux cellules stromales ou à la MEC (CAM-DR). Un nouveau sous-type de la CAM-DR, appelé MM-DR (matrix mediated drug resistance), fait intervenir l'adhésion des cellules à la MEC pour induire la résistance. D'autres facteurs extracellulaires du microenvironnement comme l'hypoxie, la faible teneur en nutriment ou l'acidification du milieu sont également impliqués dans la résistance.

Les cellules stromales produisent de nombreux facteurs solubles incluant des facteurs de croissance, des cytokines ou des métabolites. La résistance conférée par les facteurs solubles du microenvironnement a d'abord été étudiée dans le myélome avec l'IL-6 produite par les cellules stromales de la moelle osseuse (Klein et al., 1995). L'IL-6 et le SDF-1 sont les facteurs les mieux étudiés et décrits pour conférer une résistance à différentes chimiothérapies dans les cancers hématologiques ou épithéliaux (Borsellino et al., 1999; Frassanito et al., 2001; Hartmann et al., 2005).

Etant donné l'important taux d'échecs thérapeutiques lié à la résistance dans le mélanome, le rôle du microenvironnement dans ce processus est très étudié. Ainsi, plusieurs études ont montré le rôle du HGF stromal dans la résistance acquise aux thérapies ciblées (Fedorenko et al., 2015; Straussman et al., 2012). La sécrétion d'HGF, par les fibroblastes notamment, entraîne la réactivation de la voie MAPK ERK et l'activation de la voie PI3K/AKT menant à la résistance des cellules aux inhibiteurs de BRAF. Les cytokines jouent également un rôle important pour ce type de résistance. Le FGF2, sécrété par les fibroblastes et les kératinocytes en réponse au Vémurafénib, entraîne l'activation de la voie STAT3 pour contourner l'inhibition de la voie MAPK (Liu et al., 2013). La sécrétion de sFRP2, un antagoniste de Wnt, par des fibroblastes âgés dans le mélanome, mène à la diminution de β -caténine et de MITF, rendant les cellules plus résistantes aux thérapies ciblées (Kaur et al., 2016). Le sécrétome des cellules tumorales, elles-mêmes, peut favoriser leur résistance. En effet, le traitement au Vémurafénib diminue l'expression du facteur de transcription FRA1 et conduit à la production d'un sécrétome riche et complexe, composé notamment d'IGF-1 ou de HGF, qui active la voie PI3K/AKT (Obenauf et al., 2015).

Les cellules immunitaires, en tant que composants importants du microenvironnement tumoral, ont également été étudiées pour leur rôle dans la résistance thérapeutiques. En effet, à la suite du traitement avec les inhibiteurs de la voie MAPK, le nombre de macrophages augmente ainsi que leur production de TNF α qui va activer la voie NF κ B menant à une augmentation de l'expression de MITF favorisant la résistance aux traitements (Smith et al., 2014). A cause d'une activation paradoxale de la voie MAPK lors du traitement avec les inhibiteurs de BRAF, les macrophages sécrètent également du VEGF qui va réactiver la voie des MAPK dans les cellules de mélanome (Wang et al., 2015a). Les macrophages coopèrent avec les fibroblastes pour mettre en place une niche protectrice permettant aux cellules de mélanomes de résister aux thérapies ciblées (Young et al., 2017). Les lymphocytes B, activés par FGF2 sécrété par les cellules de mélanome, vont produire de l'IGF1, un facteur important pour la résistance du mélanome à la bithérapie ciblée à cause de l'émergence de sous-clones hétérogènes (Somasundaram et al., 2017). De plus, la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF dépend de la localisation de la tumeur, avec une résistance plus importante dans le système nerveux central. Cela est dû à la présence de facteurs comme l'IGF-1, dans le fluide cérébro-spinal, qui activent la voie PI3K (Seifert et al., 2016)

b) Résistance conférée par l'adhérence

1. Adhérence intercellulaire

Quatre décennies plus tôt, Durand et Sutherland ont démontré qu'en comparaison avec des cellules en suspension, des cellules poussant en sphéroïde en 3D sont plus résistantes aux effets cytotoxiques des radiations. En sphéroïdes, les cellules établissent des contacts entre elles qui peuvent expliquer la moindre sensibilité (Durand and Sutherland, 1972). L'interaction avec des cellules stromales peut également avoir un effet sur la réponse thérapeutique. Dans le cancer du sein, les cellules souches mésenchymateuses interagissent avec les cellules cancéreuses, induisant l'expression de HER2 et la diminution de PTEN, activant ainsi la voie PI3K/AKT dans les cellules de cancer du sein pour augmenter la résistance aux chimiothérapies (Daverey et al., 2015). Cette adhérence conférant la résistance se fait grâce à des protéines de surface comme VCAM ou l'intégrine $\beta 1$ (Shain and Dalton, 2009). Notamment, dans le myélome, les cellules tumorales adhèrent aux cellules stromales de la moelle osseuse grâce à l'intégrine $\beta 1$. Cette interaction entraîne la production d'IL-6 par les cellules stromales qui conduit à la résistance des cellules cancéreuses (Shain et al., 2009). Dans le cancer de la prostate ou du sein, l'interaction entre les cellules tumorales et des hépatocytes induit la réexpression de la E-Cadhérine, renforçant ainsi leur résistance à la chimiothérapie lors de métastases hépatiques (Chao et al., 2012). Enfin, dans le mélanome, l'ensemencement des cellules tumorales sur une monocouche de CAF augmente la survie des cellules en réponse à la cisplatine (Flach et al., 2011)

2. Adhérence à la MEC

L'attachement des cellules tumorales à la MEC active diverses voies de signalisation menant à une diminution de la sensibilité aux thérapies anti-cancéreuses. Différentes intégrines et récepteurs des protéines de la MEC comme les DDR ou les syndécans, sont impliqués dans ce type de résistance. La CAM-DR faisant intervenir l'adhérence à la MEC a d'abord été mise en évidence dans le cancer du poumon. En effet, l'étude de Fridman *et al*, a montré que perturber l'adhésion des cellules tumorales à la MEC, en inhibant la liaison de l'intégrine à la laminine à l'aide d'un peptide bloquant, entraîne une diminution de la tumeur (Fridman et al., 1990). Cela a ensuite été montré dans les cancers hématopoïétiques, non solides. La culture de cellules de myélome sur de la fibronectine rend ces cellules plus résistantes aux chimiothérapies (Damiano et al., 1999). Cela indique l'importance des signaux d'adhésion dans la résistance thérapeutique. Des études réalisées dans les cancers leucémiques ont montré que l'adhésion à la fibronectine grâce à l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ provoque la résistance thérapeutique via l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/Bcl-2 (de la Fuente et al., 2002).

L'activation de PI3K par l'intégrine $\beta 1$ induit également la résistance thérapeutique dans différents cancers solides (Hodkinson et al., 2006). De plus, l'augmentation de la production d'une MEC altérée est un marqueur prédictif de mauvais pronostic et d'une forte incidence de rechute (Berube et al., 2005; Sherman-Baust et al., 2003). L'augmentation de l'acide hyaluronique produit par les CAF augmente la résistance aux thérapies dans le cancer du sein (Misra et al., 2003).

Concernant le rôle de la MEC dans la résistance aux thérapies ciblées pour le mélanome, l'équipe du Dr Sahai a montré que le Vémurafénib permet l'augmentation de la production et du remodelage de la MEC (notamment la fibronectine) par les fibroblastes. Sur cette MEC remodelée, les cellules tumorales activent la voie intégrine $\beta 1$ /FAC/SRC menant à la réactivation de MEK et ERK pour permettre la résistance des mélanomes à l'inhibiteur de BRAF (Hirata et al., 2015).

L'augmentation d'expression de la fibronectine a également lieu dans les cellules de mélanome en réponse aux thérapies ciblées. L'induction de la fibronectine provoque l'activation de la voie AKT et le maintien de MCL1 via les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et donc la résistance dans les cellules de mélanome mutées BRAF et délétées pour PTEN (Fedorenko et al., 2016). L'expression de la fibronectine en réponse aux thérapies ciblées peut également se faire via la voie MAPK p38 et intégrine $\beta 1$ pour permettre aux cellules de survivre aux traitements (Afasizheva et al., 2016). Le phénotype dédifférencié, mésenchymateux, invasif établi en réponse aux inhibiteurs de BRAF est associé à la production importante de protéines matricielles comme le collagène de type I, la fibronectine, la thrombospondine et le perlécane (Girard et al., 2020; Titz et al., 2016) (*Article 1*) (Diazi et al., 2021; Diazi et al., 2020) (*Annexe III*). De plus, les cellules de mélanome sont capables de produire une MEC rendant les cellules résistantes aux thérapies ciblées (Girard et al., 2020; Lecacheur et al., 2020) (*Article 1*). Des hydrogels 3D composés de fibronectine ou de laminine protègent les cellules des effets antiprolifératifs des inhibiteurs de la voie MAPK (Blehm et al., 2015; Hirata et al., 2015).

Une récente étude de notre laboratoire a montré le rôle de la MEC produite par les CAF dans la résistance des mélanomes induite par les thérapies ciblées. La protection conférée par la MEC des CAF se fait par les récepteurs au collagène DDR1 et DDR2 qui s'assemblent en clusters linéaires en réponse aux thérapies ciblées. Les DDR activent la voie de signalisation NF κ B2 non canonique pour induire la résistance des cellules de mélanome (Berestjuk et al., 2019) (*Annexe II*).

La MEC peut servir de barrière qui empêche les traitements d'atteindre la tumeur. Le collagène de type I diminue l'assimilation des chimiothérapies dans les cancers du sein ou du colon (Loeffler et al., 2006), de même que l'HA (Provenzano et al., 2012). La MEC peut aussi empêcher le contact entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires, participant ainsi la résistance aux immunothérapies (Peranzoni et al., 2013).

C. Cibler le switch phénotypique pour améliorer la réponse thérapeutique

Comme décrit précédemment, le switch phénotypique du mélanome est le reflet de leur grande plasticité et de leur capacité d'adaptation à un stress, comme les thérapies ciblées. Le switch phénotypique est induit par des facteurs du microenvironnement tumoral et est un mécanisme important d'échappement thérapeutique du mélanome, à la fois aux thérapies ciblées et aux immunothérapies.

Basées sur les connaissances du switch phénotypique du mélanome, des stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées pour améliorer la prise en charge du mélanome. Pendant les premières semaines du traitement, les cellules présentent un fort taux de MITF et pourraient être ciblées à l'aide d'inhibiteurs diminuant l'expression de MITF (Smith et al., 2016). La population cellulaire à faible prolifération AXL^{high} a été identifiée comme étant augmentée pendant la rechute des patients (Smith et al., 2017; Tirosh et al., 2016). Le ciblage de AXL à l'aide d'un anticorps bloquant (AXL-107-MMAE) permet d'éradiquer la population AXL^{high} résistante. La combinaison de ce dernier avec les inhibiteurs de la voie MAPK permet d'éliminer à la fois les cellules sensibles aux thérapies ciblées et celles qui y résistent, ciblant ainsi des populations distinctes au sein de la tumeur, dans un modèle de xénogreffes de tumeurs de patients atteints de mélanome. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie MAPK induit l'expression de AXL, potentialisant l'efficacité de l'anticorps bloquant anti-AXL (Boshuizen et al., 2018).

Les approches pour cibler les cellules de phénotype invasif pourraient également prendre en compte le fait qu'elles produisent plus de ROS en utilisant des traitements qui stimulent la production de ROS, provoquant ainsi la mort des cellules à cause de la toxicité due à une trop grande quantité de ROS, ou des traitements qui induisent la ferroptose, une forme de mort cellulaire basée sur l'accumulation de produits lipidiques de la peroxydation et de ROS dérivés du métabolisme du fer (Tsoi et al., 2018; Vazquez et al., 2013). De plus une récente étude du laboratoire montre que le Nintédanib, un anti-fibrotique utilisé en clinique pour la fibrose pulmonaire, empêche le switch phénotypique induit par les thérapies ciblées (Diazzi et al., 2021).

V. Conclusion

Le mélanome est capable de s'adapter rapidement à des stress comme les thérapies ciblées en mettant en place différentes stratégies d'adaptation qui peuvent être à la fois intrinsèques (génétiques ou non-génétiques) ou extrinsèques (non-génétiques). Les mécanismes intrinsèques réactivent des voies de survie dans le mélanome tandis que des mécanismes extrinsèques font intervenir le microenvironnement tumoral. Cependant, les voies de signalisation permettant l'adaptation rapide du mélanome aux différents signaux du microenvironnement restent encore peu connues.

OBJECTIFS DE RECHERCHE

Représentant plus de 80% des décès associés au cancer de la peau, le mélanome cutané est un cancer extrêmement agressif à cause de son hétérogénéité, sa plasticité phénotypique, sa forte capacité métastatique et sa résistance aux traitements. Depuis 2010, il existe de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter le mélanome, que sont les thérapies ciblées (combinant inhibiteur de BRAF muté et de MEK) et les immunothérapies. Selon la vitesse de progression de la maladie, les immunothérapies sont préférées aux thérapies ciblées comme traitement de première ligne car leur action est généralement prolongée chez les patients répondeurs. Malheureusement, ces deux types de traitement ne sont pas bénéfiques à tous les patients et beaucoup rechutent à cause de mécanismes de résistance qui se mettent en place. Il est donc important de comprendre ces mécanismes de résistance pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

Ces mécanismes de résistance peuvent être intrinsèques et se développer au sein de la cellule par des processus génétiques ou non-génétiques. Concernant les mécanismes génétiques, dans la majorité des cas, cela permet la réactivation de la voie MAPK ERK malgré l'inhibition de BRAF par des mutations secondaires sur NRAS notamment. Les cellules développant des mécanismes de résistance non-génétiques présentent le plus souvent un phénotype dédifférencié à la suite de reprogrammation transcriptionnelle et/ou épigénétique.

Le mélanome est un cancer très hétérogène avec une capacité d'adaptation importante lui permettant de subir un phénomène de transdifférenciation réversible appelé switch phénotypique. Les cellules peuvent passer d'un phénotype différencié mélanocytaire à un phénotype dédifférencié de type mésenchymateux. Ces deux phénotypes sont notamment caractérisés par des niveaux d'expression opposés du facteur de transcription mélanocytaire MITF et du récepteur tyrosine kinase AXL. Ce phénomène reflète les capacités d'adaptation et de plasticité des cellules de mélanome face aux signaux du microenvironnement et aux traitements anti-cancéreux. D'ailleurs, l'acquisition du phénotype dédifférencié a récemment été décrite comme un mécanisme d'échappement aux thérapies ciblées. Malgré l'importance du « switch phénotypique » dans la progression et l'agressivité des mélanomes, nos connaissances des mécanismes moléculaires et des signaux extracellulaires qui gouvernent la plasticité phénotypique demeurent limitées.

Les mécanismes de résistance extrinsèques font intervenir le microenvironnement et se classent en deux catégories : la résistance conférée par les facteurs solubles et la résistance conférée par l'adhérence à la matrice extracellulaire (MEC). La MEC est un réseau dynamique complexe modifié durant la tumorigenèse qui est produit par les fibroblastes associés aux cancers (CAF) ou par les cellules tumorales. Elle fournit des signaux biochimiques et biophysiques aux cellules pour leur croissance, la formation de métastase ou la résistance thérapeutique notamment dans le cancer du sein, du pancréas ou du foie. Dans le mélanome, le rôle de la MEC et plus particulièrement de ses propriétés biomécaniques dans la résistance, la progression et la plasticité phénotypique du mélanome ont été peu étudiées.

Dans ce contexte, ma thèse s'articule autour de 3 axes principaux. Dans un premier temps, j'ai étudié l'effet de la résistance aux thérapies ciblées du mélanome sur le remodelage du microenvironnement tumoral. Puis j'ai analysé l'influence de la plasticité du mélanome sur sa réponse aux signaux mécaniques de la MEC et les conséquences de ce dialogue sur la propriétés tumorales et la résistance thérapeutique. Et enfin j'ai caractérisé les voies de signalisation activées dans les cellules en réponse à la rigidification de la MEC.

RÉSULTATS

Article 1 :

A feed-forward mechanosignaling loop confers resistance to therapies targeting the MAPK pathway in BRAF mutant melanoma

- Résumé

En réponse aux thérapies ciblées, différents mécanismes de résistance peuvent se mettre en place. Un des mécanismes intrinsèques, appelée résistance génétique, consiste en l'acquisition de mutations au sein de la cellule de mélanome menant à la réactivation de la voie MAPK ERK avec, notamment, une mutation secondaire sur la protéine NRAS. Des mécanismes de résistance non génétiques peuvent également avoir lieu, mettant en jeu une reprogrammation épigénétique ou la présence de facteurs extrinsèques à la cellule tumorale. La plasticité phénotypique de la cellule tumorale participe ainsi à sa résistance thérapeutique. Le phénotype dédifférencié confère une résistance innée aux cellules tumorales, c'est-à-dire une absence de réponse initiale. Le traitement avec les thérapies ciblées peut induire une résistance acquise, en favorisant notamment le switch phénotype vers un état hyper-différencié ou dédifférencié.

La première partie de mon doctorat a consisté à étudier l'impact des mécanismes de résistance mis en place au sein de la cellule tumorale sur son dialogue avec le microenvironnement matriciel. A l'aide de paires de lignées sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF (BRAFi) dont dispose mon laboratoire et de modèles de culture sur hydrogels synthétiques de polyacrylamide de rigidité contrôlée recouverts de collagène, nous avons montré que les mélanomes qui développent une résistance aux thérapies ciblées de type non-génétique dédifférenciée présentent une sensibilité accrue aux changements de rigidité de la MEC comparés aux cellules parentales dont elles dérivent. Leur ensemencement sur substrat rigide stimule leur prolifération et s'accompagne d'un étalement plus prononcé, de la formation d'un plus grand nombre d'adhérences focales, d'un remodelage du cytosquelette d'actine et de l'activation des mécanosenseurs transcriptionnels YAP et MRTF-A. Ce phénotype mécanosensible n'est, en revanche, pas observé dans des cellules de mélanome qui développent une résistance de type génétique avec un phénotype différencié mélanocytaire.

En plus de leur mécanosensibilité accrue, j'ai également pu mettre en évidence que les cellules de mélanome qui développent une résistance acquise dédifférenciée avec une signature $MITF^{LOW}$ - AXL^{HIGH} surexpriment plusieurs marqueurs de CAF tels que α -SMA, FAP1 α ou CAV1. Comme les CAF, elles possèdent des fonctions contractiles dépendantes de la voie RHO/ROCK et de YAP et MRTF-A.

De plus, les cellules résistantes synthétisent et remodelent une matrice extracellulaire fibrillaire riche en fibronectine ou le collagène I qui protège les mélanomes porteurs de mutation de BRAF "naïfs" aux thérapies ciblées. De façon intéressante, le ciblage de YAP ou de MRTF-A inhibe les propriétés contractiles des mélanomes résistants et restaure partiellement leur sensibilité aux thérapies ciblées, démontrant l'importance des voies de la mécanotransduction dans la résistance acquise aux BRAFi.

Une analyse bio-informatique de données provenant de patients avant et après traitement, nous a permis de confirmer que l'acquisition d'une résistance acquise non-génétique s'accompagne d'un phénotype dédifférencié mésenchymateux et de l'expression de protéines matricielles et de protéines des voies de la mécanotransduction.

A la suite de ces résultats, nous avons cherché à savoir si cette reprogrammation mécanique résultait d'une adaptation rapide des cellules sensibles aux inhibiteurs de la voie MAPK ERK. Nos résultats indiquent que le traitement court de cellules de mélanome sensibles mutées BRAF avec un inhibiteur de BRAF ou de son effecteur MEK s'accompagne de l'acquisition d'un phénotype mécanique, avec l'activation des voies YAP et MRTF-A ainsi que des propriétés de CAF comme la contraction de gel ou la production d'une MEC riche en fibres de collagène et fibronectine alignées.

De façon intéressante, comme la MEC produite par les cellules résistantes dédifférenciées, celle produite par les cellules sensibles traitées pendant 7 jours avec des thérapies ciblées confère une résistance thérapeutique à des mélanomes naïfs mutés BRAF, via l'activation de voies mécanotransductrices. En effet, lorsque des cellules de mélanome naïves au traitement sont ensemencées sur des matrices de cellules résistantes ou traitées avec les thérapies ciblées, elles sont protégées de l'effet cytostatique des thérapies ciblées, avec une expression soutenue des protéines de prolifération et d'avancée dans le cycle cellulaire telles que la forme phosphorylée de Rb ou la protéine Survivine. De plus, les cellules de mélanome naïves ensemencées sur matrice de cellules résistantes, présentent une activation des voies YAP et MRTF dont le ciblage empêche la résistance conférée par la matrice.

Enfin, nous avons confirmé dans des modèles de xéno greffe de cellules humaines de mélanome mutées BRAF qu'un traitement par le BRAFi augmente le dépôt et l'organisation de la MEC, menant à un environnement pro-fibrotique et à une rigidification de la tumeur. Ce remodelage matriciel a été confirmé dans un modèle de xéno greffes de biopsies de patients (PDX, patient-derived xenograft) traitées à la combothérapie inhibiteur de BRAF et inhibiteur de MEK. Dans le modèle de xéno greffe de lignées cellulaires, l'inhibition pharmacologique de YAP par la Vertéporfine inhibe le remodelage matriciel pro-fibrotique induit par le BRAFi et améliore l'effet des thérapies ciblées. Ainsi, l'inhibition de la voie oncogénique BRAF alimente une boucle mécanique de rétroaction positive où YAP et MRTF favorisent la production d'une MEC permissive aux thérapies. Ce travail montre le lien original entre mécanotransduction et résistance et qu'un traitement au BRAFi induit une reprogrammation biomécanique des cellules de mélanome.

A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma



Christophe A. Girard^{1,2}, Margaux Lecacheur^{1,2}, Rania Ben Jouira^{1,2}, Ilona Berestjuk^{1,2}, Serena Diazzi^{1,2}, Virginie Prod'homme^{1,2}, Aude Mallavialle^{1,2}, Frédéric Larbret^{1,2}, Maéva Gesson^{1,2}, Sébastien Schaub³, Sabrina Pisano⁴, Stéphane Audebert⁵, Bernard Mari⁶, Cédric Gaggioli⁴, Eleonora Leucci^{7,8}, Jean-Christophe Marine^{9,10}, Marcel Deckert^{1,2}, and Sophie Tartare-Deckert^{1,2}

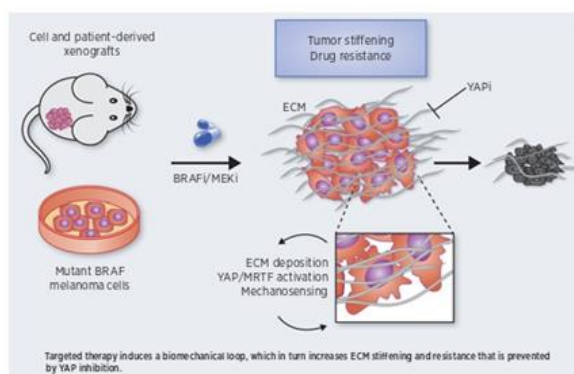
ABSTRACT

Aberrant extracellular matrix (ECM) deposition and stiffening is a physical hallmark of several solid cancers and is associated with therapy failure. BRAF-mutant melanomas treated with BRAF and MEK inhibitors almost invariably develop resistance that is frequently associated with transcriptional reprogramming and a dedifferentiated cell state. Melanoma cells secrete their own ECM proteins, an event that is promoted by oncogenic BRAF inhibition. Yet, the contribution of cancer cell-derived ECM and tumor mechanics to drug adaptation and therapy resistance remains poorly understood. Here, we show that melanoma cells can adapt to targeted therapies through a mechanosignaling loop involving the autocrine remodeling of a drug-protective ECM. Analyses revealed that therapy-resistant cells associated with a mesenchymal dedifferentiated state displayed elevated responsiveness to collagen stiffening and force-mediated ECM remodeling through activation of actin-dependent mechanosensors Yes-associated protein (YAP) and myocardin-related transcription factor (MRTF). Short-term inhibition of MAPK pathway also induced mechanosignaling associated with deposition and remodeling of an aligned fibrillar matrix. This provided a favored ECM reorganization that promoted tolerance to BRAF inhibition in a YAP- and MRTF-dependent manner. Matrix remodeling and tumor stiffening were also observed *in vivo* upon exposure of BRAF-mutant melanoma cell lines or patient-derived xenograft models to MAPK pathway inhibition. Importantly, pharmacologic targeting of YAP reversed treatment-induced excessive collagen deposition, leading to enhancement of BRAF inhibitor efficacy. We conclude that MAPK pathway targeting

therapies mechanically reprogram melanoma cells to confer a drug-protective matrix environment. Preventing melanoma cell mechanical reprogramming might be a promising therapeutic strategy for patients on targeted therapies.

Significance: These findings reveal a biomechanical adaptation of melanoma cells to oncogenic BRAF pathway inhibition, which fuels a YAP/MRTF-dependent feed-forward loop associated with tumor stiffening, mechanosensing, and therapy resistance.

Graphical Abstract: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/80/10/1927/F1.large.jpg>



Introduction

Reciprocal feedback between the ECM and tumor cells influence the hallmarks of cancer by providing biological abilities to malignant cells that are required for growth, survival, and dissemination. The ECM is a

dynamic network of macromolecules with distinctive biochemical and mechanical properties that plays a major role in establishing tumor niches (1). Increased ECM deposition, fiber alignment, and covalent cross-link between collagen molecules lead to tumor stiffening, which

¹Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France. ²Équipe labellisée Ligue Contre le Cancer 2016, Nice, France. ³Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV, Nice, France. ⁴Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, IRCAN, Nice, France. ⁵Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille, France. ⁶Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, Sophia Antipolis, France. ⁷Laboratory for RNA Cancer Biology, Department of Oncology, KU Leuven, Leuven, Belgium. ⁸TRACE, LKI Leuven Cancer Institute, KU Leuven. ⁹Laboratory For Molecular Cancer Biology, VIB Center for Cancer Biology, VIB, Leuven, Belgium. ¹⁰Department of Oncology, KU Leuven, Leuven, Belgium.

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

C.A. Girard, M. Lecacheur, and R. Ben Jouira contributed equally as the co-first authors of this article.

M. Deckert and S. Tartare-Deckert contributed equally as the co-last authors of this article.

Corresponding Authors: Sophie Tartare-Deckert, Inserm UMRI065, C3M, Bâtiment ARCHIMED, 151 route Saint-Antoine de Ginestiere, Nice 06204, France. Phone: 33-4-89-06-43-10; E-mail: tartare@unice.fr; and Marcel Deckert, deckert@unice.fr

Cancer Res 2020;80:1927-41

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2914

©2020 American Association for Cancer Research.

Girard et al.

has been associated to an elevated risk of cancer and poor clinical outcome in patients with breast or pancreatic cancers (2, 3).

Cancer-associated fibroblasts (CAF) are the main producers of tumorigenic ECM and function like myofibroblasts during wound healing and fibrosis (4). Cells apply contractile forces to sense the physical environmental stiffness through integrin-based focal adhesion (FA) complexes that connect the actin-myosin cytoskeleton with the ECM (2, 5). Matrix rigidity also leads to enhanced nucleus localization and activity of the mechanical-responsive Yes-associated protein (YAP) transcriptional regulator of the Hippo pathway (6). In CAFs, YAP acts as a critical factor regulating force-mediated ECM remodeling towards increased stiffening (7). Similar to YAP, the SRF transcriptional coactivator MRTF is translocated to the nucleus upon actin polymerization and functionally interacts with YAP to coordinate mechanosignaling and CAF contractility (8, 9). Beside, YAP mainly through its interaction with TEAD transcription factors have been shown to promote resistance to RAF/MEK-targeted cancer therapies in tumor cells such as melanoma (10–12).

Because of its resistance to treatment and propensity for metastasis, cutaneous melanoma is one of the most aggressive human cancers (13). Melanoma comprises phenotypically heterogeneous subtypes of cancer cells that can switch between transcriptional programs and differentiation states (14–16). The majority of melanomas display genetic alterations in *BRAF* or *NRAS*, leading to constitutive activation of the MAPK pathway. MAPK pathway inhibitors, such as BRAF inhibitors (BRAFi), MEK inhibitors (MEKi), or their combination, achieve significant clinical benefits in patients with BRAFV600-mutant melanoma. However, most patients relapse within months due to the acquisition of drug resistance attributed to intrinsic genetic and nongenetic changes in melanoma cells. Although genetic resistance frequently result from the reactivation of the MAPK pathway through *de novo* mutations, such as *NRAS* mutations (17, 18), nongenetic mechanisms involve epigenetic and/or transcriptomic changes in tumor cells during the early phase of treatment (19, 20). Such mechanisms often result in a dedifferentiation cell state characterized by downregulation of the master regulator of melanocyte differentiation microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and upregulation of receptor tyrosine kinases (RTK) such as AXL (21–23). In addition, the dedifferentiated resistant MITF^{low}/AXL^{high} population was shown to display a mesenchymal invasive phenotype (24–26). Transcriptional reprogramming of proliferative drug-sensitive melanoma cells into invasive drug-resistant cell population is thus a critical event in acquired resistance to targeted therapies.

Beside tumor cell-autonomous events, there is evidence that extrinsic factors derived from the microenvironment contribute to melanoma resistance to MAPK pathway inhibition. Stromal cells including CAFs and macrophages secrete growth and inflammatory factors, and ECM components such as fibronectin, which contribute to drug tolerance (27–31). Interestingly, melanoma cells have the ability to secrete their own matrix, in particular upon cellular transition to a de-differentiated mesenchymal state occurring in response to BRAF inhibition (20, 32, 33). In this study, we asked whether melanoma cell-derived ECM impacts on tumor mechanics and contributes to resistance to targeted therapies. We show that both acquired resistance and early adaptation to MAPK signaling inhibition paradoxically induces a force-mediated ECM reprogramming in melanoma cells that increases intrinsic mechanical sensing properties and alters ECM composition and topography. This fuels a mechanical positive-feedback loop where melanoma cell-derived ECM and YAP/MRTF intracellular pathways play a

pivotal role and that could favor the reservoir of therapy-resistant cells.

Materials and Methods

Cells and reagents

Melanoma cell lines 501Mel and MNT1 were obtained as described previously (34, 35). 1205Lu cells were from Rockland. Isogenic pairs of vemurafenib-sensitive (P) and -resistant (R) cells (M229, M238, M249) were provided by R. Lo (21). Cells were cultured in DMEM plus 7% FBS (Hyclone). Resistant cells were continuously exposed to 1 μ Mol/L vemurafenib. Cell lines were used within 6 months between resuscitation and experimentation. Cell lines were authenticated via STR profiling (Eurofins Genomics) and were routinely tested for the absence of *Mycoplasma* by PCR. For live imaging, M238P, 501Mel, and 1205Lu were transduced with NuLight Red lentivirus reagent (Essen Bioscience) and selected with puromycin (1 μ g/mL). Culture reagents were purchased from Thermo Fisher Scientific. BRAFi (PLX4032, vemurafenib), MEKi (GSK1120212, trametinib), and ROCK inhibitor Y27632 were from Selleckem. YAP inhibitor verteporfin was from Sigma.

RNAi studies

siGENOME siRNA SMARTpools for YAP1, MRTFa, and nontargeting control were from Dharmacon (Horizon Discovery). Fifty nmol/L of either siRNA pool was transfected using Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), following the manufacturer's protocol.

Immunoblot analysis and antibodies

Cell lysates were subjected to immunoblot analysis as described previously (35). The following antibodies were used at dilution of 1:1,000, unless otherwise stated: type I collagen and smooth muscle actin- α (α SMA) (Abcam); TAGLN2 (Genetex); PDGFR β (Cohesion Biosciences); EGFR and LOXL2 (Bio-Techne); LOX (Novus Biological); MITF (Thermo Fisher Scientific); fibronectin, thrombospondin (TSP1), β 1 integrin, FAK, paxillin, FAP, and MRTF (BD Biosciences); SPARC (Haematologic Technologies); ERK1/2, HSP90, HSP60, MLC2 (Santa Cruz Biotechnology); AXL, YAP, phospho-paxillin (Y118), phospho-ERK1/2 (T202/Y204), phospho-Rb (S807/811), Rb, p27KIP1, caveolin-1, survivin, and tubulin (Cell Signaling Technology).

Generation of cell-derived ECM and drug-protection assays

Three-dimensional (3D) ECMs were generated as described previously (36). Briefly, gelatin-coated culture dishes were seeded with cells and cultured for 8 days in complete medium, supplemented with 50 μ g/mL ascorbic acid every 48 hours. Cell cultures were then washed with PBS and matrices were denuded following a 2-minute treatment with prewarmed extraction buffer (PBS 0.5% Triton X-100, 20 μ Mol/L NH₄OH). Matrices were then gently washed several times with PBS. For drug-protection assays, melanoma cells were seeded onto decellularized matrices for 24 hours, and cultured for another 48-hour period in presence or not of indicated drugs.

Cell proliferation

Cell-cycle profiles were determined by flow cytometry as described previously (34). Proliferation was measured by a MTS conversion assay (34) or followed by live imaging of NuLight Red-stained cells using the InCuCyte ZOOM system (Essen BioScience) or by nuclei quantification of Hoescht-stained cells.

Cell contraction assay

A total of 5×10^4 melanoma cells were embedded in 100 μ L of collagen I/Matrigel and seeded on a glass bottom 96-well plate (MatTek). Once the gel was set (1 hour at 37°C), cells were maintained in DMEM 10% FBS with or without indicated drugs. Gel contraction was monitored at day 3. The gel area was measured using ImageJ software and the percentage of contraction was calculated using the formula $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter})/\text{well diameter}$ as described (37).

Traction force microscopy

Contractile forces were assessed by traction force microscopy (TFM) as described (38) using collagen-coated polyacrylamide hydrogels with shear modulus of 4 kPa coated with red fluorescent beads (SoftTrac; Cell Guidance Systems). Cells were plated on bead-conjugated gels for 48 hours. Images were acquired before and after cell removal using a fluorescence microscope (Leica DMI6000, $\times 10$ magnification). Traction forces exerted by cells were estimated by measuring beads displacement fields, computing corresponding traction fields using Fourier transformation and calculating root-mean-square traction using the particle image velocity plugin on ImageJ. The same procedure was performed on a cell-free region to measure baseline noise.

Immunofluorescence analysis

Cells were grown on collagen-coated polyacrylamide/bisacrylamide synthetic hydrogels with defined stiffness as described (39), then rinsed, fixed in 4% formaldehyde, and incubated in PBS 0.2% saponin 1% BSA in PBS for 1 hour with 1:100 dilution of the indicated primary antibodies. Following incubation with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1,000), hydrogels were mounted in Prolong antifade (Thermo Fisher Scientific). F-actin was stained with Texas Red-X or Alexa Fluor-488 phalloidin (1:100; Thermo Fisher Scientific). Nuclei were stained with DAPI. Images were captured on a widefield microscope (Leica DM5500B, $\times 40$ magnification). Cell area and roundness and orientation of fibronectin fibers were assessed on immunofluorescence images using ImageJ. Nuclear/cytosolic ratio of YAP or MRTF was assessed by measuring the fluorescence intensity of nucleus and cytosol and quantified using ImageJ. The corresponding DAPI staining image was used to delimit nuclear versus cytosolic regions.

Collagen imaging

Collagen deposition and organization were visualized by standard Masson's trichrome staining or picrosirius red staining accordingly to (see Supplementary Materials and Methods for details; ref. 40). Second harmonic generation (SHG) and multiphoton-fluorescence images were acquired on a Zeiss 780NLO (Carl Zeiss Microscopy) with Mai Tai HP DeepSee (Newport Corporation). Acquisitions were achieved simultaneously in backward through 10 \times dry NA 0.45 objective and forward through condenser NA 0.55. Each side is equipped with dual NDD GaAsP detectors (BiG) with 440/10 (for SHG forward and backward) and 525/50 filter (for autofluorescence). Transmission images were acquired with 514 nm laser through the 525/50 filter.

Cell line-derived xenograft tumor models

Mouse experiments were carried out in accordance with the Institutional Animal Care and the local ethical committee (CIEPAL-Azur agreement NCE/2014-179). A total of 1×10^6 melanoma cells were subcutaneously implanted into both flanks of 6-week-old female

athymic nude nu/nu mice (Envigo). When tumor reached 100 mm³, mice were randomly grouped into control and test groups. The BRAFi group received six intraperitoneal injections of vemurafenib (35 mg/kg) over a period of 2 weeks. Verteporfin was delivered intraperitoneally three times per week at 45 mg/kg. Mice in the control group were treated with vehicle. At the end of the experiment, mice were sacrificed, tumors were dissected, weighed, and either snap frozen in liquid nitrogen (for mRNA and protein analysis), in Tissue-Tek O.C.T. (VWR; for AFM analysis) or formalin fixed and paraffin embedded for picrosirius red or Masson's trichrome staining, SHG analysis, and IHC.

Patient-derived xenograft tumor models

Patient-derived xenograft (PDX) models treated or not with the BRAFi-MEKi combination as described previously (see Supplementary Materials and Methods for details; ref. 41) were established by TRACE (PDX platform; KU Leuven) using tissue from melanoma patients undergoing surgery at the University Hospitals KU Leuven. Written informed consent was obtained from all patients and all procedures were approved by the UZ Leuven Medical Ethical Committee (S54185/S57760/S59199) and carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. All procedures involving animals were performed in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee of KU Leuven and within the context of approved project applications P147/2012, P038/2015, P098/2015, and P035/2016. Formalin-fixed and paraffin-embedded tumor biopsies were sectioned for picrosirius red staining.

Elastic modulus measurements

Mechanical properties of tumor sections were analyzed by atomic force microscopy (AFM) as described previously (42) with a Bioscope Catalyst operating in Point and Shoot (Bruker Nano Surfaces), coupled with an inverted optical microscope (Leica DMI6000B; Leica Microsystems Ltd.). The apparent Young's modulus (E_{app}) was measured on unfixed frozen tumor sections using a Borosilicate Glass spherical tip (5 μ m of diameter) mounted on a cantilever with a nominal spring constant of 0.06 N/m (Novascan Technologies). The force-distance curves were collected using a velocity of 2 μ m/s, in relative trigger mode and by setting the trigger threshold to 1 nN. E_{app} values were presented in a boxplot using GraphPad Prism (GraphPad software).

Gene expression omnibus data analysis

Public datasets of human melanoma cell lines developing drug resistance to vemurafenib (M229R and SKMel28R) and double resistance to vemurafenib and selumetinib (M229DDR and SKMel28DDR) were used to analyze gene levels compared with drug-naive parental cell lines (GSE65185; ref. 19). Differential gene expression was also examined in datasets derived from tumor biopsies from melanoma patients before and after development of drug resistance to BRAFi, MEKi, or BRAFi/MEKi combination [GSE50535 (25); Tirosh and colleagues (15)]. Normalized data were prepared using MeV software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism. Unpaired two-tailed Mann-Whitney test were used for statistical comparisons between two groups and Kruskal-Wallis test with Dunn posttests or two-way analysis of variance test with Bonferroni posttests to compare three or more groups. Error bars are \pm SD.

Results

MITF^{low}/AXL^{high} mesenchymal BRAFi-resistant cells display increased mechanoresponsiveness and YAP/MRTF activation

To investigate whether acquired resistance to BRAFi modifies mechanosensing pathways, we exploited models of isogenic pairs of parental (P) and resistant (R) melanoma cells showing either reactivation of MAPK pathway through NRAS mutation (M249R) or upregulation of AXL, EGFR, and PDGFR β RTKs associated with low levels of MITF and reduced differentiation of melanoma cells (M229R, M238R; Supplementary Fig. S1; ref. 20). Cells were cultured on collagen-coated hydrogels with stiffness ranging from 0.2kPa (low), 4kPa (medium) to 50kPa (high; ref. 39). In contrast to parental sublines, a dramatic modification of M238R (Fig. 1A and B) and M229R (Supplementary Figs. S2A and S2B) cell morphology measured by actin reorganization, cell roundness, and area was noticeable upon increased substrate stiffness. In contrast, the shape and actin cytoskeleton of the NRAS-mutated M249R subline and its parent M249P showed no significant changes in response to mechanical stimulation (Fig. 1C and D; Supplementary Figs. S2C and S2D). Importantly, MITF^{low}/AXL^{high} BRAFi-resistant M229R or M238R cells, but not NRAS-mutated M249R cells, exhibited an enhanced capacity to proliferate on a collagen-coated stiff substrate (Fig. 1E; Supplementary Fig. S2E).

The β 1 integrin/FA pathway is essential for ECM mechanosignaling (43). Consistently, when compared with drug-sensitive cells, M238R and M229R cells expressed higher levels of β 1 integrin and increased phosphorylation of FA components, including FAK, p130Cas, and paxillin (Supplementary Fig. S1). In addition, M238R cells displayed higher number of FAs upon increased matrix rigidity compared with parental cells (Supplementary Fig. S3).

YAP and MRTF are critical transcriptional mediators of mechanical signals through partially overlapping signaling pathways and target genes (6, 7, 9, 44). Immunofluorescence analysis of melanoma cells plated on soft or rigid substrates revealed that in contrast to M238P cells, M238R cells showed higher levels of nuclear YAP (Fig. 2A and B) on low stiffness substrate (0.2kPa). Nuclear YAP and MRTF markedly increased in M238R cells plated on medium (4kPa) and high (50kPa) substrate stiffness, whereas translocation of YAP and MRTF was only apparent when parental cells were plated on stiff substrate. Consistently, expression of shared YAP/MRTF target genes paralleled increasing collagen rigidity in M238R, but not M238P cells (Fig. 2C). Furthermore, impairment of the actomyosin cytoskeleton with the ROCK inhibitor Y27632 reduced the nuclear localization of YAP and MRTF in M238R cells plated on high stiffness substrate (Fig. 2D). Accordingly, ROCK inhibition abrogated the expression of two shared YAP/MRTF target genes *CTGF* and *CYR61* activated in M238R cells on stiff substrate (Fig. 2E).

Finally, to evaluate the potential contribution of ECM stiffness-induced YAP/MRTF activation in MITF^{low}/AXL^{high} associated resistance, M238R cells cultured on rigid collagen hydrogels were transfected with siRNA pool targeting YAP or MRTF and treated with increasing doses of BRAFi (vemurafenib). The sensitivity of M238R cells to BRAFi-induced cell proliferation arrest was partially restored upon YAP or MRTF knockdown, suggesting that collagen stiffening through YAP and MRTF activation contributes to acquired resistance (Fig. 2F). Together, these results indicate that the dedifferentiated MITF^{low}/AXL^{high}-resistant cell state is associated with a mechanophenotype.

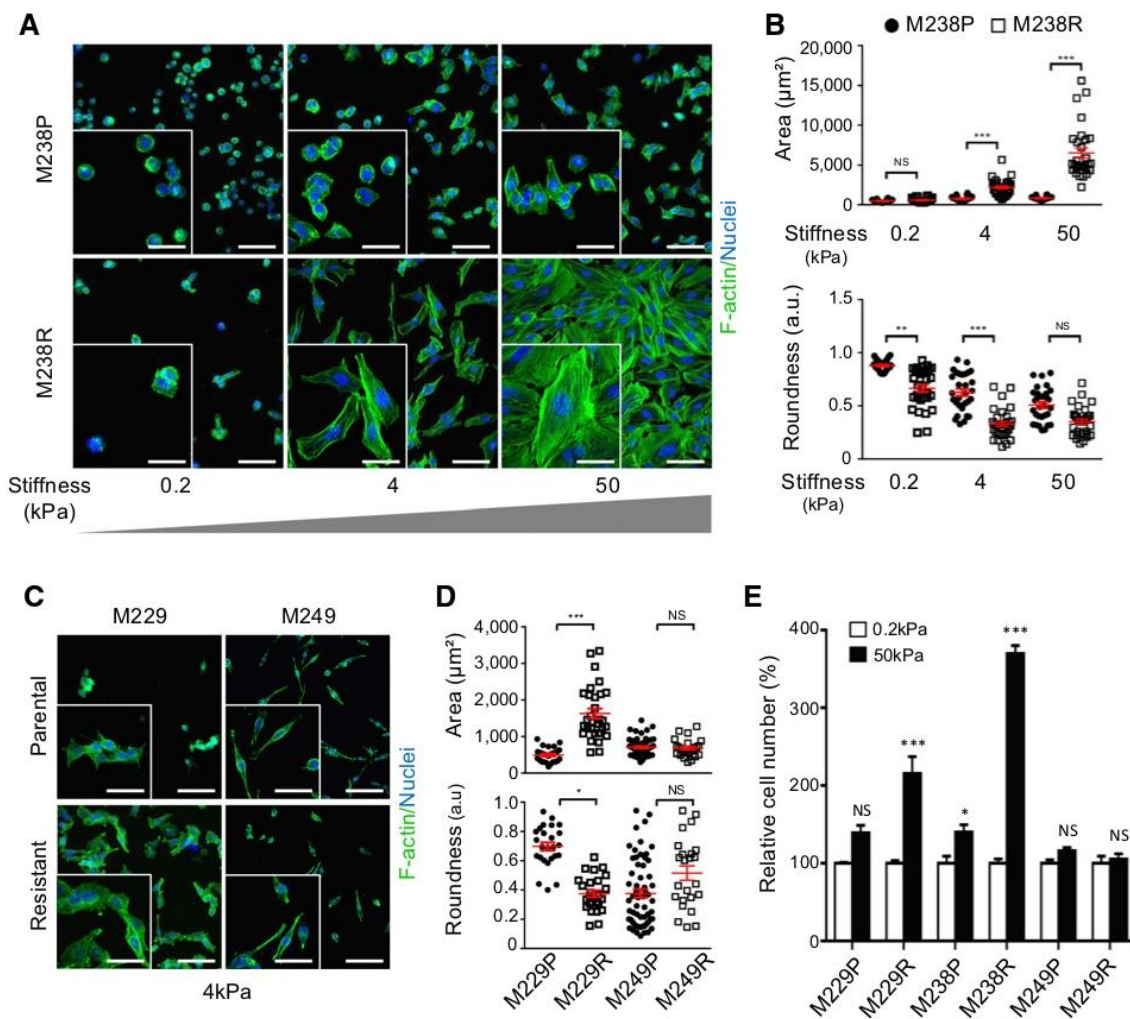
MITF^{low}/AXL^{high} BRAFi-resistant cells display YAP and MRTF-dependent contractile activity and assemble an organized ECM

Further functional analysis of the dedifferentiated MITF^{low} mesenchymal resistant state revealed that M229R and M238R cells were characterized by high expression levels of typical CAF markers such as caveolin-1 (CAV1), myosin light-chain 2 (MLC2), α SMA, fibroblast activation protein (FAP), transgelin-2 (TAGLN2), in addition to ECM proteins collagen 1 (COL1) and fibronectin (Fig. 3A). In contrast, parental and mutant NRAS-driven resistance M249R cell lines showed low or no expression of such markers. We thus examined whether MITF^{low}/AXL^{high}-resistant cells display CAF-associated features such as ROCK-dependent actomyosin contractility and force-mediated ECM remodeling leading to fibers organization (7, 37). We first compared traction stresses generated by sensitive and BRAFi-resistant cells using TFM and observed that M238R cells applied stronger forces on collagen-coated stiff matrices than their drug-sensitive parental counterparts (Fig. 3B). Next, we performed collagen gel contraction assays to assess cell contractility. Contractility in 3D collagen was observed for M238R, but not for M238P cells. Inhibition of ROCK by Y27632 or YAP by Verteporfin reduced the capacity of M238R cells to contract collagen gels to levels that were observed for drug-sensitive M238P cells (Fig. 3C). Moreover, siRNA-mediated knockdown of YAP or MRTF abrogated the contractile activity of drug-resistant M238R cells (Fig. 3D).

Given that increased cellular forces lead to matrix fiber organization and that BRAFi-resistant mesenchymal cells secrete high levels of ECM proteins (20, 21), we analyzed the topography of the fibronectin and collagen network generated by this resistant cellular state. We compared ECM proteins differentially produced and deposited by M238P and M238R cells. Cell-derived 3D matrices were generated, denuded of cells, and analyzed by quantitative mass spectrometry. Compared with M238P cells, M238R cells assembled a matrix that was enriched in ECM glycoproteins (fibronectin, fibrillin-1, thrombospondin-1, and fibulin-1/2), collagens, proteoglycans (versican and biglycan), as well as collagen-modifying enzymes such as transglutaminase 2 and LOXL2 (Supplementary Table S1). Furthermore, in contrast to parental cells, M238R cells assembled fibronectin and collagen fibers oriented in parallel patterns that resembled those produced by TGF β -activated fibroblasts (Fig. 3E). Fibronectin fibers organization was quantified by measuring the relative orientation angle of fibers. The percentages were 16.5%, 23.7%, and 27.8% for M238P, M238R, and fibroblasts 3D ECM, respectively (Fig. 3F). Importantly, the lower degree of ECM production by parental cells was not due to a difference in proliferation as evidenced by nuclear and fibronectin stainings of M238P and M238R cell cultures before the decellularization process (Supplementary Fig. S4). Together, these results suggest that MITF^{low}/AXL^{high} BRAFi-resistant cells display increased traction forces and contractility, leading to aligned organization of ECM fibers.

Given our observations so far, we explored publicly available expression array studies searching for mechanosignaling, and cell contractility gene expression in drug-resistant human melanoma cells. Data extracted from the GEO database (GSE65185; ref. 19) showed increased levels of several YAP/MRTF target genes (*THBS1*, *CYR61*, *CTGF*, *AMOTL2*, *ANKRD1*, and *SERPINE1*) together with high levels of ECM genes (*COL1A1*, *COL1A2*, and *FNI*) and mesenchymal markers (*PDGFRB*, *MYL9*, *ACTA2*, *FAP*, and *TAGLN*) in MITF^{low}/AXL^{high} cells developing drug

Targeted Therapies Mechanically Reprogram Melanoma Cells

**Figure 1.**

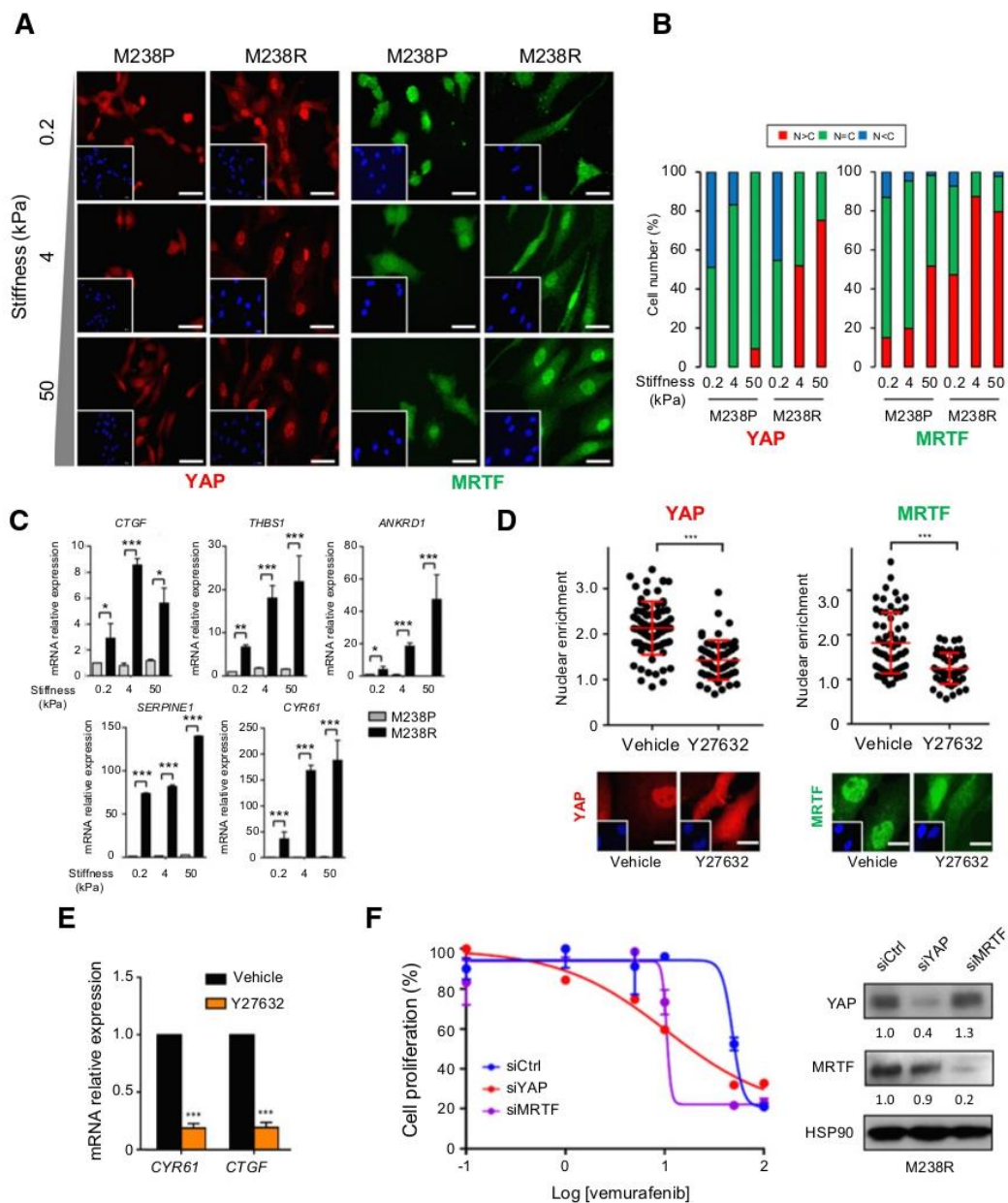
Mesenchymal BRAFi-resistant melanoma cells display increased mechanosensitivity and proliferation on collagen stiff substrate. **A**, Images of parental (M238P) and BRAFi-resistant (M238R) cells after 48-hour culture on collagen-coated hydrogels of increasing stiffness. Staining represents F-actin (green) and nucleus (blue). Scale bar, 100 μm . Insets show higher magnification views. Scale bar, 50 μm . **B**, Quantification of cell morphologic changes. Data are represented as scatter plot with mean \pm SD from a minimum of 10 cells/field from three random fields. Data are representative of three independent experiments. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; Kruskal-Wallis analysis. **C**, Morphology of mesenchymal BRAFi-resistant M229R and of BRAFi-resistant M249R harboring a secondary NRAS mutation cells compared with parental cells, 48 hours after plating on 4 kPa hydrogels. Staining represents F-actin (green) and nucleus (blue). Scale bar, 100 μm . Insets show higher magnification views. Scale bar, 50 μm . **D**, Quantification of cell morphological changes. Data are represented as scatter plot with mean \pm SD from a minimum of 10 cells/field from three random fields. Data are representative of three independent experiments. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis analysis. **E**, Bar plot of cell number quantification of parental and resistant cells cultured for 72 hours on low (0.2 kPa) versus high (50 kPa) stiffness. Cells were counted by Hoechst-labeled nuclei staining. Data were normalized to the parental cells on soft substrate. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$, two-way ANOVA analysis. NS, nonsignificant.

resistance to vemurafenib (BRAFi; M229R and SKMel28R) and double resistance to vemurafenib and selumetinib (BRAFi + MEKi; M229DDR and SKMel28DDR) as compared with drug-sensitive parental cells (Fig. 3G). Moreover, analysis of gene expression on tumor biopsies from patients progressing during therapy with BRAFi and/or MEKi [GSE50535 and Tirosh and colleagues (Supplementary Information); refs. 15, 25] revealed that expression of ECM and mechanosignaling genes markedly increased in a subset of relapsing patients with $\text{MITF}^{\text{low}}/\text{AXL}^{\text{high}}$ expression (Fig. 3G).

Early adaptation to MAPK pathway inhibition induces mechanotransduction pathways, contractility, and ECM fiber organization

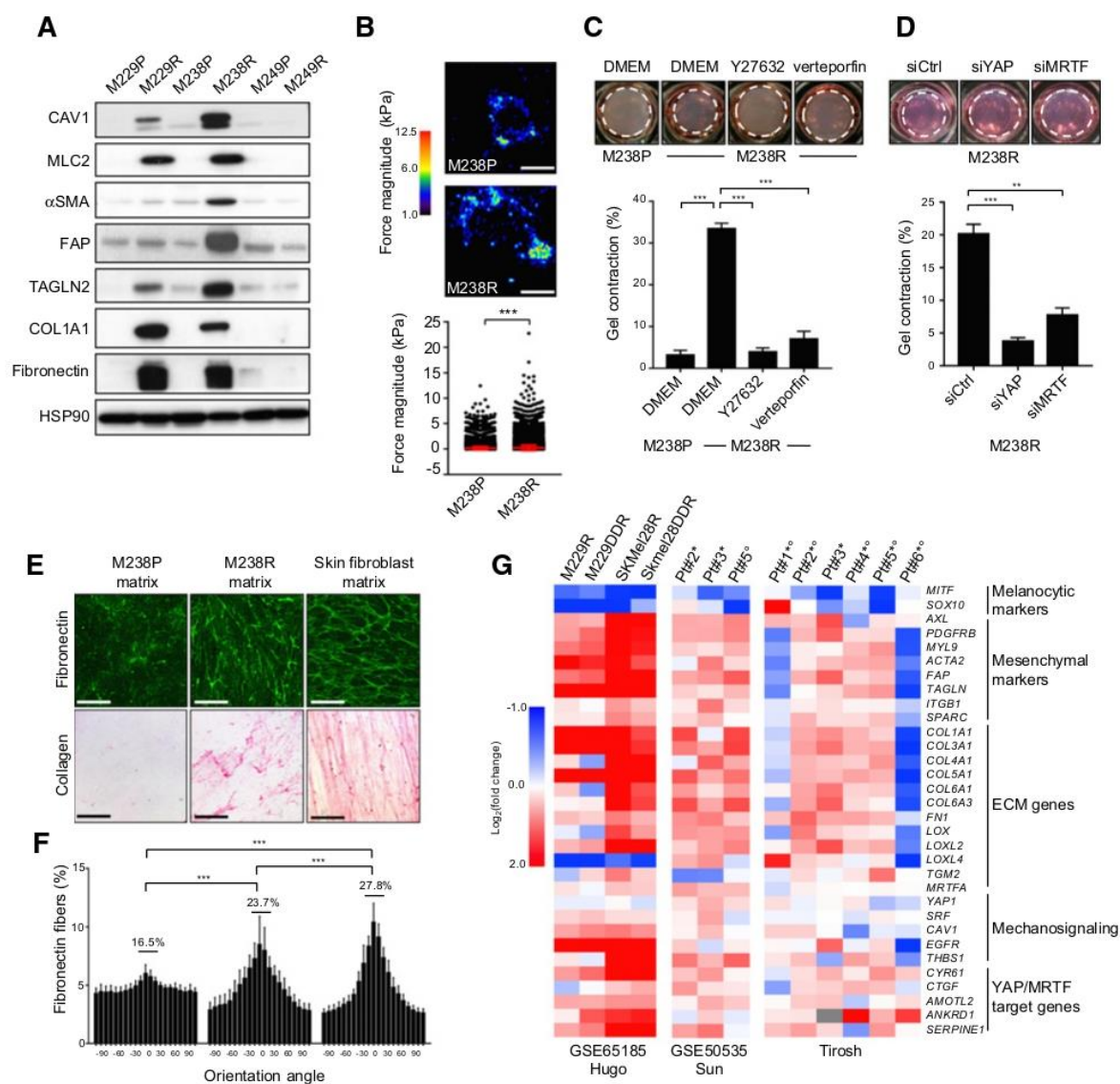
We next questioned whether adaptive response to MAPK pathway inhibition involves mechanosensing pathways and ECM remodeling. BRAF-mutant melanoma cells (1205Lu and M238P) were plated on collagen-coated hydrogels and treated with the BRAFi vemurafenib or the MEKi trametinib (Fig. 4A; Supplementary Fig. S5). In both cases, drug-treated cells displayed pronounced morphological and actin cytoskeleton changes that were accompanied by increased YAP and

Girard et al.

**Figure 2.**

The mechanosensors YAP and MRTF are activated in mesenchymal BRAFI-resistant melanoma cells. **A**, Effect of collagen stiffening on YAP and MRTF nuclear translocation assessed by immunofluorescence in cells cultured for 48 hours on hydrogels of increasing stiffness. Insets show nuclei staining by DAPI. Scale bar, 40 μ m. **B**, Bar graphs show the proportion of cells in which YAP or MRTF was located either in the nucleus (N) or in the cytoplasm (C); $n \geq 30$ cells per condition). Data are representative of three independent experiments. **C**, qPCR analysis of expression of YAP/MRTF target genes in cells plated for 48 hours on hydrogels. Data are normalized to the expression in parental cells plated on soft substrate. Data are represented as mean \pm SD from a technical triplicate representative of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, two-way ANOVA analysis. **D**, M238R cells plated on high stiffness substrate were treated with 10 μ mol/L of Y27632 for 48 hours. Nuclear versus cytoplasmic location of YAP and MRTF was assessed by immunofluorescence. Top, data are represented as scatter plots with mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Data are representative of three independent experiments. ***, $P < 0.001$, Kruskal–Wallis analysis. Top, immunofluorescence images of YAP and MRTF. Insets show nuclei staining by DAPI. Scale bar, 20 μ m. **E**, qPCR analysis of *CYR61* and *CTGF* expression in M238R cells cultured and treated as above. Data are normalized to the expression in vehicle-treated cells. Data are the mean \pm SD from a technical triplicate representative of three independent experiments. ***, $P < 0.001$, two-way ANOVA analysis. **F**, Vemurafenib dose–response curves from MTS proliferation assays of M238R cells transfected with control siRNA (siCtrl), siYAP, or siMRTF. Right, lysates from transfected cells were immunoblotted with indicated antibodies. Densitometric quantification is shown.

Targeted Therapies Mechanically Reprogram Melanoma Cells

**Figure 3.**

Mesenchymal BRAFi-resistant melanoma cells produce an organized ECM fibrillar network through increased contraction forces and contractility. **A**, Immunoblot analysis of myofibroblast markers on lysates from BRAFi-resistant cells and parental cells. **B**, Heat scale plot showing the traction forces applied by cells seeded on 4 kPa fluorescent bead-embedded collagen-coated hydrogels for 48 hours. Scale bar, 25 μ m. Bottom, quantification of contractile forces. Data are the mean \pm SD ($n = 30$ fluorescent bead displacement measured per cell from six cells). ***, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test. **C**, Collagen contraction assays of indicated cells in presence or not of Y27632 (10 μ mol/L) or Verteporfin (1 μ mol/L). Images of assays are shown. Bottom, quantification of gel contraction. Bar graph represents the mean \pm SD of triplicate experiments. ***, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test. **D**, Collagen contraction assays of M238R transfected with a siRNA control (siCtrl), siYAP, or siMRTF. Images of assays are shown. Bottom, quantification of gel contraction. Bar graph is mean \pm SD of triplicate experiments. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. **E**, Fibronectin and collagen staining of decellularized 3D ECM derived from indicated cells. Top, anti-fibronectin immunofluorescence; bottom, picrosirius red staining. Scale bar, 50 μ m. **F**, Quantification of fibronectin fibers orientation. Fibers were visualized as in **E** and their orientation angles plotted as a frequency distribution. Percentages indicate oriented fibers accumulated in a range of $\pm 21^\circ$ around the modal angle. Data are represented as mean \pm SD ($n = 10$ random fields from a duplicate determination). ***, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test. **G**, Heatmap showing the differential expression of selected genes in cells or patient (Pt) biopsies upon BRAFi and/or MEKi treatment. Data were extracted from public datasets of human melanoma cells developing resistance to BRAFi (R) and double resistance to BRAFi/MEKi (DDR) compared with drug-naive cells and from datasets of melanoma biopsies from patients before and after development of resistance to BRAFi (*), MEKi ($^\circ$), or BRAFi/MEKi combination ($^{*\circ}$).

MRTF nuclear localization (Fig. 4A; Supplementary Figs. S5A and S5B), and transcriptional activation of the YAP/MRTF shared target gene *CYR61* relative to untreated cells (Supplementary Fig. S5C). Moreover, drug-treated M238P and 1205Lu cells displayed significantly higher number of FAs with larger size as compared with control cells (Supplementary Fig. S6). We further confirmed that a short-term treatment of cells with either BRAFi or MEKi increased the expression of collagen 1 (COL1) and fibronectin and of the YAP/MRTF target thrombospondin-1 (TSP1), along with reduced phosphorylation of RB and increased expression of p27KIP1, two cell-cycle markers that are modulated by MAPK pathway inhibition (Fig. 4B). Importantly, short-term treatment with BRAFi or MEKi was sufficient to increase the contractile activity of 1205Lu cells embedded in collagen gels (Fig. 4C). Consistently, when cultivated one week in the presence of vemurafenib, 1205Lu cells assembled an organized ECM composed of collagen and fibronectin fibers that were anisotropically oriented, as compared with untreated cells (Fig. 4D). A further indication of the involvement of mechanopathways in adaptation of melanoma cells to MAPK inhibition was brought by the observation that M238P, 1205Lu, and 501Mel cells cultivated on stiff collagen-coated substrates were significantly more resistant to increasing doses of BRAFi as compared with cells cultivated on soft substrates (Fig. 4E). Together, these results demonstrate that melanoma cells rapidly adapt to MAPK pathway inhibition by acquiring an ECM-remodeling contractile phenotype associated with increased mechanosignaling pathways.

Mesenchymal-associated resistance and early adaptation to MAPK pathway inhibition induce the production of a drug-protective ECM

The findings described above support the notion that a subset of BRAF-mutant melanoma cells in response to early and late MAPK pathway inhibition acquire the capacity to produce and remodel a matrix reminiscent to CAF-derived ECM. Because ECM plays a major role in mediating drug resistance, we hypothesized that melanoma cell-derived matrix functions as a supporting niche for melanoma cell behavior. To investigate the effect of melanoma cell-derived ECM on survival and resistance to targeted therapies, drug naïve BRAF-mutant melanoma cells were plated on 3D matrices generated from parental cells (M238P and M229P) or their BRAFi-resistant counterparts (M238R and M229R), and treated or not with vemurafenib alone or the combination vemurafenib/trametinib (Fig. 5; Supplementary Fig. S7). Time-lapse monitoring of 501Mel proliferation revealed that matrices derived from MITF^{low}/AXL^{high} mesenchymal BRAFi-resistant cells significantly reduced the proliferation arrest induced by MAPK pathway inhibition in contrast to ECMs from BRAFi-sensitive cells, which had no impact on the cytostatic action of BRAF and MEK inhibition (Fig. 5A and B; Supplementary Figs. S7A and S7B). Cell-cycle analysis further confirmed the protective action of matrices from mesenchymal resistant, but not parental cells, over the G₀-G₁ cell-cycle arrest induced by BRAFi on drug-naïve 501Mel and MNT1 cells (Fig. 5C; Supplementary Figs. S7C and S7D). At the molecular level, matrix-mediated therapeutic escape from BRAF inhibition was associated in both 501Mel and MNT1 cells with sustained levels of the proliferation marker phosphorylated-RB and of survivin, low levels of the cell-cycle inhibitor p27KIP1 together with maintained phosphorylation of ERK1/2 in presence of the drug (Fig. 5D; Supplementary Figs. S7E and S7F). Importantly, similar biochemical events were promoted in 501Mel cells escaping from the combination of BRAFi and MEKi upon adhesion to M238R-derived, but not M238P-derived ECM (Fig. 5E). Next we wondered if short-term MAPK pathway inhibition fosters a drug-protective ECM pro-

gram in melanoma cells. 501Mel cells were plated on matrices generated from vehicle or vemurafenib-treated 1205Lu cells, and treated with or without BRAFi. Cell cycle and biochemical analysis showed that BRAF inhibition rapidly promoted the production by 1205Lu cells of an ECM that significantly counteracted the cytostatic action of vemurafenib in 501Mel cells (Fig. 5F and G).

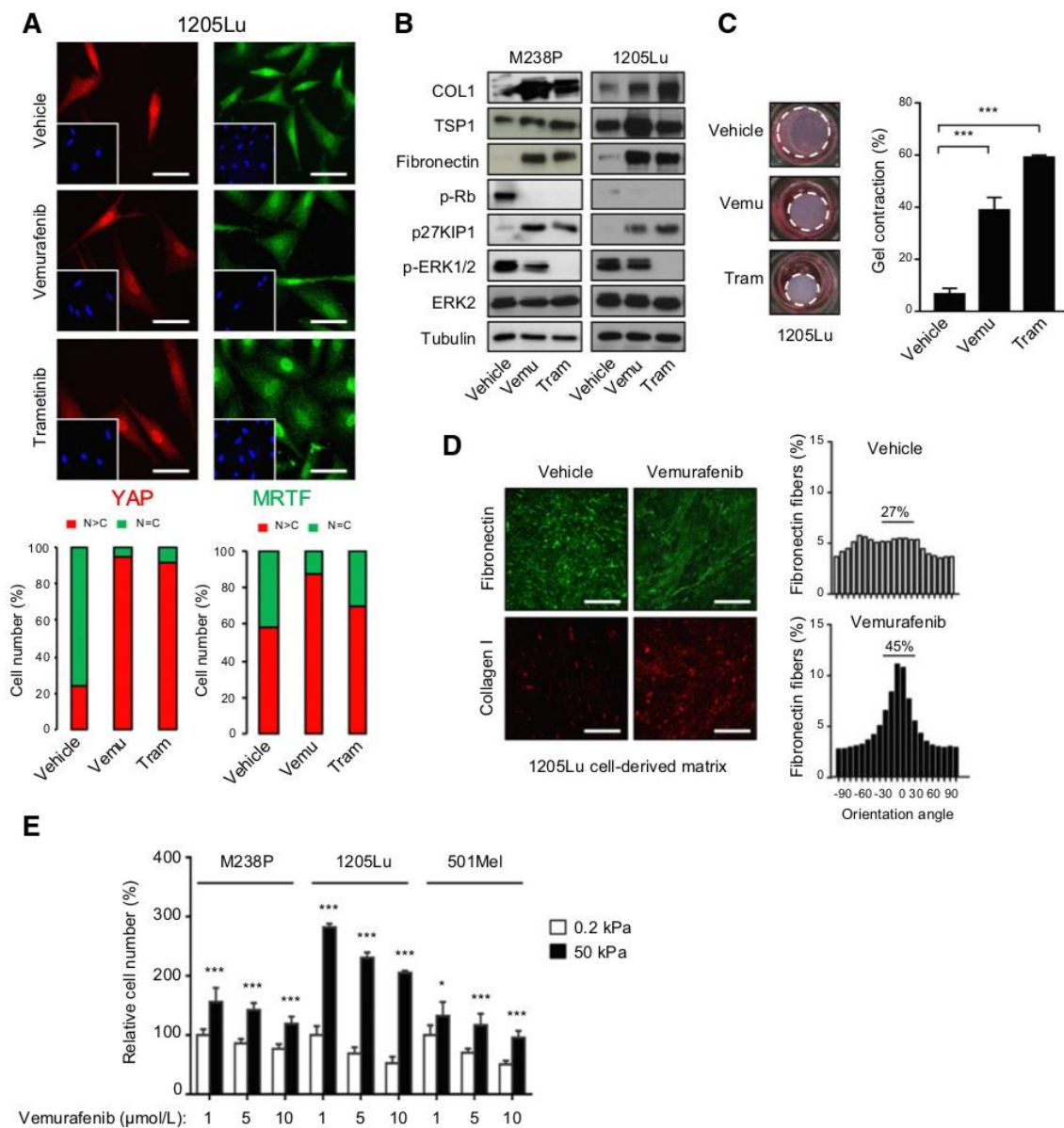
Finally, we investigated the involvement of the mechanoresponsive YAP and MRTF transcriptional pathways in ECM-mediated drug protection. 501Mel cells were cultured on matrices prepared from parental M238P or drug-resistant M238R cells and the subcellular location of YAP and MRTF was examined by immunofluorescence microscopy. In contrast to ECM from M238P cells, matrices derived from M238R cells promoted the nuclear translocation of YAP and MRTF (Fig. 6A), and their transcriptional activation as indicated by the increased expression of *ANKRD1* and *SERPINE1* genes (Fig. 6B). Consistently, drug protective action provided by matrices derived from therapy-resistant M238R cells against BRAFi or the combination BRAFi/MEKi was dramatically reduced in 501Mel cells in which either YAP (Fig. 6C) or MRTF (Fig. 6D) expression was knocked-down. Depletion of YAP or MRTF enhanced the efficacy of MAPK pathway inhibition as shown by reduced levels of phosphorylation of ERK1/2 and RB and increased expression of p27KIP1 (Fig. 6E and F). These suggest that melanoma cell-derived ECM mediates drug protection through YAP and MRTF regulation.

Collectively, our findings demonstrate that both early and late adaptation to MAPK pathway inhibition involves the mechanical reprogramming of melanoma cells, leading to the assembly of an organized matrix that confers *de novo* resistance to targeted therapies in a YAP and MRTF-dependent manner.

In vivo MAPK pathway inhibition promotes melanoma cell-derived ECM accumulation and tumor stiffening

Exposure of BRAF-mutant melanoma cells to MAPK pathway inhibition promotes a mechanophenotype associated with drug tolerance *in vitro*, which could have important outcomes for disease progression *in vivo*. To address this, we first explored whether BRAF inhibition induces ECM remodeling in human melanoma xenograft models. BRAF-mutant melanoma cells 1205Lu or M229P were xenografted into nude mice (melanoma CDX), which were treated blindly with either vehicle or vemurafenib (Supplementary Fig. S8A). As expected, BRAF targeting induced a strong inhibition of tumor growth (Supplementary Figs. S8B and S8C). Histologic, transcriptomic, and biophysical analyses were then performed at the experiment end point. Vemurafenib treatment triggered a profound remodeling of the 1205Lu (Fig. 7A) and M229P (Supplementary Fig. S8D) tumor stroma, with a marked increase of collagen fibers area and thickness, as measured by polarized light of picrosirius red-labeled tumors and SHG microscopy (Fig. 7A and B; Supplementary Fig. S8D). We then examined gene expression on BRAFi-treated melanoma tumors by performing RT-qPCR analysis using human and mouse probes. Consistent with a previous study (31), vemurafenib was found to significantly activate tumor-associated host stromal cells. However, compared with untreated tumors, tumors exposed to BRAFi also dramatically upregulated human mesenchymal and ECM genes, including genes for collagens (*COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL15A1*), fibronectin (*FNI*), collagen-modifying enzyme (*LOX*), and myofibroblast markers (*SPARC*, *ACTA2*), as well as YAP and/or MRTF target genes, such as *AXL*, *CYR61*, *SERPINE1*, *AMOTL2*, and *THBS1* (Fig. 7C). This observation supports the notion that BRAF inhibition can promote a cancer cell-autonomous mechanism of ECM production *in vivo*. Consistent with the changes in ECM composition

Targeted Therapies Mechanically Reprogram Melanoma Cells

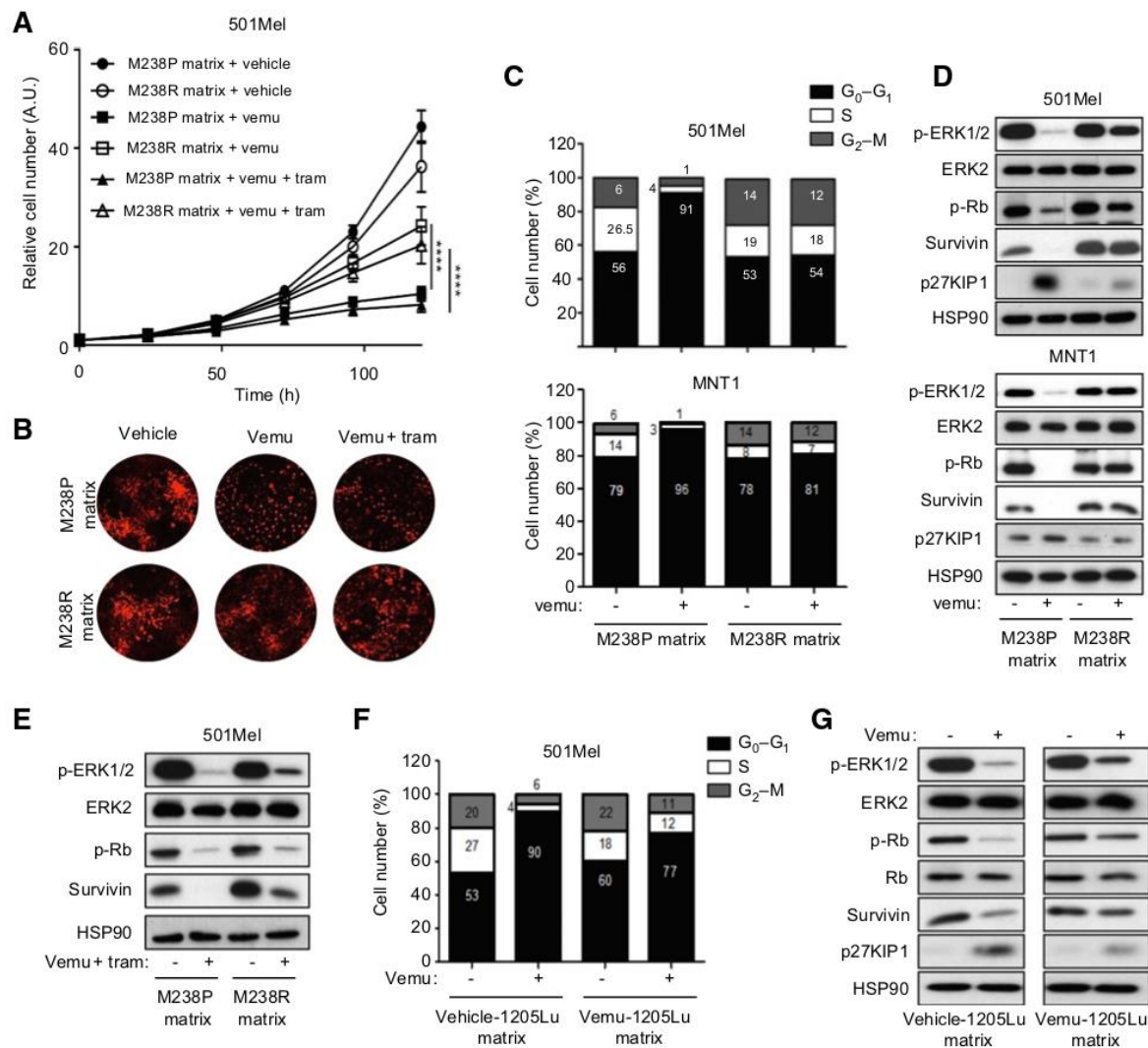
**Figure 4.**

MAPK signaling inhibition triggers mechanoactivation pathways, melanoma cell contractility activity, and ECM fibril alignment. **A**, Images of YAP and MRTF immunostaining of drug-sensitive 1205Lu cells plated for 48 hours on 2.8 kPa collagen-coated hydrogels and treated with vehicle, 3 $\mu\text{mol/L}$ vemurafenib or 1 $\mu\text{mol/L}$ trametinib. Scale bar, 40 μm . Insets show nuclei staining by DAPI. Bottom, quantification of the nucleocytoplasmic distribution of YAP and MRTF ($n \geq 30$ cells per condition). Data are representative of three independent experiments. **B**, Immunoblot analysis of ECM proteins and proliferation markers on lysates from cells treated as above. **C**, Collagen contraction assays of 1205Lu pretreated for 72 hours with vehicle, 3 $\mu\text{mol/L}$ vemurafenib, or 1 $\mu\text{mol/L}$ trametinib. Right, quantification of gel contraction. Bar graph is the mean \pm SD of triplicate experiments. ***, $P < 0.001$. **D**, Immunofluorescence analysis of fibronectin and collagen I fibers assembly in decellularized ECM generated from 1205Lu cells treated with vehicle or vemurafenib for 7 days. Scale bar, 40 μm . Histograms, quantification of fibronectin fibers orientation. Percentages indicate fibers accumulated in a range of $\pm 21^\circ$ around the modal angle. **E**, Cells were cultured on low (0.2 kPa) versus high (50 kPa) stiffness substrate for 72 hours in the presence of the indicated dose of vemurafenib. Bar graphs show cell number quantification by Incucyte analysis of red-labeled nuclei. Data are normalized relative to the number of cells on soft substrate and 1 $\mu\text{mol/L}$ vemurafenib. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, two-way ANOVA analysis.

and assembly, vemurafenib treatment significantly increased tumor elastic modulus in the two CDX models when measured by AFM (Fig. 7D; Supplementary Fig. S8E), suggesting that ECM stiffening

constitute an adaptive response of melanoma cells to MAPK pathway inhibition *in vivo*. We next wished to validate these observations in melanoma PDXs. PDX exposed or not to the combination of BRAFi

Girard et al.

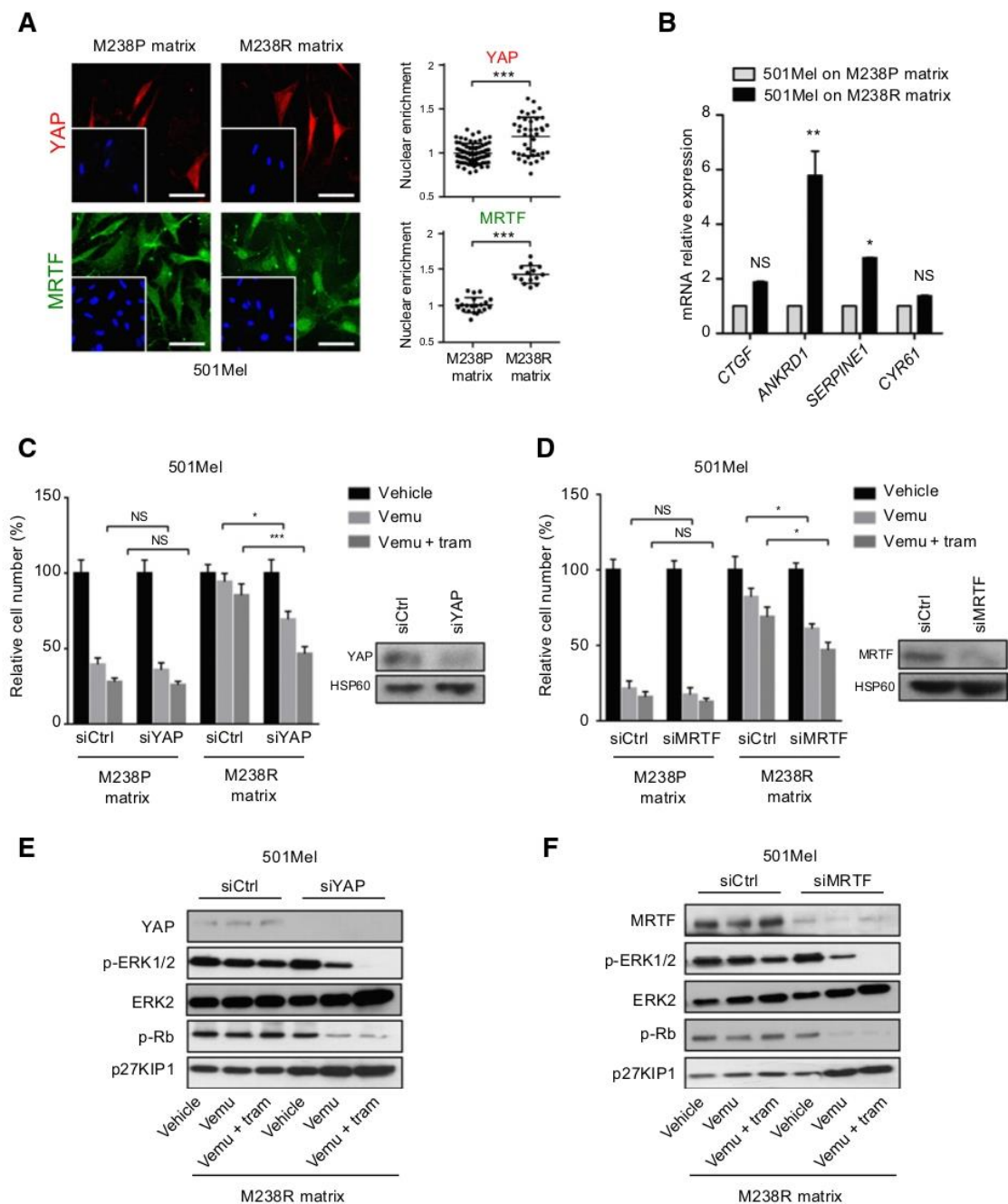
**Figure 5.**

Early adaptation and mesenchymal-associated resistance to MAPK pathway inhibition is associated with the production of a drug-protective ECM. **A**, Proliferation curves of 501Mel cells cultured on decellularized M238P or M238R cell-derived matrices and treated with vehicle or with 2 μ M vemurafenib in combination or not with 0.1 μ M trametinib. Time-lapse analysis of cells using the IncuCyte system. Graphs show quantification of cell numbers from NuLight Red nuclear object counting. Data are the mean \pm SD ($n = 3$). ***, $P < 0.001$, two-way ANOVA analysis. A.U., arbitrary unit. **B**, Representative images of nuclear labeling and red fluorescence at the end of the experiment shown in **A**. **C**, Cell-cycle distribution of 501Mel (top) or MNT1 (bottom) cells cultured on M238P or M238R-derived ECM for 48 hours and treated with vehicle or 2 μ M vemurafenib. Histograms represent the percentage of cells in different phases of the cell cycle. **D**, Immunoblot analysis of cell-cycle markers from experiments shown in **C**. **E**, Immunoblot analysis of cell-cycle markers on lysates from 501Mel cultured on M238P or M238R cell-derived ECM treated for 48 hours with a combination of 2 μ M vemurafenib and 0.1 μ M trametinib. **F**, Cell-cycle distribution of 501Mel cultured on cell-derived matrices generated from vehicle or vemurafenib-treated 1205Lu cells and treated with 2 μ M vemurafenib for 48 hours. Cell-cycle profiles were analyzed as above. **G**, Immunoblot analysis of cell-cycle markers on lysates from 501Mel cells obtained from **F**.

and MEKi were stained with picosirius red (Fig. 7E). Combined BRAF and MEK inhibition also resulted in a marked accumulation of collagen fibers in the tumor stroma of melanoma PDX (Fig. 7E and F). Finally, Verteporfin, a FDA-approved drug used in photodynamic therapy for macular degeneration and a known inhibitor of YAP was used to interrogate if YAP contributes to BRAFi-induced collagen remodeling and therapy response *in vivo*. Although Verteporfin alone did not affect 1205Lu tumor growth, cotreatment with vemurafenib

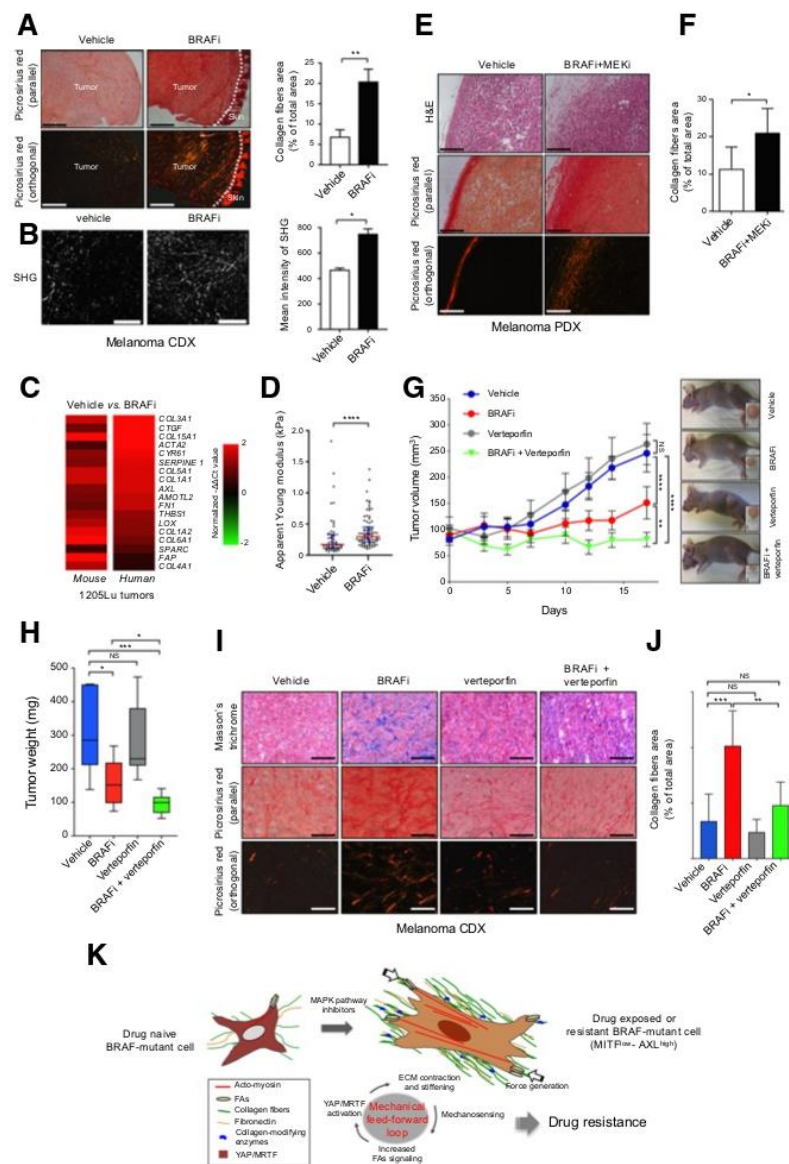
plus Verteporfin had a greater antitumor effect than vemurafenib alone after 17 days of drug regimens (Fig. 7G and H). Thus, combined Verteporfin and vemurafenib therapy enhanced vemurafenib response in a preclinical melanoma model. Furthermore, Masson's trichrome and picosirius red stainings revealed that Verteporfin treatment abrogated the accumulation of collagen fibers induced by BRAFi inhibition in the stroma of melanoma xenografts (Fig. 7I and J). Together these data suggest that YAP mechanosensing pathway

Targeted Therapies Mechanically Reprogram Melanoma Cells

**Figure 6.**

Matrices generated by resistant melanoma cells induce YAP and MRTF activation to confer protection to MAPK pathway inhibition. **A**, 501Mel cells were cultured on M238P or M238R cell-derived matrices for 48 hours and subjected to immunofluorescence analysis of YAP and MRTF. Insets show nuclei staining by DAPI. Scale bar, 40 μ m. Right, quantification of the nucleocytoplasmic distribution of YAP and MRTF ($n \geq 15$ cells per condition). Data are representative of three independent experiments. ***, $P < 0.001$, Mann-Whitney. **B**, qPCR analysis of shared YAP/MRTF target genes in cells obtained from **A**. Data are represented as mean \pm SD from a technical triplicate representative of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, two-way ANOVA analysis. **C** and **D**, Bar graphs showing quantification of cell proliferation of 501Mel cells plated on cell-derived matrices and treated for 72 hours with or without 2 μ M vemurafenib in combination or not with 0.1 μ M trametinib following transfection with control siRNA (siCtrl) or YAP (siYAP) siRNA (**C**), or following transfection with siCtrl or MRTF (siMRTF) siRNA (**D**). Data are the mean \pm SD ($n = 3$). *, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$, two-way ANOVA. Right panels show immunoblots of YAP and MRTF levels in transfected cells. **E** and **F**, Immunoblot analysis on lysates obtained from the experiments described in **C** and **D**. NS, nonsignificant.

Girard et al.

**Figure 7.**

In vivo MAPK inhibition drives melanoma cell biomechanical reprogramming and tumor stiffening in melanoma tumors. **A**, Sections of 1205Lu melanoma CDX treated with vehicle or with vemurafenib (BRAFi) were stained with picrosirius red and imaged under original bright field (parallel) or polarized light (orthogonal). Scale bar, 500 μ m. Collagen fibers area was quantified with ImageJ. Values represent mean \pm SD of four independent fields. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. **B**, SHG microscopy from samples described in **A**. Scale bar, 500 μ m. SHG intensity was quantified with ImageJ. Values represent mean \pm SD of four independent fields. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. **C**, Heatmap showing the differential expression of human and mouse ECM genes, dedifferentiation markers, and YAP/MRTF target genes in untreated versus vemurafenib-treated tumors. Gene expression was assessed by RT-qPCR. **D**, Scatter plot with mean \pm SD showing Young's modulus (E_{app}) measurements of vehicle and vemurafenib-treated tumors. ****, $P < 0.0001$. **E**, Sections obtained from melanoma PDX were treated or not with BRAFi and MEKi, stained with hematoxylin and eosin (H&E) or picrosirius red, and imaged under transmission (parallel) or polarized light (orthogonal) microscopy. Scale bar, 150 μ m. **F**, Collagen fibers area was quantified from picrosirius red stainings with ImageJ. Values represent mean \pm SD of four independent fields. **G**, 1205Lu cells were injected into nude mice and when tumors reached 100 mm³, mice were administered (i.p. injection) vehicle, vemurafenib (BRAFi), Verteporfin (a YAP/TEAD inhibitor), or the combination of vemurafenib and Verteporfin. Data shown are mean \pm SD. Photographs of mice and tumors taken at day 19 are shown. **H**, Bar graphs showing tumor weights at day 19. Data are means \pm SD ($n = 6$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test. **I**, Sections of 1205Lu melanoma CDX from the experiment shown in **G** were stained with Masson's trichrome or picrosirius red and imaged under transmission (parallel) or polarized light (orthogonal) microscopy. Scale bar, 50 μ m. **J**, Collagen fibers area was quantified from picrosirius red stainings with ImageJ. Values are the mean \pm SD of four independent fields. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test. **K**, Proposed model for the biomechanical reprogramming of melanoma cell induced by MAPK-targeted therapies. The scheme shows the reciprocal YAP/MRTF-dependent feed-forward loop between drug-exposed or -resistant cells and ECM remodeling to increase tumor stiffening, mechanosensing, and resistance.

contributes to collagen reorganization in response to MAPK pathway inhibition and support the concept of a combinatorial approach to overcome ECM-mediated therapy resistance in BRAF-mutated melanoma models.

Discussion

A major resistance program in melanomas exposed to MAPK-targeting therapies is linked to a dedifferentiated, mesenchymal transcriptional cell state characterized by low levels of the melanoma differentiation factor MITF and high levels of AXL (15, 19, 21–24). MITF^{low}/AXL^{high}-resistant cells exhibit multiple traits of the Hoek's invasive gene signature (14), including prominent expression of ECM proteins (20, 21). Here we showed that this resistant cell population also exhibits key aspects of CAFs involved in ECM remodeling: they acquired a mechanical phenotype associated with an actomyosin/YAP/MRTF-dependent contractile activity, and the ability to deposit ECM to create a tumor-permissive environment. In contrast, drug-naïve cells and a population of MITF^{high}/NRAS-mutant resistant cells displayed no such mechanoresponsive features and ECM remodeling activities. Importantly, we also found that early adaptation to MAPK pathway inhibition promotes *de novo* acquisition of a CAF-like phenotype, leading to biomechanical reprogramming both *in vitro* and *in vivo*. We thus uncover a previously unidentified feed-forward loop between drug-exposed or resistant MITF^{low}/AXL^{high} melanoma cells and ECM remodeling to increase tumor tissue stiffness, mechanosensing and resistance through YAP and MRTF regulation (Fig. 7K).

Short-term treatment of melanoma cells with targeted drugs induced actin dynamics, mechanosensitive regulation of YAP and MRTF and increased cell contractility. This differs from another early adaptation state to BRAF inhibition characterized by the emergence of a slow-cycling NGFR/CD271^{high} persistent cell population (20). However, our results are in line with the observation that BRAFi modulates actin reorganization and YAP/TAZ activation (11) as well as Rho GTPase signaling (45). Thus, our findings underscore the exquisite phenotypic plasticity of melanoma cells and the notion that their biomechanical reprogramming may actively participate to intratumor heterogeneity and therapeutic escape.

Another indication of the ability of targeted therapies to switch melanoma cells towards a CAF-like phenotype is based on our findings that BRAFi induces melanoma cells to autonomously remodel a fibrillar and drug-protective ECM, an additional trait typical of CAFs. A previous study has shown that short-term BRAF inhibition upregulates adhesion signaling and drug tolerance in BRAF-mutant/*PTEN*-null melanoma cells (46). Extending this observation, our data demonstrate that short-term MAPK pathway inhibition induces the assembly by melanoma cells of an aligned ECM containing collagens, fibronectin and thrombospondin-1, indicating that targeted therapies have the capacity to rapidly exacerbate the intrinsic ability of melanoma cells to produce a pro-invasive ECM (32, 47). Vemurafenib treatment was shown to activate CAFs to generate a drug-tolerant niche through fibronectin-mediated integrin β 1/FAK signaling (31). In this study, cell death following BRAF inhibition was reduced when melanoma cells were cultured on stiff substrates containing the combination of fibronectin, thrombospondin-1, and tenascin-C (31). A part from ECMs assembled by therapy-activated fibroblasts, our study reveals a crucial role of fibronectin and collagen-rich ECMs derived from either drug-resistant or drug-exposed melanoma cells in driving tolerance. The protection against the cytostatic effect of MAPK inhibition brought by melanoma-derived matrices is evidenced by the

persistence of cycling cells, with sustained levels of proliferative markers and YAP/MRTF nuclear translocation. Remarkably, tolerance to BRAFi was achieved when BRAF-mutant melanoma cells were plated on collagen-coated stiff matrices, supporting the notion that, in addition to fibronectin (31, 46), the collagen network and ECM stiffening are major mediators of melanoma drug resistance. Interestingly, previous studies with bioengineered materials have shown the impact of substrate stiffness on targeted drugs responses in melanoma (48) and carcinoma cell lines (49).

YAP-TEAD and MRTF-SRF pathways functionally interact to coordinate mechanosignaling required for the maintenance of the CAF phenotype in solid tumors (7–9, 50). Similarly, we showed that the contractile behavior of the dedifferentiated resistant melanoma cells requires YAP and MRTF expression. Importantly, we found that YAP and MRTF are activated upon mechanical stress and contribute to ECM-mediated drug resistance. This is in agreement with recent reports demonstrating the contribution of the YAP pathway in BRAFi resistance (10–12). However, these studies were conducted on rigid plastic dishes that do not reflect tissue mechanical compliance. In contrast, we demonstrated the exacerbated ability of dedifferentiated resistant and BRAFi-exposed melanoma cells to adapt to substrate rigidity using cell-derived 3D ECMs and collagen-coated hydrogels with defined stiffness, which model more accurately the activation of YAP and MRTF mechanosensors. In contrast to YAP-TEAD pathway, the role of MRTF-SRF pathway in melanoma therapeutic resistance remains less defined. MRTF controls several cytoskeletal genes, including α SMA and MLC2 (8) that we found enriched in the MITF^{low}/AXL^{high} resistant cells and in MITF^{low} tumor biopsies from progressing patients with melanoma. Moreover, several components of the matrisome from MITF^{low} resistant cells, such as tenascin-C, CYR61, thrombospondin-1, and serpinE1 are known YAP and/or MRTF targets (9). Remarkably, a YAP1 enrichment signature has also been identified as a driver event of melanoma acquired resistance (19). This is in line with our *in silico* gene expression analyses that revealed a similar trend towards an increased expression of YAP/MRTF target genes in MITF^{low} tumor biopsies from patients relapsing from therapy. Of note, a recent study identified AXL, a RTK required to maintain the resistant phenotype in melanoma (24), in a YAP/TAZ target gene signature (51). Accordingly, we found several YAP/MRTF target genes including AXL induced upon BRAFi treatment in our xenograft model. This raises the possibility that the reservoir of AXL^{high} resistant cells is promoted by biomechanical adaptation of melanoma cells to oncogenic BRAF inhibition. Interestingly, collagen stiffening has been recently shown to promote melanoma differentiation via YAP/PAX3-mediated MITF expression (52). This study and our present report support the emerging notion that collagen density and rigidity is a key microenvironmental factor that governs melanoma cell plasticity and intratumor heterogeneity. How YAP and MRTF actually coordinate mechanical signals from tumor microenvironments to drive melanoma differentiation, invasive behavior or drug resistance is currently unknown and requires further investigations.

Importantly, our data reveal a targetable vulnerability of vemurafenib-induced mechanical reprogramming of melanoma *in vivo*. Tumors treated with BRAFi or combined BRAFi/MEKi therapy displayed an intense remodeling of the tumor niche associated to increased collagen fibers organization and YAP/MRTF-mediated gene expression. Earlier studies have underscored the critical role of CAFs activated by BRAF inhibition for the development of resistant niches (27, 28, 31, 53). Accordingly, we found that host stromal cells that likely include fibroblasts produce some ECM genes in response to vemurafenib. However, we demonstrated that the molecular changes

Girard et al.

associated with the dramatic remodeling of the tumor niche in response to MAPK pathway inhibition also results from the activation of human melanoma cells, thereby promoting an autocrine production of a rigid ECM enriched in collagen fibers. In line with the key role of the YAP pathway during melanoma relapse (19) and phenotypic heterogeneity (12), we found that YAP-TEAD inhibition by Verteporfin reverses vemurafenib-induced excessive collagen deposition. Consequently, treatment with Verteporfin cooperated with vemurafenib to reduce melanoma growth. Whether targeting MRTF-SRF signaling pathway may also demonstrate therapeutic efficiency is currently under investigation.

In conclusion, our findings disclose a novel mechanism of BRAF-mutant melanoma cells adaptation to MAPK-targeted therapies through the acquisition of an auto-amplifying CAF-like phenotype in which melanoma cell-derived ECM modulates mechanosensing pathways to promote tumor stiffening. In addition to therapy-induced tumor secretomes (54), therapy-induced mechanical phenotypes could endow cancer cells with unique cell-autonomous abilities to survive and differentiate within challenging tumor-associated microenvironments, thereby contributing to drug resistance and relapse. Our results suggest that cancer cell-ECM interactions and tumor mechanics provide promising targets for therapeutic intervention aimed at enhancing targeted therapies efficacy in melanoma.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: C.A. Girard, R. Ben Jouira, J.-C. Marine, M. Deckert, S. Tartare-Deckert

Development of methodology: C.A. Girard, M. Lecacheur, R. Ben Jouira, I. Berestjuk, S. Diazzi, C. Gaggioli, M. Deckert

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): R. Ben Jouira, V. Prod'homme, A. Mallavialle, F. Larbret, M. Gesson, S. Schaub, S. Pisano, S. Audebert, B. Mari, E. Leucci, J.-C. Marine

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): C.A. Girard, M. Lecacheur, R. Ben Jouira, V. Prod'homme, M. Gesson, S. Schaub, S. Audebert, B. Mari, M. Deckert, S. Tartare-Deckert

Writing, review, and/or revision of the manuscript: C.A. Girard, M. Lecacheur, R. Ben Jouira, J.-C. Marine, M. Deckert, S. Tartare-Deckert

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

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

Acknowledgments

We thank R.S. Lo for melanoma cells. We acknowledge the iBV, IRCAN, and C3M partners of "Microscopie Imagerie Côte d'Azur" (MICA) GIS-IBISA multisites platform supported by the GIS IBISA, Conseil Départemental 06, and Région PACA. We also acknowledge the C3M animal facility and we thank TRACE (PDX platform at the KULeuven University) for providing the PDX models. This work was supported by institutional funds from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Université Côte d'Azur, the Ligue Contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer 2016 to S. Tartare-Deckert), and Institut National du Cancer (INCA_12673 to S. Tartare-Deckert). Funding from the Fondation ARC, National Research Agency (#ANR-18-CE14-0019-01 to M. Deckert), ITMO Cancer Aviesan within the framework of the Cancer Plan, and the French Government through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) is also acknowledged. We also thank financial supports by Conseil Départemental 06 and Canceropôle PACA. R. Ben Jouira was a recipient of a doctoral fellowship from Fondation ARC. I. Berestjuk is a recipient of a doctoral fellowship from La Ligue Contre le Cancer.

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

Received September 17, 2019; revised January 15, 2020; accepted March 6, 2020; published first March 16, 2020.

References

- Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 2012;196:395–406.
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009;139:891–906.
- Laklai H, Miroshnikova YA, Pickup MW, Collisson EA, Kim GE, Barrett AS, et al. Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression. *Nat Med* 2016;22:497–505.
- Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech* 2010;43:146–55.
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 2005;8:241–54.
- Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 2011;474:179–83.
- Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodeling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2013;15:637–46.
- Finch-Edmondson M, Sudol M. Framework to function: mechanosensitive regulators of gene transcription. *Cell Mol Biol Lett* 2016;21:28.
- Foster CT, Gualdrini F, Treisman R. Mutual dependence of the MRTF-SRF and YAP-TEAD pathways in cancer-associated fibroblasts is indirect and mediated by cytoskeletal dynamics. *Genes Dev* 2017;31:2361–75.
- Lin L, Sabnis AJ, Chan E, Olivas V, Cade L, Pazarentzos E, et al. The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies. *Nat Genet* 2015;47:250–6.
- Kim MH, Kim J, Hong H, Lee SH, Lee JK, Jung E, et al. Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. *EMBO J* 2016;35:462–78.
- 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.
- Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 2016;16:345–58.
- Widmer DS, Cheng PF, Eichhoff OM, Belloni BC, Zipsper MC, Schlegel NC, et al. Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25:343–53.
- Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH 2nd, Treacy D, Trombetta JJ, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 2016;352:189–96.
- Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, et al. Multi-stage differentiation defines melanoma subtypes with differential vulnerability to drug-induced iron-dependent oxidative stress. *Cancer Cell* 2018;33:890–904.
- Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 2012;12:349–61.
- Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya RC, Moriceau G, et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov* 2014;4:80–93.
- Hugo W, Shi H, Sun L, Piva M, Song C, Kong X, et al. Non-genomic and immune evolution of melanoma acquiring MAPKi resistance. *Cell* 2015;162:1271–85.
- Titz B, Lomova A, Le A, Hugo W, Kong X, Ten Hoeve J, et al. JUN dependency in distinct early and late BRAF inhibition adaptation states of melanoma. *Cell Discov* 2016;2:16028.

Targeted Therapies Mechanically Reprogram Melanoma Cells

21. 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.
22. 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.
23. Girotti MR, Pedersen M, Sanchez-Laorden B, Viros A, Turajlic S, Niculescu-Duvaz D, et al. Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov* 2013;3:158–67.
24. 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.
25. Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJ, Prahallad A, Robert C, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 2014;508:118–22.
26. Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Ben Jouira R, Garcia E, et al. Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 2019;38:5873–89.
27. 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.
28. Kaur A, Webster MR, Marchbank K, Behera R, Ndoye A, Kugel CH 3rd, et al. sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. *Nature* 2016;532:250–4.
29. 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.
30. Young HL, Rowling EJ, Bugatti M, Giurisato E, Luheshi N, Arozarena I, et al. An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *J Exp Med* 2017;214:1691–710.
31. Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, et al. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant micro-environments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer Cell* 2015;27:574–88.
32. Gaggioli C, Robert G, Bertolotto C, Bailet O, Abbe P, Spadafora A, et al. Tumor-derived fibronectin is involved in melanoma cell invasion and regulated by V600E B-Raf signaling pathway. *J Invest Dermatol* 2007;127:400–10.
33. Naba A, Clauser KR, Hoersch S, Liu H, Carr SA, Hynes RO. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol Cell Proteomics* 2012;11:M111.
34. Didier R, Mallavialle A, Ben Jouira R, Domdom MA, Tichet M, Auberger P, et al. Targeting the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14 impairs melanoma cell survival and overcomes resistance to MAPK-targeting therapies. *Mol Cancer Ther* 2018;17:1416–29.
35. Tichet M, Prod'Homme V, Fenouille N, Ambrosetti D, Mallavialle A, Cerezo M, et al. Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat Commun* 2015;6:6993.
36. Beacham DA, Amatangelo MD, Cukierman E. Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol* 2007; Chapter 10:Unit 10.9.
37. Albregues J, Bourget I, Pons C, Butet V, Hofman P, Tartare-Deckert S, et al. LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep* 2014;7:1664–78.
38. Martiel JL, Leal A, Kurzawa L, Balland M, Wang I, Vignaud T, et al. Measurement of cell traction forces with ImageJ. *Methods Cell Biol* 2015;125:269–87.
39. Tse JR, Engler AJ. Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr Protoc Cell Biol* 2010; Chapter 10:Unit 10.6.
40. Estrach S, Lee SA, Boulter E, Pisano S, Errante A, Tissot FS, et al. CD98hc (SLC3A2) loss protects against ras-driven tumorigenesis by modulating integrin-mediated mechanotransduction. *Cancer Res* 2014;74:6878–89.
41. Rambow F, Rogiers A, Marin-Bejar O, Aibar S, Femel J, Dewaele M, et al. Toward minimal residual disease-directed therapy in melanoma. *Cell* 2018;174:843–55.
42. Bertero T, Oldham WM, Cottrill KA, Pisano S, Vanderpool RR, Yu Q, et al. Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2016;126:3313–35.
43. Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:802–12.
44. Zhao XH, Laschinger C, Arora P, Szaszi K, Kapus A, McCulloch CA. Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *J Cell Sci* 2007;120:1801–9.
45. Klein RM, Spofford LS, Abel EV, Ortiz A, Aplin AE. B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Mol Biol Cell* 2008;19:498–508.
46. Fedorenko IV, Abel EV, Koomen JM, Fang B, Wood ER, Chen YA, et al. Fibronectin induction abrogates the BRAF inhibitor response of BRAF V600E/PTEN-null melanoma cells. *Oncogene* 2016;35:1225–35.
47. Chapman A, Fernandez del Ama L, Ferguson J, Kamarashev J, Wellbrock C, Hurlstone A. Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion. *Cell Rep* 2014;8:688–95.
48. Tokuda EY, Leight JL, Anseth KS. Modulation of matrix elasticity with PEG hydrogels to study melanoma drug responsiveness. *Biomaterials* 2014;35:4310–8.
49. Nguyen TV, Sleiman M, Moriarty T, Herrick WG, Peyton SR. Sorafenib resistance and JNK signaling in carcinoma during extracellular matrix stiffening. *Biomaterials* 2014;35:5749–59.
50. Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 2011;147:759–72.
51. Wang Y, Xu X, Maglic D, Dill MT, Mojumdar K, Ng PK, et al. Comprehensive molecular characterization of the hippo signaling pathway in cancer. *Cell Rep* 2018;25:1304–17.
52. Miskolczi Z, Smith MP, Rowling EJ, Ferguson J, Barriuso J, Wellbrock C. Collagen abundance controls melanoma phenotypes through lineage-specific microenvironment sensing. *Oncogene* 2018;37:3166–82.
53. Fedorenko IV, Wargo JA, Flaherty KT, Messina JL, Smalley KSM. BRAF inhibition generates a host-tumor niche that mediates therapeutic escape. *J Invest Dermatol* 2015;135:3115–24.
54. Obenauf AC, Zou Y, Ji AL, Vanharanta S, Shu W, Shi H, et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* 2015;520:368–72.

Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma

Christophe A. Girard, Margaux Lecacheur, Rania Ben Jouira, et al.

Cancer Res 2020;80:1927-1941. Published OnlineFirst March 16, 2020.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2914
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2020/03/14/0008-5472.CAN-19-2914.DC1

Visual Overview	A diagrammatic summary of the major findings and biological implications: http://cancerres.aacrjournals.org/content/80/10/1927/F1.large.jpg
------------------------	---

Cited articles	This article cites 52 articles, 12 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/80/10/1927.full#ref-list-1
-----------------------	--

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, use this link http://cancerres.aacrjournals.org/content/80/10/1927 . Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

Échappement thérapeutique du mélanome : la piste biomécanique

Margaux Lecacheur, Christophe A. Girard, Marcel Deckert, Sophie Tartare-Deckert

Université Côte d'Azur, Inserm, Centre méditerranéen de médecine moléculaire (C3M), équipe « microenvironnement, signalisation et cancer » labellisée Ligue contre le cancer 2016, bâtiment universitaire ARCHIMED, 151 route Saint Antoine de Ginestière, 06204 Nice Cedex 03, France.

margaux.lecacheur@univ-cotedazur.fr

christophe.girard@univ-cotedazur.fr

marcel.deckert@univ-cotedazur.fr

sophie.tartare-deckert@univ-cotedazur.fr

Thérapies ciblées et mécanismes de résistance

Le mélanome est un cancer de la peau agressif dont l'incidence ne cesse d'augmenter : on a estimé à 157 400 le nombre de nouveaux cas et à 20 000 le nombre de décès pour l'année 2018 en Europe. Son pronostic est mauvais aux stades avancés et métastatiques. Le mélanome est issu de la transformation maligne d'un mélanocyte, cellule responsable de la pigmentation. L'agressivité du mélanome est principalement due à une importante hétérogénéité intra-tumorale associée à une résistance aux traitements et à un potentiel élevé de dissémination. La majorité des mélanomes cutanés résulte de mutations oncogéniques qui conduisent à l'activation constitutive de la voie MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) ERK (*extracellular signal regulated kinase*). On retrouve des mutations de BRAF (*B-rapidly accelerated fibrosarcoma*) dans 40 à 50 % des cas, NRAS (*neuroblastoma ras viral oncogene*) dans 20 à 30 % des cas, ou NF1 (*neurofibromatosis type 1*) dans 10 à 15 % des cas (Figure 1) [1]. La mutation substitutive BRAF^{V600E} a conduit au développement d'inhibiteurs sélectifs (BRAFi : vémurafénib ou dabrafénib), utilisés en clinique en combinaison avec un inhibiteur de la kinase MEK (*MAPK/ERK kinase*) (MEKi : cobimétinib ou tramétinib) pour le traitement des mélanomes non résecables chirurgicalement ou métastatiques. Pour les patients non porteurs de la mutation de BRAF ou ceux ayant rechuté après

les bithérapies ciblées, d'autres stratégies thérapeutiques existent, comme les immunothérapies visant à réactiver les réponses immunitaires contre les cellules tumorales. Malgré les taux élevés (environ 75 %) de réponse à ces traitements, certains patients n'y répondent pas, et beaucoup échappent à ces thérapies à cause de l'émergence de résistances des cellules tumorales. Plusieurs mécanismes de résistance primaire, adaptative et secondaire ont été décrits. Le plus souvent, les résistances secondaires ont une origine génétique et peuvent conduire à la réactivation de la voie MAPK ERK, par des mutations de NRAS notamment. Dans d'autres cas, la résistance acquise a une origine non-génétique, caractérisée par un remodelage du paysage transcriptionnel avec la surexpression de récepteurs à activité tyrosine kinase comme AXL ou PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), l'activation de voies de survie alternatives et la transition vers un phénotype cellulaire mésenchymateux [2]. Malgré les progrès de la prise en charge clinique du mélanome métastatique au cours des dix dernières années, les réponses obtenues demeurent insuffisantes et les patients échappent quasiment systématiquement aux traitements. Ce constat nous oblige à repenser l'utilisation des thérapies ciblées et à envisager des alternatives thérapeutiques prenant en compte notamment une vision intégrée de la cellule de mélanome incluant son microenvironnement.

Plasticité des cellules de mélanome et changements phénotypiques

Les cellules de mélanome font preuve d'une remarquable plasticité créant une hétérogénéité intra-tumorale importante. Les mélanomes sont constitués de plusieurs sous-populations cellulaires, dont deux majeures : la population des cellules « prolifératives » et celle des cellules « invasives », qui possèdent des signatures transcriptionnelles distinctes [2, 3]. L'état prolifératif est principalement contrôlé par le facteur de transcription MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*), un déterminant essentiel du lignage mélanocytaire. Les cellules qui expriment MITF (MITF^{high}) sont principalement prolifératives, expriment des marqueurs de différenciation, et sont dépourvues de capacité invasive. À l'inverse, les cellules MITF^{low} sont dédifférenciées, peu prolifératives, mais particulièrement invasives, et elles expriment des marqueurs mésenchymateux comme ZEB1 ou la fibronectine, ou des marqueurs de résistance comme AXL. Récemment, notre équipe a montré que cette sous-population de cellules exprime également PTX3 (*pentaxin 3*), une protéine de l'inflammation contrôlant la voie NFκB [4]. Ainsi, les cellules prolifératives peuvent évoluer vers un phénotype invasif et vice-versa. Ce processus dynamique de changement phénotypique fournit ainsi des capacités de survie et d'adaptation aux cellules de mélanome au cours du développement

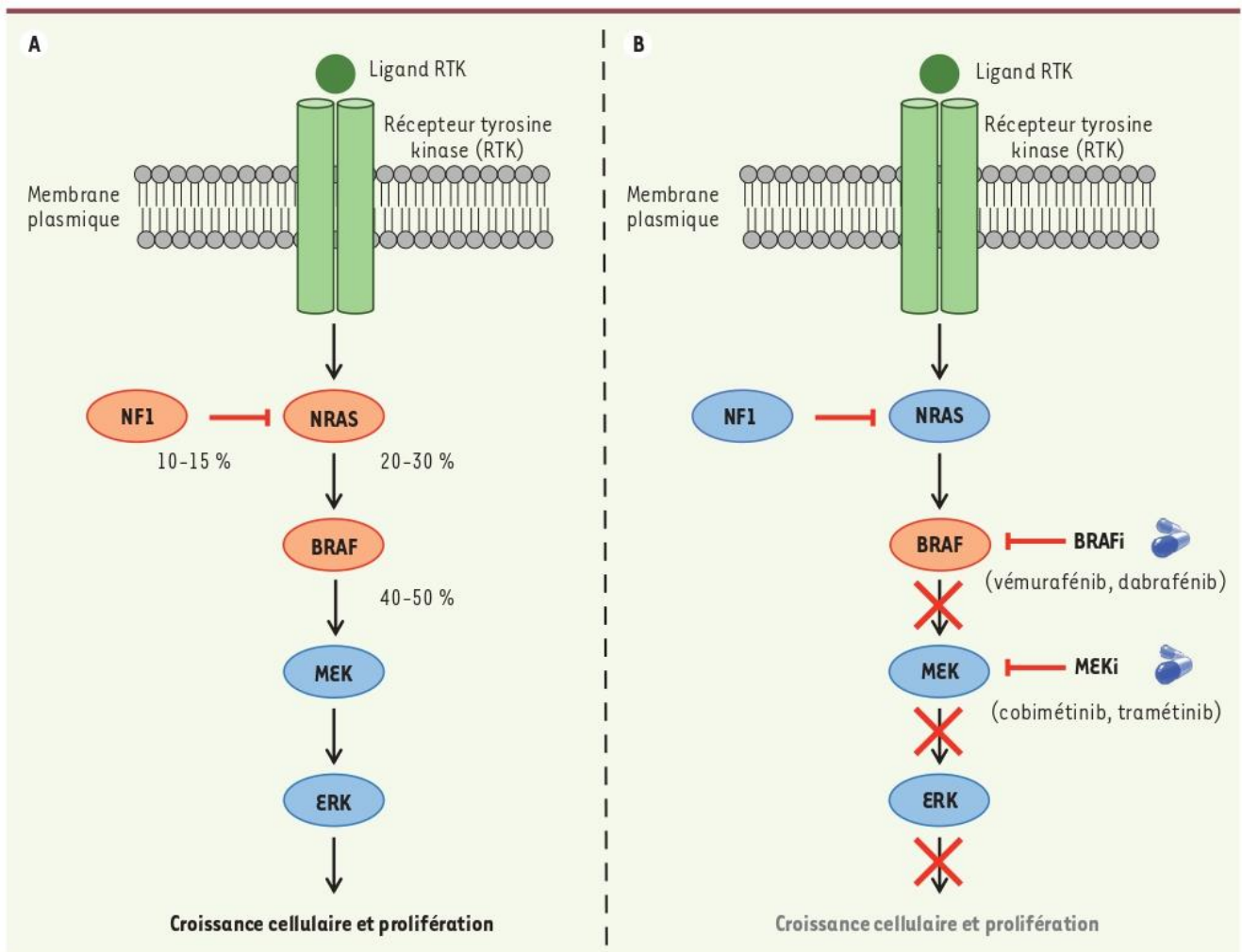


Figure 1. Principales altérations de la voie de signalisation des MAP kinases dans le mélanome et thérapies associées. **A.** Plus de 80 % des mélanomes présentent des mutations d'un des composants de la voie de signalisation des MAP kinases. Les mutations de BRAF (V600E ou V600K) sont les plus courantes, suivies des mutations oncogéniques de NRAS, et des pertes de fonction de NF1 (une protéine inhibitrice de RAS). Ces mutations conduisent à l'activation constitutive de la voie des MAP kinases et à la prolifération incontrôlée des mélanomes. NF1, *neurofibromatosis type 1* ; NRAS, *neuroblastoma ras viral oncogene* ; BRAF, *B-rapidly accelerated fibrosarcoma* ; MEK, *MAPK/ERK kinase* ; ERK, *extracellular signal-regulated kinase*. **B.** Thérapies des mélanomes avec mutation de BRAF (V600E ou V600K). Ces mélanomes sont actuellement traités avec une combinaison d'inhibiteurs ciblant la kinase BRAF et son principal effecteur, MEK. Ces thérapies ciblées inhibent la voie des MAP kinases et stoppent la prolifération des cellules de mélanome. BRAFi, inhibiteur de BRAF ; MEKi, inhibiteur de MEK.

tumoral. La tendance à transiter vers un phénotype mésenchymateux est favorisée par des signaux provenant du microenvironnement tumoral comme l'inflammation, la carence en oxygène ou en nutriments, mais est aussi causée par les thérapies ciblées elles-mêmes. Dans ce contexte, l'acquisition d'une signature mésenchymateuse de type $MITF^{low}/AXL^{high}$ représente un mécanisme majeur de résistance non-génétique aux thérapies ciblées, qui est responsable des rechutes [5].

Microenvironnement matriciel et mécanotransduction

Le mélanome se développe dans un environnement riche en cellules non cancéreuses, dont le fonctionnement est altéré par les cellules cancéreuses [6] (→). On y retrouve des cellules endothéliales, des cellules immunitaires et des fibroblastes activés en myofibroblastes (*cancer-*

(→) Voir la Synthèse de E. Buache, M.C. Rio, m/s n° 4, avril 2014, page 385

associated fibroblasts, CAF), dont le principal rôle est de synthétiser et remodeler la matrice extracellulaire. En plus des facteurs intrinsèques liés à des altérations génétiques et épigénétiques de la cellule tumorale, des facteurs extrinsèques provenant du stroma et de la matrice extracellulaire influencent la réponse des mélanomes aux traitements anti-cancéreux [7]. La matrice extracellulaire est composée de molécules de structure (collagène et élastine) et d'adhérence

(fibronectine), et constitue un réseau dynamique dont les propriétés physico-chimiques influencent l'architecture des tissus. Les tumeurs se caractérisent par un dépôt anormal de matrice extracellulaire. L'augmentation du dépôt et de l'organisation des fibres de collagène conduit à une rigidité accrue de la matrice extracellulaire tumorale par rapport à celle des tissus normaux. Les cellules tumorales sont capables de percevoir ces forces mécaniques et d'y répondre grâce à différents récepteurs de surface, tels que les intégrines [8]. Ce processus de mécanotransduction convertit un signal mécanique en un signal biochimique. Les intégrines sont les récepteurs de la fibronectine et du collagène les mieux décrits. La voie de signalisation des intégrines est suractivée dans de nombreux cancers, et participe à des étapes clés de la progression tumorale ainsi qu'à la résistance thérapeutique. Les signaux propagés via le réseau d'acto-myosine activent la translocation nucléaire de co-activateurs de la transcription, tels que YAP (*yes-associated protein*) ou MRTF (*myocardin-related transcription factor*). YAP est le principal « mécanosenseur » des cellules tumorales [9]. Il contrôle leur prolifération et la résistance aux traitements. Comme YAP, MRTF, en réponse à une augmentation de rigidité de la matrice extracellulaire, est transloqué dans le noyau, où il active l'expression de ses gènes cibles, impliqués dans la contraction du cytosquelette [10]. Comme les CAF, les cellules de mélanome ont la capacité de sécréter leur propre matrice extracellulaire, en particulier après la transition phénotypique mésenchymateuse qui a lieu en réponse aux traitements ciblés [11].

La résistance mésenchymateuse aux thérapies ciblées confère à la cellule de mélanome

des propriétés de fibroblastes activés
Nos recherches sur les processus de résistance non-génétique associée

à la population MITF^{low}/AXL^{high} nous ont conduits à identifier un phénotype remarquable de ces cellules lié à la plasticité mécanique [12]. Par des approches multidisciplinaires fondées sur des modèles de culture cellulaire sur matrices synthétiques de collagène de rigidité contrôlée et sur des techniques d'imagerie optique et biophysique de la matrice extracellulaire, nous avons montré que la résistance non-génétique associée à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux s'accompagne d'une forte sensibilité aux contraintes mécaniques de la matrice extracellulaire. En analysant la signalisation de la mécanotransduction, nous avons observé que les cellules résistantes MITF^{low}/AXL^{high} sont plus sensibles à la rigidité matricielle que les lignées parentales sensibles aux BRAFi. Leur ensemencement sur un substrat rigide stimule leur prolifération et s'accompagne d'un étalement plus prononcé, de la formation d'un grand nombre d'adhérences focales, d'un remodelage du cytosquelette d'actine et de l'activation des mécanosenseurs YAP et MRTF (Figure 2). En revanche, cette « mécanosensibilité » n'est pas observée dans les mélanomes ayant acquis une résistance génétique par une mutation de NRAS. Les cellules résistantes mésenchymateuses possèdent d'autres propriétés des CAF et des myofibroblastes présents dans les fibroses [11]. Elles produisent des forces de tension et de remodelage du collagène, et synthétisent une matrice extracellulaire abondante et fibrillaire, qui protège les mélanomes porteurs de mutations de BRAF « naïfs » des thérapies ciblées. Enfin, le ciblage de YAP ou MRTF inhibe les propriétés contractiles des cellules MITF^{low}/AXL^{high} et restaure leur sensibilité thérapeutique, démontrant l'implication des voies de la mécanotransduction dans la résistance aux thérapies ciblées. Des analyses bioinformatiques des biopsies de mélanomes humains indiquent également que l'expression de gènes

liés à la mécanotransduction et au remodelage matriciel est associée à l'échappement aux thérapies ciblées et aux rechutes [12].

Les thérapies ciblées induisent une reprogrammation biomécanique des mélanomes avec mutation de BRAF

Nous avons ensuite cherché à savoir si cette reprogrammation mécanique résultait d'une adaptation rapide des cellules sensibles aux inhibiteurs de la voie MAP ERK. Nous avons donc traité plusieurs lignées sensibles par Vémurafénib ou Tramétinib. *In vitro*, l'inhibition de la voie MAP ERK induit un changement morphologique et un remodelage du cytosquelette d'actine, accompagné de la translocation nucléaire de YAP et MRTF et de l'expression accrue de plusieurs de leurs gènes cibles (Figure 2). De plus, ce traitement augmente la contraction des cellules sensibles, et conduit au dépôt d'une matrice extracellulaire remodelée capable de conférer une résistance thérapeutique à des mélanomes « naïfs ». Nous avons ensuite confirmé dans des modèles de xénotransplante de mélanome humain avec mutation de BRAF issus de lignées cellulaires ou dérivés de biopsies de patient (*patient-derived xenograft, PDX*), que les thérapies ciblées provoquent un remodelage du stroma tumoral, un alignement des fibres de collagène et une rigidification de la tumeur. Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de YAP prévient le remodelage matriciel induit par les thérapies ciblées et améliore leur efficacité [12].

Perspectives

Nos travaux ont révélé un nouveau mécanisme d'adaptation des mélanomes avec mutation de la protéine BRAF aux thérapies ciblées, qui conduit à la production et au remodelage de la matrice extracellulaire, à la rigidification de la tumeur et à l'activation de la signalisation de la mécanotransduction. L'inhibition de la voie MAPK alimente une boucle mécanique

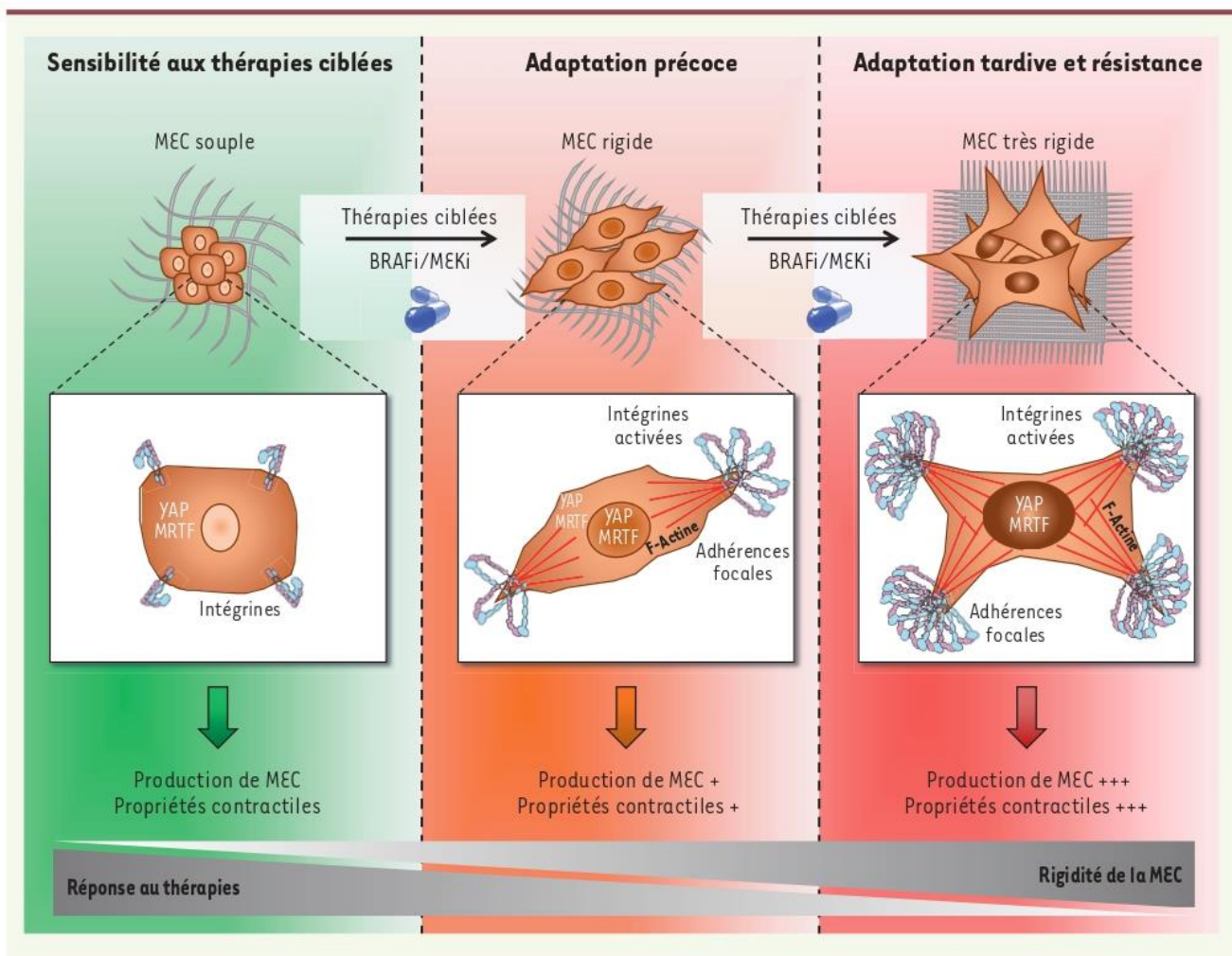


Figure 2. Les thérapies ciblant la voie oncogénique $BRAF^{V600E/K}$ induisent une reprogrammation biomécanique des cellules de mélanome. Le traitement combiné par des inhibiteurs de BRAF (BRAFi) et de MEK (MEKi) promeut une rigidification de la tumeur par une boucle de rétrocontrôle positif entre les signaux biomécaniques transmis par la matrice extracellulaire (MEC) et les voies intracellulaires de la mécanotransduction, conduisant à un échappement thérapeutique. En réponse aux thérapies ciblées, les cellules de mélanome s'adaptent en produisant une MEC abondante et fibrillaire, qui participe à la rigidification de la tumeur et à l'activation des voies de signalisation mécanosensibles. Cette boucle entraîne une activation des intégrines avec une augmentation du nombre d'adhérences focales, et une réorganisation du cytosquelette d'actine associée à une polymérisation de l'actine en actine filamentueuse (F-actine). Ces évènements moléculaires induisent la translocation au noyau des co-activateurs de la transcription YAP (*yes-associated protein*) et MRTF (*myocardin-related transcription factor*), et l'activation de programmes transcriptionnels impliqués dans la production de forces contractiles, le remodelage de la MEC environnante, et la résistance aux thérapies ciblées. À l'inverse, une MEC « souple » n'active que faiblement les intégrines, l'assemblage des adhérences focales, et maintient YAP et MRTF dans le cytoplasme. En l'absence de signaux biomécaniques, la cellule cancéreuse est plus sensible aux thérapies ciblées.

de rétroaction positive, dans laquelle les co-activateurs de la transcription YAP et MRTF jouent un rôle pivot en favorisant la résistance aux thérapies ciblées. De plus, le ciblage de YAP prévient la réponse adaptative aux thérapies ciblées et améliore leur efficacité. Nos résultats indiquent que prévenir le dialogue biomécanique des mélanomes avec leur microenvironnement matriciel permet-

trait de prolonger l'action des thérapies ciblées, d'éviter les rechutes, et d'améliorer la prise en charge des patients atteints de mélanome métastatique. \diamond

Melanoma therapeutic escape: the biomechanical track

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Cancer Genome Atlas N. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 2015 ; 161 : 1681-96.
2. Rambow F, Marine JC, Goding CR. Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev* 2019 ; 33 : 1295-318.
3. Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, et al. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* 2006 ; 19 : 290-302.

RÉFÉRENCES

- Rathore M, Girard C, Dhanna M, *et al.* Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 2019 ; 38 : 5873-89.
- Hugo W, Shi H, Sun L, *et al.* Non-genomic and immune evolution of melanoma acquiring MAPKi resistance. *Cell* 2015 ; 162 : 1271-85.
- Buache E, Rio MC. Le stroma tumoral : un terreau fertile pour la cellule cancéreuse. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 385-90.
- Almeida FV, Douglass SM, Fane ME, Weeraratna AT. Bad company: Microenvironmentally mediated resistance to targeted therapy in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2019 ; 32 : 237-47.
- Levental KR, Yu H, Kass L, *et al.* Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009 ; 139 : 891-906.
- Dupont S, Morsut L, Aragona M, *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 2011 ; 474 : 179-83.
- Foster CT, Gualdrini F, Treisman R. Mutual dependence of the MRTF-SRF and YAP-TEAD pathways in cancer-associated fibroblasts is indirect and mediated by cytoskeletal dynamics. *Genes Dev* 2017 ; 31 : 2361-75.
- Diazzi S, Tartare-Deckert S, Deckert M. Bad neighborhood: fibrotic stroma as a new player in melanoma resistance to targeted therapies. *Cancers* 2020 ; 12 : 1364.
- Girard CA, Lecacheur M, Ben Jouira R, *et al.* A Feed-forward mechanosignaling loop confers resistance to therapies targeting the MAPK pathway in BRAF-mutant melanoma. *Cancer Res* 2020 ; 80 : 1927-41.

Article 2 :

Mechanical activation of the collagen receptors DDR1 and DDR2 promotes mesenchymal-like melanoma cells aggressiveness through actomyosin/YAP pathway

I. Contexte

Les cellules de mélanome sont définies par leur grande plasticité et leur hétérogénéité, leur permettant de s'adapter à un nouvel environnement ou à un stress comme les thérapies ciblées. La progression de plusieurs cancers solides comme le cancer du sein ou du pancréas s'accompagne d'une fibrose qui conduit à la rigidification des tissus tumoraux comparés aux tissus sains adjacents (Butcher et al., 2009). Cette rigidification permet aux cellules tumorales d'augmenter leur prolifération, leur invasion et leur résistance thérapeutique. Cette rigidification tumorale a également lieu dans le mélanome. Les tumeurs de mélanome vont rencontrer différents environnements au cours de leur progression selon le lieu de formation des métastases (Kirkpatrick et al., 2006). De plus, une rigidification de la MEC tumorale a lieu en réponse aux thérapies ciblées comme nous, et d'autres, l'avons montré dans l'article précédent (Girard et al., 2020 ; Lecacheur et al., 2020)([Article 1](#)) (Long et al., 2019). Toutefois l'influence des signaux biomécaniques émis par le microenvironnement sur la plasticité et la progression du mélanome est relativement peu connue. De plus, l'impact de la diversité phénotypique des cellules tumorales dans les réponses mécaniques n'a pas encore été mis en évidence. C'est à ces questions que la deuxième partie de ma thèse a tenté de répondre.

II. Matériels et Méthodes

- Liste des anticorps :

Anticorps primaires	Fournisseur	Numéro Catalogue	Application et Dilution
AXL	Cell Signaling Technology	4566	WB 1/1000
β -actine	Cell Signaling Technology	3700	WB 1/5000
β 1-intégrine	Sigma	MAB1965	WB 1/1000
Caspase 3 totale	Cell Signaling Technology	9662	WB 1/1000
Caspase 3 clivée	Cell Signaling Technology	9661	WB 1/1000
CTGF	Santa Cruz	sc-365970	WB 1/500
CYR61	Santa Cruz	sc-374129	WB 1/500
Ⓢ(Tyr792)-DDR1	Cell Signaling Technology	11994	WB 1/1000 IF 1/200
DDR1	Cell Signaling Technology	5583	WB 1/1000
Ⓢ-DDR1/DDR2	R&D system	MAB25382	WB 1/1000 IF 1/200
DDR2	Cell Signaling Technology	12133	WB 1/1000
E2F1	Cell Signaling Technology	3742	WB 1/1000
Ⓢ(Thr202/Tyr204)-ERK	Cell Signaling Technology	9101	WB 1/1000
ERK	Santa Cruz	sc-1647	WB 1/500
HSP60	Santa Cruz	sc-59567	WB 1/500
HSP90	Santa Cruz	sc-13119	WB 1/1000
Ki67	Abcam	ab16667	IF 1/200
Ⓢ(S19)-MLC2	Cell Signaling Technology	3671	WB 1/1000
MLC2	Cell Signaling Technology	8505	WB 1/1000
MITF	Sigma	HPA003259	WB 1/1000
P27Kip1	Cell Signaling Technology	3686	WB 1/1000
Ⓢ(S807/811)-Rb	Cell Signaling Technology	9308	WB 1/1000
Rb	Cell Signaling Technology	9309	WB 1/1000
Ⓢ(Y100)-Tyrosine	Cell Signaling Technology	9411	IF 1/800
YAP	Cell Signaling Technology	14074	WB 1/1000 IF 1/100
ZEB1	Santa Cruz	25388	WB 1/500

Anticorps secondaire	Fournisseur	Numéro Catalogue	Application et Dilution
Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling Technology	7076	WB 1/2000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling Technology	7074	WB 1/2000
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11034	IF 1/200
Goat anti-mouse Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11029	IF 1/200
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 594	Invitrogen	A11012	IF 1/200
Goat anti-mouse Alexa Fluor 594	Invitrogen	A11005	IF 1/200

- Liste des inhibiteurs :

Inhibiteurs	Fournisseur	Numéro Catalogue	Concentration stock / utilisée
Blebbistatin	Selleckchem	S7099	10mM / 40 μ M
DDR1in1	Selleckchem	S7498	10mM / 1 μ M
Dabrafenib	Selleckchem	D072	10mM / 1 μ M
Imatinib	Enzo Life Science	ALX-270-492	10mM / 7 μ M
Trametinib	Selleckchem	SE-2673	10mM / 0,1 μ M
Y27632	Selleckchem	S1049	10mM / 40 μ M

- Liste des séquences de primers :

Gènes	Forward	Reverse
AMOTL2	GCGACTGTCCAGAACAACTGC	GCACCTTAACTGCTTTCCA
AXL	GTGGGCAACCCAGGGAATATC	GTACTGTCCCGTGTCCGAAAG
CDH2	CCACGCCGAGCCCCAGTAT	GGCCCCCAGTCGTTCCAGGTAAT
CTGF	ACCGACTGGAAGACACGTTTG	CCAGGTCAGCTTCGCAAGG
CTNNB1	CCGCAAATCATGCACCTTT	ATTTCTTCCATGCGGACCC
CYR61	TGAAGCGGCTCCCTGTTTT	CGGGTTTCTTTCACAAGGCG
DDR1	ATGGAGCAACCACAGCTTCTC	CTCAGCCGGTCAAACCTCAAACCT
DDR2	AGTCAGTGGTCAGAGTCCACAGC	CAGGGCACCAGGCTCCATC
ERBB3	GGTGATGGGGAACCTTGAGAT	CTGTCACTTCTCGAATCCACTG
HPRT	AGATGGTCAAGGTCGCAAGCT	CATACCTAGCGACCACCAAGAAT
MLANA	GCTCACTTCATCTATGGTTACCC	GACTCCCAGGATCACTGTCAG
MITF	CATTGTTATGCTGGAAATGCTAGAA	GGCTTGCTGTATGTGGTACTTGG
NGFR	CCTACGGCTACTACCAGGATG	CACACGGTGTCTGCTTGT
RPL32	CCTTGTGAAGCCCAAGATCG	TGCCGGATGAACTTCTTGGT
SERPINE1	CCGCTCTCCACAAAATCA	CAGTTCAGGATGTCGTAGTAATGG
SOX9	CCCAACGCCATCTTCAAGG	GAGACCGTCCCTGCTGTGTT
SOX10	CCTTCATGGTGTGGGCTC	CGCTTGTCACTTTCGTTGAG
WNT5A	CAATGTCTTCCAAGTTCTTCTAGTG	CATACCTAGCGACCACCAAGAAT
YAP	GCTACAGTGTCCCTCGAACC	CCGGTGCATGTGTCTCCTTA
ZEB1	AGCGCTTCTCACACTCTGGGTCTT	CTGCCTCTTCTGCTCTGTGC
ZEB2	GCGCAGTGACACAGCCATTATTTA	CTTGTAGCCCCGGTCCGAGTA

- *Culture cellulaire et réactifs.*

La lignée de cellules de mélanome 501Mel provient du laboratoire du Dr R Halaban (USA) comme décrit par (Didier et al., 2018). La lignée cellulaire 1205Lu provient de Rockland (USA). Les cellules fraîchement isolées de biopsie de patients ont été données par le Dr Jean Christophe Marine (Verfaillie et al., 2015).

Les lignées cellulaires ont été cultivées en DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) supplémenté avec 7% de SVF (Sérum de Veau Foetal, Hyclone) et 1% de Penicilline/Streptomycine (Gibco). Les cellules fraîchement isolées de biopsie de patients ont été cultivées en « Ham's F10 nutrient mix » (Gibco) supplémenté avec 10% de SVF, 7% de Glutamax (Gibco) et 1% de Penicilline/Streptomycine (Gibco).

Pour garantir l'authenticité des cellules, elles ont été amplifiées puis congelées à faible passage après leur réception, à partir du stock d'origine, et utilisées un nombre limité de passages après leur décongélation. Toutes les lignées ont été testées fréquemment pour leur absence de mycoplasme par PCR. Les réactifs de culture ont été achetés chez Thermo Fisher Scientific.

Les adénovirus exprimant DDR1 ou DDR2 ou portant le vecteur pcDNA3 avec une cassette d'expression vide, utilisé comme contrôle, ont été achetés chez Addgene. Les adénovirus ont été amplifiés comme décrit précédemment (Gaggioli et al., 2005).

- *Préparation des supports de différentes rigidités :*

Hydrogels de polyacrylamide : Les hydrogels ont été générés à partir d'un mélange d'acrylamide 40% (Fisher Bioreagents) et de bisacrylamide 2% (Fisher Bioreagents) pour obtenir différentes rigidités. Ce mélange a été coulé entre deux lamelles en verre. Après 10min de polymérisation à température ambiante, les hydrogels ont été coatés pendant 45min à 37°C avec du collagène de type I puis stérilisés sous UV pendant 30min. Après 45min d'équilibrage dans du milieu DMEM, les cellules peuvent être ensemencées dessus.

Gels de collagène/matrigel : Les gels de collagène souples ou rigides ont été produits en mélangeant du collagène avec du Matrigel® (Sigma), comme décrit par Grasset et al. (Grasset et al., 2018) (*Annexe D*).

- *Prolifération cellulaire :*

La prolifération cellulaire a été mesurée par comptage des noyaux soit avec des cellules infectées avec un lentivirus NuLight Red en utilisant le microscope Incucyte ZOOM™ (Essen BioScience) ; soit en marquant les cellules avec du Hoechst (33342) ; soit en marquant les cellules avec du Ki67 et du Hoechst et visualisée en utilisant un microscope à fluorescence (Leica DMI6000, grossissement 5X).

- Cytométrie en flux :

Cycle cellulaire : Les profils de cycle cellulaires ont été déterminés par cytométrie en flux, en analysant les cellules marquées à l'Iodure de Propidium (PI, propidium iodide). Les cellules ont été ensemencées sur supports souples ou rigides puis traitées par des doses indiquées d'inhibiteurs pour 72h, puis détachées, lavées et fixées à l'éthanol 70% froid pour au moins 24h. Les cellules ont ensuite été marquées pendant 15min à température ambiante avec 40µg/mL de PI (Sigma) dans du tampon FACS (PBS 1X + 0.5% BSA + 1mM EDTA) supplémenté avec 100µg/mL de RNase A (Sigma). Les profils de cycle ont été collectés sur le cytomètre FACSCanto II (Becton Dickinson).

Apoptose : La mort cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux. Après avoir subi les mêmes conditions que celles mentionnées au-dessus, l'ensemble des cellules (en suspension + adhérentes) ont été collectées, lavées dans le tampon de liaison à l'Annexin (Miltenyi Biotec) et marquées avec de l'Annexin-FITC et du PI pendant 15min à température ambiante dans le noir, d'après les recommandations du fournisseur (Miltenyi Biotec). La mort cellulaire a été analysée sur le cytomètre FACSCanto II (Becton Dickinson).

Toutes les analyses de FACS ont été réalisées à l'aide du logiciel FlowJo.

- Vidéomicroscopie :

Les cellules ont été marquées par du Hoechst pendant 5min et leur migration a été suivie par microscopie en temps réel, dans une chambre à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 24h en prenant 1 image toutes les 10min, avec un microscope inversé à fluorescence plein champ (Leica DMI6000, 5X). Le déplacement des cellules a été analysé et quantifié à l'aide du plugin TrackMate, un plugin semi-automatique du logiciel Fiji (ImageJ) (Tinevez et al., 2017).

- Invasion en chambre de Boyden :

L'invasion a été étudiée en chambre de Boyden (6,5mm de diamètre, porosité 8µm, Corning). Les inserts ont été recouverts d'une couche de Matrigel® pendant la nuit à 4°C et ont été équilibrés le lendemain pendant 1h à 37°C dans milieu sans SVF. Les cellules ont été ensemencées pendant 7 jours sur support souple ou rigide et déprivées en sérum pendant la nuit précédant la dissociation. Le lendemain, elles ont été dissociées, resuspendues dans du milieu sans SVF puis incubées pendant 30min à 37°C. 150 000 cellules ont été déposées dans la chambre supérieure et du milieu avec 10% de SVF dans la chambre inférieure. Après 24h, les cellules ayant traversé le filtre ont été fixées avec du PFA puis marquées avec du Hoechst. La quantification des cellules a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji (ImageJ) en comptant le nombre de cellules de 4 champs différents, photographiés à l'aide d'un microscope à fluorescence plein champ (Leica DMI6000, 5X).

- *Transfection transitoire d'ARN interférents*

Les siARN ciblant YAP, DDR1 et DDR2 proviennent de Life Technologies. 25nM (siARN contre DDR1 et DDR2) ou 50nM (siYAP) de siARN ont été transfectées dans les cellules à l'aide de Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), selon les instructions du fournisseurs.

Gène	Fournisseur	Référence
Ctrl	Stealth	Custom
DDR1 seq1	Stealth	#HSS187878
DDR1 seq2	Stealth	#HSS187878
DDR2 seq1	Stealth	#HSS107350
DDR2 seq2	Stealth	#HSS107352
YAP seq1	Stealth	#HSS115942
YAP seq2	Stealth	#HSS115944

- *Western Blot :*

Les cellules ont été lysées à froid dans du tampon RIPA (Millipore) + inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Thermo Scientific). Les lysats ont été soniqués puis centrifugés pendant 15min à 13 300 rpm à 4°C. Après dosage colorimétrique (DC protein assay-Biorad), 30µg de protéines totales ont été reprises dans du tampon Laemmli (Thermofisher), dénaturées 5min à 95°C, séparées sur gel de polyacrylamide puis transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidene Fluoride, Amersham Biosciences). Après coloration au rouge ponceau, les membranes ont été saturées pendant 1h à température ambiante dans du tampon de saturation (3% BSA, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 10mM Tris pH 7,4) et incubées avec les anticorps primaires à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, les membranes ont été rincées dans du tampon de lavage (280mM NaCl, 20mM Tris pH 7,4, 1% Triton), incubées 1h à RT avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (HRP) puis après de nouveaux lavages, révélées par chimioluminescence (ECL, Amersham Biosciences).

- *Extraction d'ARN totaux, Reverse transcription et qPCR :*

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit Nucleospin®RNA plus selon les recommandations du fournisseur (Macherey-Nagel). La quantité d'ARN extraite a été mesurée grâce au Nanodrop (Thermo scientific). 2,5µg d'ARN ont été reverse transcrits à l'aide du kit High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). L'amplification en temps réel des amplicons correspondants à différents gènes cibles a été suivie sur le thermocycler Step One (Applied Biosystem) par incorporation de SYBR Green® (Applied Biosystems). L'analyse des courbes de fusion a permis de vérifier la spécificité des amplicons générés. La séquence des amorces sens et antisens utilisées pour chaque gène est donnée dans le tableau ci-dessous. La quantité relative de chaque cible a été déterminée en fonction de l'expression de gènes de ménage, selon la méthode du $\Delta\Delta Ct$.

- *Microscopie à force de traction (TFM) :*

Les propriétés contractiles exercées par les cellules de mélanome ont été analysées par TFM comme décrit par (Martiel et al., 2015) en utilisant des hydrogels de polyacrylamide de 0,2kPa ou 4kPa recouverts de collagène et de billes fluorescentes (SoftTrac, Cell Guidance Systems). Les cellules ont étéensemencées sur ces hydrogels pendant 48h. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica DMI6000, 10X) avant et après avoir enlevé les cellules de l'hydrogel. Les forces exercées par les cellules ont été estimées en mesurant le déplacement des billes, à l'aide d'une transformation de Fourier et en calculant la traction moyenne quadratique à l'aide du plugin de vitesse d'image de particule (PIV) sur Fiji (ImageJ). La même procédure a été effectuée sur une région sans cellules pour mesurer le bruit de base.

- *Immunofluorescence :*

Les cellules ont étéensemencées soit des hydrogels de polyacrylamide, soit sur des lamelles recouvertes de collagènes pour 72h. Après avoir subi les différentes transfections ou traitements indiqués, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X, fixées en PFA et incubées dans du PBS 1X + Triton 0,3% + Sérum de Chèvre 5% pendant 1h. Les lamelles ont été ensuite incubées avec l'anticorps primaire pendant la nuit à 4°C dans une chambre humide. Le lendemain, elles ont été rincées puis marquées avec un anticorps secondaire et de la phalloïdine couplées à des fluorochromes pendant 1h à température ambiante, à l'obscurité. Les noyaux ont été ensuite marqués au Hoechst et les lamelles montées sur lames avec du milieu de montage (Thermo Fisher Scientific). Les images ont été prises avec un microscope à fluorescence plein champ (Leica DM5500B ou Leica DMI6000, 40X) ou un microscope confocal (Nikon A1R, 60X). La quantification de l'aire des cellules, de la localisation nucléaire de YAP ou du nombre et de l'aire des adhésions focales a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji (ImageJ).

- *Analyse statistique :*

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism (GraphPad). Les résultats représentent la moyenne \pm écart type de triplicats. Selon les expériences, des tests statistiques de type ANOVA (avec correction de Bonferroni), Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis ont été réalisés. Les résultats avec un p-value $< 0,05$ sont considérés comme étant statistiquement significatifs. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$.

III. Résultats

Mon laboratoire d'accueil dispose de différentes lignées de mélanomes et de cellules fraîchement isolées de biopsies de patient (cellules MM) représentatives des différentes mutations (BRAF, NRAS ou triple sauvage) retrouvées chez les patients (table 1). Les cellules 501Mel et les MM057, MM074, MM001 ou MM034 présentent une signature différenciée mélanocytaire et expriment des marqueurs tels que CTNNB1, SOX10 ou MLANA. Les cellules 1205Lu et les MM029, MM099, MM165 et MM047 expriment, quant à elles, des marqueurs du phénotype mésenchymateux tels que AXL, SOX9, ZEB1 (figure 1A). A la différence des lignées 1205Lu et 501Mel, les cellules fraîchement isolées de biopsies de patients expriment le marqueur de cellules souches de la crête neurale, NGFR. Cela signifie qu'elles ont un phénotype plus plastique. Leur classification peut donc être plus précise. D'après la classification proposée par Tsoi et *al.* (Tsoi et al., 2018), les MM057, MM074, MM034 et MM001 possèdent un phénotype transitoire. Les MM029, MM099, MM165 et MM047 présentent un phénotype « Neural Crest Stem Cell Like » (NCSCCL). Dans la suite de cette étude, des cellules fraîchement isolées de biopsie de patients de phénotype NCSCCL et 1205Lu, de phénotype indifférencié, seront appelées « dédifférenciées ». Les cellules mélanocytiques 501Mel et les cellules de patients de phénotype transitoire seront nommées « différenciées ».

Pour tester leur sensibilité aux changements de rigidité de leur microenvironnement, nous les avons ensemencées sur des hydrogels synthétiques de polyacrylamide de faible (<1kPa) ou de forte rigidité (>16 kPa), recouverts de collagène (figure 1B).

Tout d'abord, nous avons évalué la réponse des différentes cellules aux signaux mécaniques matriciels en analysant leur morphologie à l'aide d'un marquage de leur cytosquelette d'actine filamenteuse par la phalloïdine, suivie par une quantification de l'aire cellulaire à l'aide du logiciel Image J. Nous avons observé que les cellules de mélanome de phénotype dédifférencié sont plus étalées et plus larges quand elles sont ensemencées sur un support rigide par rapport à un support souple. En revanche, aucune différence de morphologie n'est observée dans les cellules de mélanome qui présentent un phénotype différencié (figure 1C et figure sup 1A). Cette sensibilité aux signaux rigides du substrat des cellules dédifférenciées s'accompagne d'une augmentation du nombre et de l'aire des adhésions focales (figure 1D et figure sup 1B) et de l'activation du mécanosenseur YAP, mise en évidence par sa translocation nucléaire par immunofluorescence et par l'expression de plusieurs de ses gènes cibles (*AMOTL2*, *CTGF* et *CYR61*), par qPCR (figure 1E et figures sup 1C-D). De plus, nous disposons d'un couple de cellules dédifférenciées ou différenciées mutées sur *NRAS* (Table 1). Leur réponse aux signaux mécaniques suit leur état phénotypique et non leur statut mutationnel.

L'ensemble de ces résultats démontrent que les cellules de mélanomes qui présentent un phénotype dédifférencié sont plus mécanosensibles que les cellules ayant un phénotype différencié, indépendamment de leur statut mutationnel.

Nous avons ensuite analysé les conséquences fonctionnelles des signaux mécaniques sur ces différentes populations de mélanome. L'impact des signaux mécaniques sur la prolifération des cellules de mélanome a été analysé en suivant leur nombre en temps réel par la technologie IncuCyte (figure 2A-B) et à l'aide d'un marquage Ki67 par immunofluorescence (figure sup 2B-C). Indépendamment de leur phénotype, les cellules prolifèrent de façon plus importante lorsqu'elles sont ensemencées sur un support rigide par rapport à un support souple. Toutefois, cet effet est plus prononcé pour les cellules dédifférenciées. Il est important de noter que comparé aux cellules dédifférenciées invasives 1205Lu, les cellules différenciées 501Mel continuent de proliférer sur collagène souple (figure 2A). De même, lorsque les cellules sont ensemencées sur des hydrogels de rigidité croissante, on observe une augmentation de la prolifération dépendante de la rigidité plus prononcée dans les cellules dédifférenciées 1205Lu et MM099 que dans les cellules différenciées 501Mel ou MM074 (figure 2C). L'analyse du cycle cellulaire montre que les cellules dédifférenciées présentent un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 lorsqu'elles sont cultivées sur un support souple et une augmentation de la phase S lors de leur ensemencement sur un support rigide (figure 2D et figure sup 2D). Cela a été confirmé, au niveau biochimique, par l'expression de E2F1 et la phosphorylation de Rb, deux marqueurs de progression dans le cycle, qui sont augmentées sur support rigide, en accord avec l'effet sur la prolifération cellulaire (figure 2E). La voie ERK, constitutivement activée dans les cellules de mélanome mutées BRAF, n'est pas modifiée par la modulation des signaux mécaniques (figure 2E). Ces résultats montrent que la prolifération des cellules de mélanome est favorisée par la rigidification du substrat, de façon plus prononcée dans les cellules dédifférenciées.

La rigidité matricielle a été décrite comme inducteur de l'EMT dans le cancer du sein (Wei et al., 2015a). De plus, dans le mélanome, plusieurs études ont commencé à étudier l'influence des signaux mécaniques sur la plasticité cellulaire mais leurs résultats sont contradictoires (Long et al., 2019; Miskolczi et al., 2018). Nous nous sommes donc demandé comment la rigidité matricielle influence les transitions phénotypiques dans le mélanome. Pour cela, nous avons analysé l'expression des principaux marqueurs de différenciation (MITF et SOX10) et de dédifférenciation (AXL et ZEB1). Etant donné que MITF est important dans la prolifération des cellules de mélanome (Widlund and Fisher, 2003), nous nous sommes demandé si MITF était réexprimé par les cellules dédifférenciées en condition rigide. La rigidification matricielle ne conduit pas à l'expression des marqueurs MITF et SOX10 pour les cellules 1205Lu ou les MM099, cellules dédifférenciées fraîchement isolées de biopsie de patients. En revanche, l'expression du marqueur mélanocytaire SOX10 est augmentée dans les cellules 501Mel et MM074 ensemencées sur un support rigide. De plus, dans les cellules 501Mel, l'expression de MITF est, elle aussi, augmentée par la rigidité matricielle (figure sup 2A), comme cela a été décrit précédemment (Miskolczi et al., 2018). Dans les cellules dédifférenciées, on observe une augmentation des marqueurs mésenchymateux invasifs tels que AXL ou ZEB1 (figure sup 2A). Ces résultats montrent que la rigidité matricielle a un effet différent selon l'état phénotypique des cellules et qu'elle accentue leur phénotype préexistant.

Etant donné que nous avons montré dans l'article 1 que la mécanotransduction contribue à la résistance acquise des cellules de mélanome, nous nous sommes intéressés à l'influence des signaux mécaniques sur la sensibilité des cellules de mélanome aux inhibiteurs de la voie oncogénique BRAF. Pour cela, nous avons cultivé des mélanomes de phénotype différencié (501Mel, MM074) ou dédifférencié (1205Lu, MM099) sur support souple ou rigide et les avons exposés pendant 72h à la combinaison Dabrafénib (inhibiteur de BRAF^{V600}) + Tramétinib (inhibiteur de MEK) (D/T) utilisée en clinique. L'apoptose a été analysée par cytométrie en flux après marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium, et par le clivage de la caspase 3 en western blot (figure 2F-H). Nos résultats indiquent que les cellules 1205Lu survivent à la thérapie ciblée lorsqu'elles sont ensemencées sur un support rigide mais qu'elles meurent en présence de ce même traitement sur un support souple. En revanche, les cellules mélanocytiques 501Mel sont arrêtées en G0/G1 en présence du traitement quelle que soit la rigidité du substrat (figure sup 2E). Ces résultats montrent que la rigidité du collagène délivre des signaux nécessaires pour la survie des cellules dédifférenciées en réponse aux thérapies ciblées.

Nous avons étudié par la suite les capacités migratoires et invasives mécano-induites des cellules de mélanome, en analysant le déplacement des cellules par vidéomicroscopie en temps réel (figure 3A-C), la capacité à remodeler localement leur substrat (figure 3D-E) par microscopie à force de traction (TFM) et la capacité d'invasion en chambre de Boyden (figure 3G-I). La migration et la capacité à exercer des forces au substrat des cellules dédifférenciées sont augmentées lorsque ces cellules sont ensemencées sur une matrice rigide. De plus, contrairement aux cellules différenciées, l'ensemencement des cellules dédifférenciées pendant 7 jours sur support rigide améliore la capacité d'invasion. Ces observations sont en accord avec l'expression augmentée de marqueurs du phénotypique invasif mésenchymateux tels que AXL ou ZEB1 (figure sup 2A). A l'inverse, les cellules différenciées ne voient ni leurs capacités invasives et ni l'expression des marqueurs du phénotype mésenchymateux invasif modifiées par la rigidité du substrat.

L'ensemble des résultats révèle des différences entre les sous-populations de cellules de mélanome dans leur capacité à percevoir la rigidité matricielle et montre que les signaux mécaniques délivrés par la MEC stimulent la prolifération, la résistance aux traitements et la migration/invasion des cellules de mélanome de phénotype dédifférencié indépendamment de leur statut mutationnel.

Dans le but de caractériser le ou les acteurs moléculaires responsables de la différence de mécanosensibilité observée entre cellules différenciées et dédifférenciées, nous avons analysé par western blot l'expression de différents récepteurs connus du collagène tels que l'intégrine $\beta 1$ et les récepteurs tyrosine kinase à domaine discoïdine DDR1 et DDR2 (figure 4A). Nos résultats montrent que l'intégrine $\beta 1$ et les récepteurs DDR1 et DDR2 sont plus exprimés dans les cellules dédifférenciées que dans les cellules différenciées. En revanche, dans les mélanomes dédifférenciés, seuls les DDR voient leur expression induite par la rigidité matricielle. DDR1 et DDR2 sont également retrouvés phosphorylés sur tyrosine et donc plus activés sur support rigide.

Cela s'accompagne d'une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de MLC2 (myosin light chain 2), une protéine clé régulatrice du cytosquelette d'actomyosine (figure 4A).

Pour étudier le rôle des DDR dans le phénotype mécanosensible des cellules différenciées, nous avons ciblé ces récepteurs par ARN interférence ou inhibé leur activité enzymatique à l'aide de 2 inhibiteurs compétitifs de l'ATP (l'Imatinib et le DDR1in1). Par western blot, nous montrons qu'à la fois l'utilisation des siARN ou des inhibiteurs diminuent la phosphorylation de MLC2 dans les cellules 1205Lu et MM099 (figure 4B et figure sup 3A). Le ciblage des DDR diminue également le nombre et l'aire des adhésions focales ainsi que l'activation du mécanotransducteur YAP, visualisée par sa localisation cytoplasmique et la diminution de l'expression de ses gènes cibles (figure 4C-D et figure sup 3B-D). De plus, une analyse bio-informatique de données provenant de tumeurs de mélanome montre qu'il y a une corrélation positive significative entre l'expression de chaque DDR et l'expression de YAP (figure sup 3E). Pour confirmer l'implication des DDR dans l'activation des voies de la mécanotransduction, nous avons surexprimé par une approche adénovirale les récepteurs DDR1 et DDR2 dans les cellules de mélanome différenciées 501Mel et MM074. La surexpression des DDR augmente la phosphorylation de MLC2 ainsi que l'expression protéique des gènes cibles de YAP, CTGF et CYR61 (figure 4E). De plus, la surexpression des DDR induit un changement de morphologie qui s'accompagne d'une augmentation de la taille des cellules, de la formation de fibres de stress, d'une augmentation du nombre et de l'aire des adhésions focales et d'une localisation nucléaire de YAP, quand ces cellules sont ensemencées sur support rigide (figure 4F-G et figure sup 3F). De façon intéressante, un traitement avec de la blebbistatine, un inhibiteur de la myosine II, diminue la translocation nucléaire de YAP et l'expression de ses gènes cibles induites par la surexpression des DDR (figure 4H et figure sup 3G). L'ensemble de ces résultats montrent que DDR1 et DDR2 promeuvent le phénotype mécanosensible des cellules de mélanome en régulant l'activation de la voie YAP, via le cytosquelette d'actomyosine.

Compte tenu de la régulation de la mécanotransduction par les récepteurs DDR1 et 2 et ayant précédemment montré que les cellules de mélanomes différenciées deviennent plus agressives sur un substrat rigide, nous avons analysé la conséquence du ciblage fonctionnel des DDR et des voies actomyosine-YAP sur la prolifération, la migration et la contraction mécano-induite. La déplétion des DDR ou de YAP par siARN (figure 5B) dans les cellules 1205Lu et MM099 entraîne une diminution de leur prolifération et de leurs capacités à se déplacer et à exercer des forces migratoires (figure 5A, C, E). Des résultats similaires sont obtenus après inhibition pharmacologique des DDR et de la voie ROCK/myosin II dans les cellules différenciées (figure sup 4). A l'inverse, la surexpression des DDR dans les cellules 501Mel et MM074 augmente leurs capacités motiles et les forces appliquées au substrat (figure 5D, F). Enfin, la déplétion de YAP par siARN reverse la réponse mécanique induite par la surexpression des DDR sur la motilité des cellules 501Mel (figure 5G et H). Ces résultats suggèrent que la voie DDR/YAP contrôle la prolifération et la migration des cellules de mélanome en réponse aux signaux mécaniques de la matrice extracellulaire.

Pour finir, nous avons étudié l'impact du ciblage des voies de la mécanotransduction sur la résistance thérapeutique mécano-induite des mélanomes dédifférenciés. Pour cela, nous avons ciblé les DDR ou YAP par ARN interférence, puis nous avons exposés les cellules pendant 72h avec la combothérapie Dabrafénib/Tramétinib (D/T). Le suivi de l'apoptose par cytométrie en flux après marquage à l'annexine V et à l'iodure du propidium indique que le ciblage des DDR ou de YAP resensibilise les cellules dédifférenciées au traitement ciblé en induisant leur mort (figure 6A, B). Ces observations ont été confirmées par l'analyse du clivage de la caspase 3 en western blot (figure 6C). Les mêmes résultats ont ensuite été obtenus avec des approches pharmacologiques pour cibler les DDR ou le cytosquelette d'actomyosine (figure 6D).

L'ensemble de nos résultats indique que l'acquisition d'un phénotype dédifférencié mésenchymateux confère une « mécano-addiction » aux cellules de mélanome, dévoilant ainsi une nouvelle vulnérabilité pour ces cellules. Cette « mécano-addiction » se traduit par une augmentation de leurs propriétés prolifératives et invasives ainsi qu'une résistance accrue aux thérapies ciblées lorsqu'elles se retrouvent dans un environnement rigide. Ainsi, les cellules de mélanome en fonction de leur statut phénotypique réagissent différemment aux changements de rigidité matricielle. Nos travaux démontrent également le rôle central joué par les récepteurs à domaine discoïdine DDR et l'axe cytosquelette d'actine/YAP dans ces processus et mettent en évidence un lien fonctionnel nouveau entre DDR et le mécanotransducteur YAP dans les mélanomes.

Ce travail renforce l'idée que le ciblage des interactions entre les cellules tumorales dédifférenciées et leur microenvironnement matriciel peut constituer une approche prometteuse dans le traitement du mélanome récidivant.

IV. Figures

	Mutation status	Phenotypic states
<i>Cell line</i>		
1205Lu	BRAFV600E	Dedifferentiated
501Mel	BRAFV600E	Melanocytic
<i>Short-term patient-derived cell</i>		
MM029	BRAFV600E	Dedifferentiated
MM099	BRAFV600E	Dedifferentiated
MM074	BRAFV600E	Melanocytic
MM034	BRAFV600E	Melanocytic
MM165	NRAS	Dedifferentiated
MM047	NRAS	Dedifferentiated
MM057	NRAS	Melanocytic
MM001	Wild-type	Melanocytic

Table 1 : Phenotypic state and mutation status of the different melanoma cell lines and short-term patient derived melanoma cells used in the study.

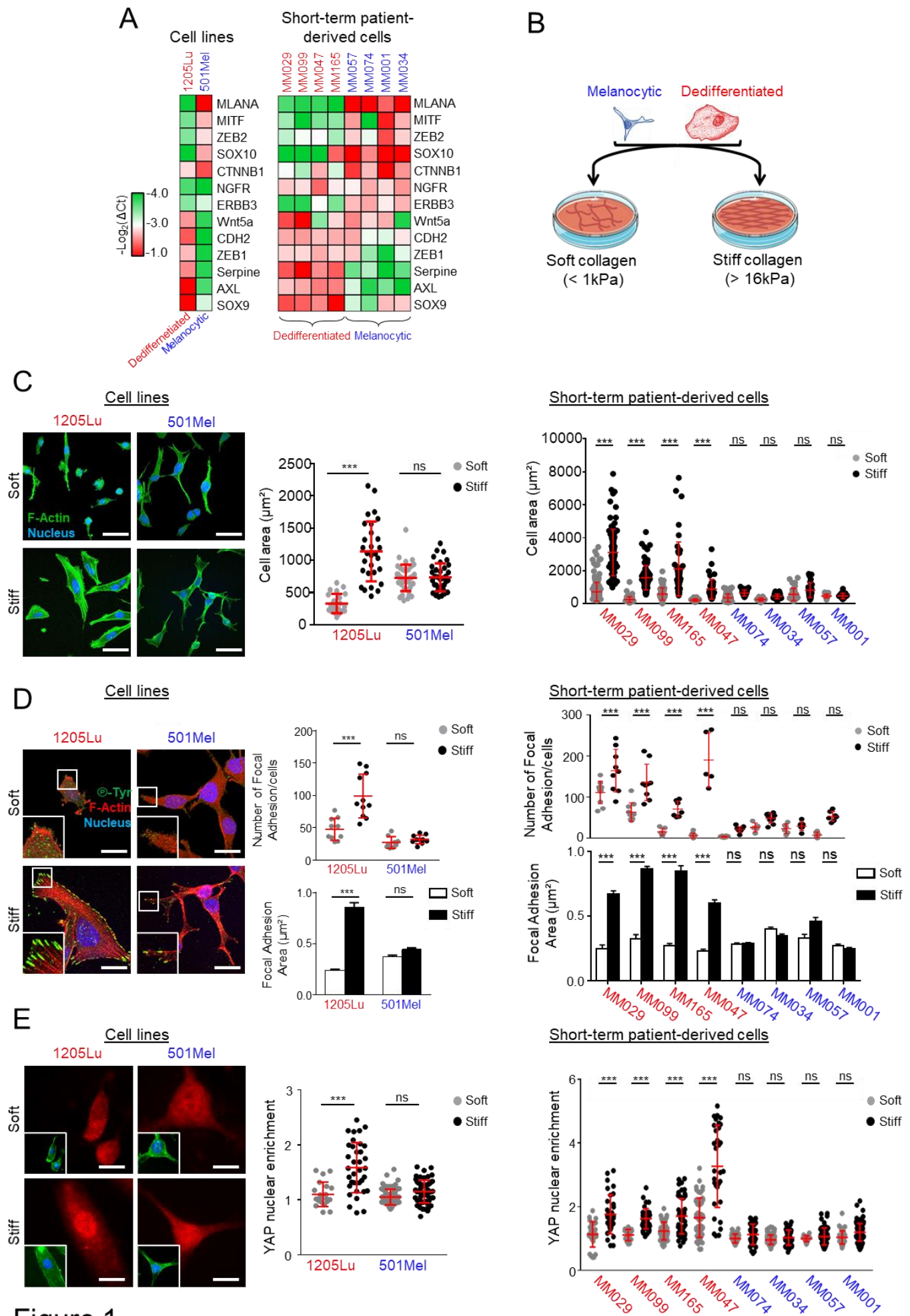


Figure 1

Figure 1: Dedifferentiated melanoma cells display increased sensitivity to collagen stiffening compared to melanocytic melanoma cells.

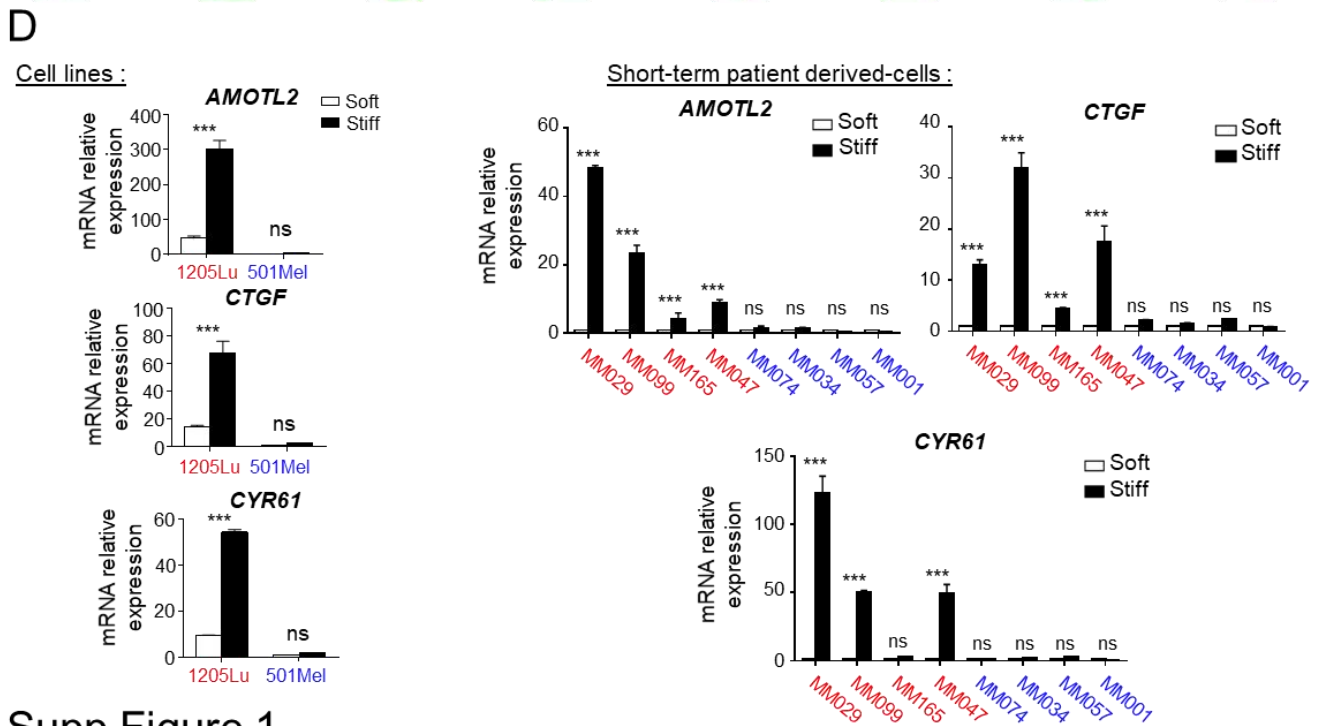
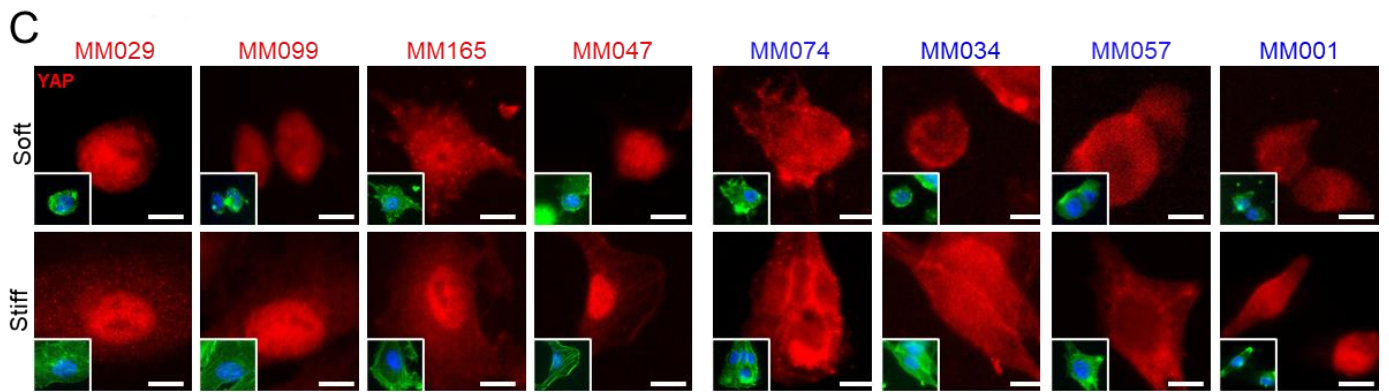
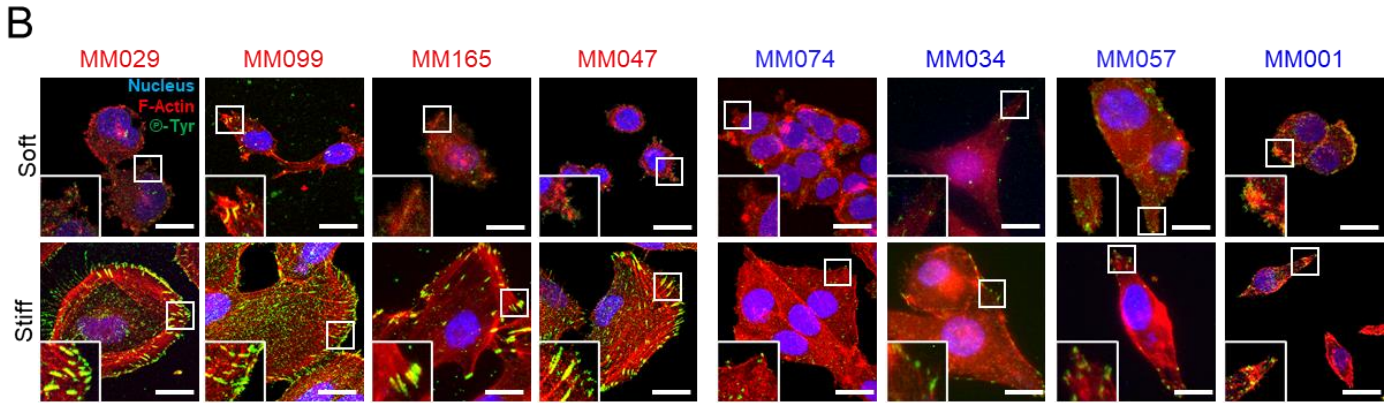
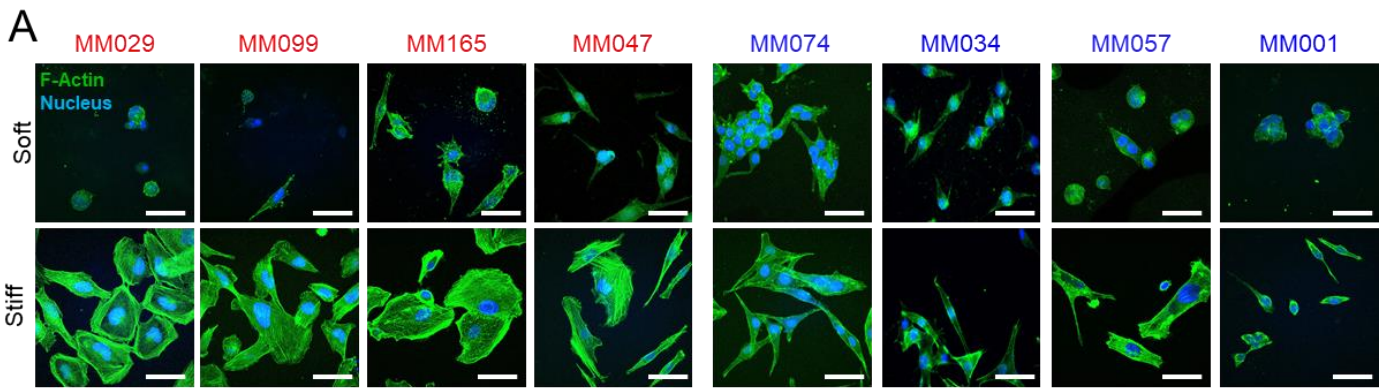
(A) Expression heatmap of phenotype switching markers in melanoma cell lines (*left*) and short-term patient derived melanoma cells (*right*) used in the study. Dedifferentiated cells are in red and melanocytic cells in blue.

(B) Cartoon illustrating the experimental design used to assess melanoma cell sensitivity to collagen-coated substrates of increasing stiffness.

(C) *Left*, Representative images of the morphology of dedifferentiated (1205Lu) or melanocytic (501Mel) melanoma cells cultured for 72h on soft versus stiff collagen-coated substrates. F-Actin was stained with phalloidin (green) and nuclei with Hoechst (blue). Scale bar, 50 μ m. *Right*, quantification of morphological changes of melanoma cell lines (*left*) or short-term patient derived melanoma cells (*right*) cultured as above. Data are representative of 3 independent experiments (n > 150 cells). Data are represented as scatter plot with mean \pm SD. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(D) *Left*, Immunofluorescence analysis of focal adhesions of 1205Lu or 501Mel cells cultured for 72h on collagen-coated soft or stiff substrate. Focal adhesions were stained with anti-Phospho-Tyrosine antibody (green), F-Actin with Phalloidin (red) and nuclei with Hoechst (blue). Insets show higher magnification views of delineated zones. Scale bar, 25 μ m. *Right-top*, Number of focal adhesions per cell of melanoma cell lines (*left*) or short-term patient derived melanoma cells (*right*) cultured as above. Data are representative of 3 independent experiments. Each dot represents a field with 3-10 cells. (n = 10 fields). Data are represented as scatter plot with mean \pm SD. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis. *Right-bottom*, bar graphs show the focal adhesion area of cell lines (*left*), or short-term patient derived cells (*right*) cultured as above. Data represent the mean \pm SD (n > 150 cells) of triplicate experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(E) *Left*, Effect of collagen stiffening on YAP nuclear translocation assessed by immunofluorescence in cells cultured for 72h on soft or stiff collagen substrates. Insets show F-Actin in green and nuclei in blue. Scale bar, 15 μ m. *Right*, YAP nuclear enrichment is represented as scatter plot with mean \pm SD (n \geq 30 cells per condition). Data are representative of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.



Supp Figure 1

Supplemental figure 1 :

(A) Representative images of the morphology of short-term patient derived cells presenting either a melanocytic (in blue) or a dedifferentiated (in red) phenotype cultured for 72h on collagen-coated soft or stiff substrate. F-Actin was stained with phalloidin (green) and nuclei with Hoechst (blue). Scale bar, 50 μ m.

(B) Immunofluorescence analysis of short-term patient derived cells focal adhesions cultured as in (A). Focal adhesions were stained with anti-Phospho-Tyrosine antibody (green), F-Actin with Phalloidin (Red) and nuclei with Hoechst (Blue). Insets show higher magnification views of delineated zones. Scale bar, 20 μ m.

(C) Effect of collagen stiffening on YAP nuclear translocation assessed by immunofluorescence in short-term patient derived cells focal adhesions cultured as in (A). Insets show F-Actin in green and nuclei in blue. Scale bar, 15 μ m.

(D) qPCR analysis of YAP target genes expression in melanoma cell lines (*left*) and short-term patient derived cells (*right*) cultured as in (A) for 72h. Data are normalized to the expression in cells plated on soft substrate. Data are represented as mean \pm SD from a technical triplicate representative of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, two-way ANOVA analysis.

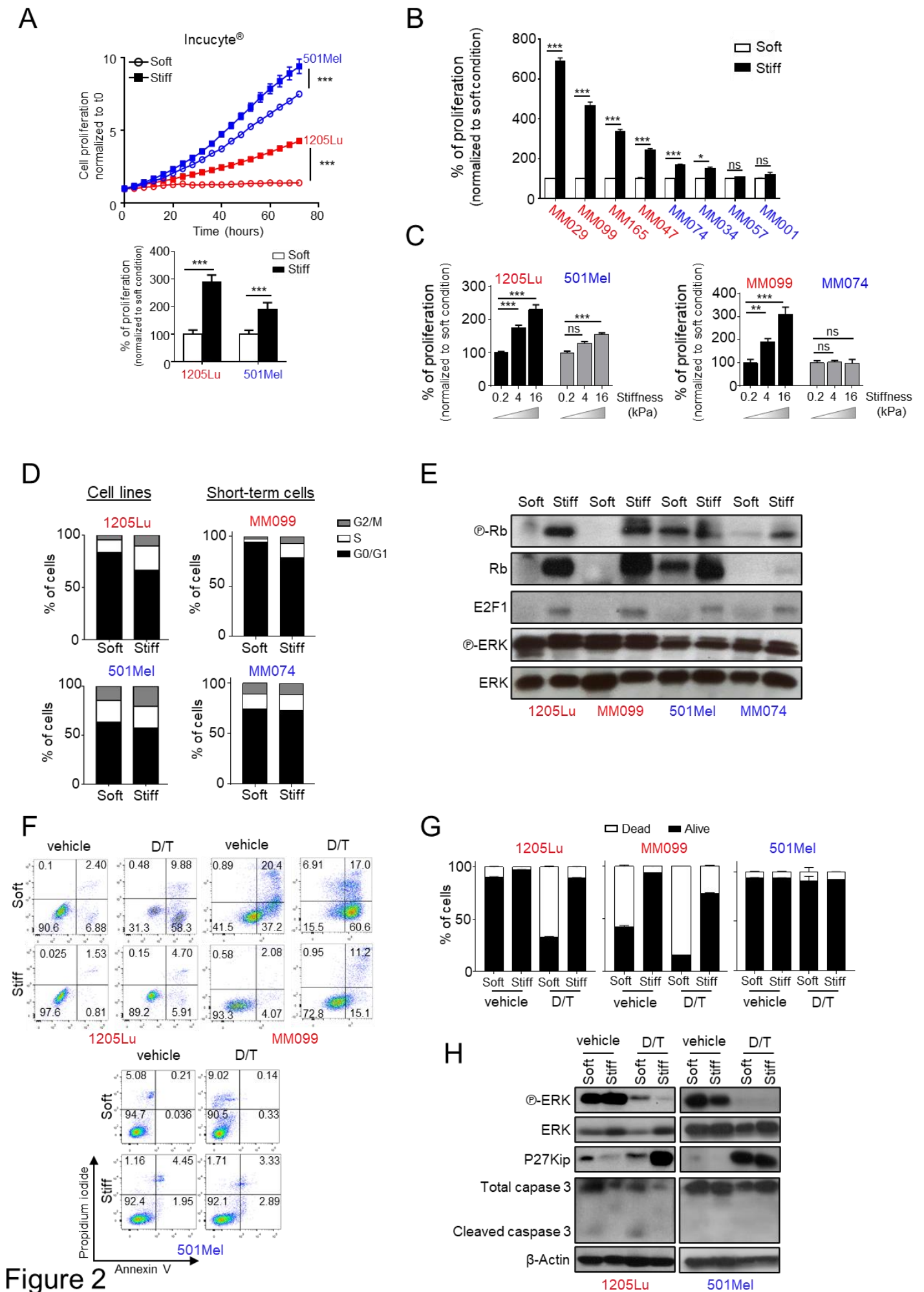


Figure 2

Figure 2 : Dedifferentiated melanoma cells display mechano-dependent proliferative and therapy resistance properties.

(A) *Top*, Time lapse analysis of 501Mel or 1205Lu melanoma cell lines proliferation cultured for 72h on soft or stiff collagen-coated gels, analysed using the IncuCyte system. Graphs show quantification of cell numbers from NucLight Red nuclear object counting. Data are the mean \pm SD, from a minimum of 10 fields per conditions. ***, $P < 0.001$, two-way ANOVA analysis. *Bottom*, Bar graph of cell proliferation after 72h culture on soft or stiff collagen-coated substrate. Data are normalized to proliferation on soft condition ***, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis analysis ($n = 3$).

(B) Bar graph of short-term patient-derived melanoma cell proliferation measured at 72h post seeding on soft or stiff collagen-coated substrate. Data are normalized to proliferation on soft condition ***, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis analysis; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis. Data are representative of 3 independent experiments.

(C) Bar graph of proliferation of 1205Lu versus 501Mel cell lines (*left*) or MM099 versus MM074 short-term patient derived cells (*right*) seeded on polyacrylamide collagen-coated hydrogels of increasing stiffness. Data are normalized to proliferation on soft condition. Data are representative of 3 independent experiments. ***, $P < 0.001$; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

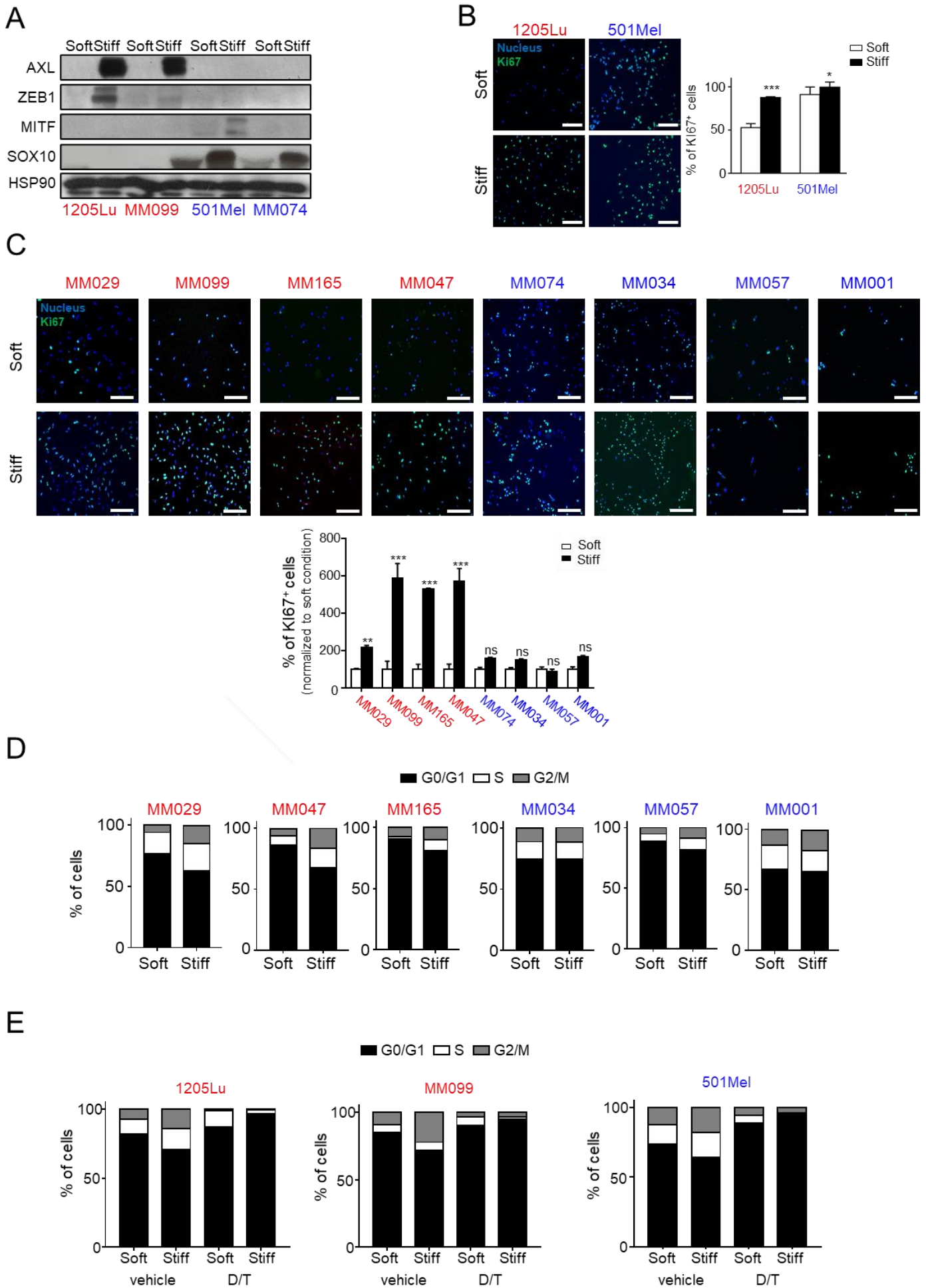
(D) Cell cycle distribution of melanoma cell lines (1205Lu or 501Mel) or short-term patient-derived melanoma cells (MM099 or MM074) plated for 72h on the substrates as in (A).

(E) Immunoblot analysis of cell cycle markers on lysates from cells obtained from (D). ERK is used as loading control.

(F) Quantification of apoptosis in 1205Lu, MM099 or 501Mel cells seeded on soft or stiff collagen-coated substrate and exposed for 72h to vehicle or $1\mu\text{M}$ of Dabrafenib and $0.1\mu\text{M}$ of Trametinib (D/T). The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry analysis of annexin V-FITC/PI-stained cells.

(G) Bar graph showing the percentage of dead (*white square*) and live (*black square*) cells from (F). Data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(H) Immunoblot analysis of cell cycle and apoptotic markers on lysates from melanoma cell lines 1205Lu or 501Mel obtained from (F). β -Actin is used as loading control.



Supp Figure 2

Supplemental figure 2 :

(A) Immunoblot of indicated markers of phenotype switching on lysates from cell lines or short-term patient derived cells cultured for 72h on soft or stiff collagen-coated substrates. HSP90 is used as loading control.

(B) *Left*, Proliferation of 1205Lu or 501Mel cells plated for 72h on soft or stiff collagen substrates assessed by Ki67 staining (green). Scale bar, 150 μ m. *Right*, Bar graph representing the % of Ki67 positive cells per field. 5 fields containing each 20-100 cells were analysed. Data are representative of 3 independent experiments. Data represent mean \pm SD. ***, P<0.001; *, P<0.05, Kruskal- Wallis analysis.

(C) *Top*, Proliferation of short-term patient derived melanoma cells cultured for 72h on soft or stiff collagen-coated substrates, assessed by Ki67 staining (green). Scale bar, 150 μ m. *Bottom*, Bar graph representing the % of Ki67 positive cells per field. 6-7 fields containing each 20-100 cells were analysed. Data are representative of 3 independent experiments. Data represent mean \pm SD. ***, P<0.001; **, P<0.01; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(D) Cell cycle distribution of melanoma short-term patient derived cells cultured for 72h on soft or stiff collagen-coated substrates, analysed by flow cytometry.

(E) Cell cycle distribution of 1205Lu, MM099 or 501Mel cells seeded on soft or stiff substrate collagen-coated and treated or not (vehicle) for 72h with 1 μ M of Dabrafenib and 0.1 μ M of Trametinib (D/T).

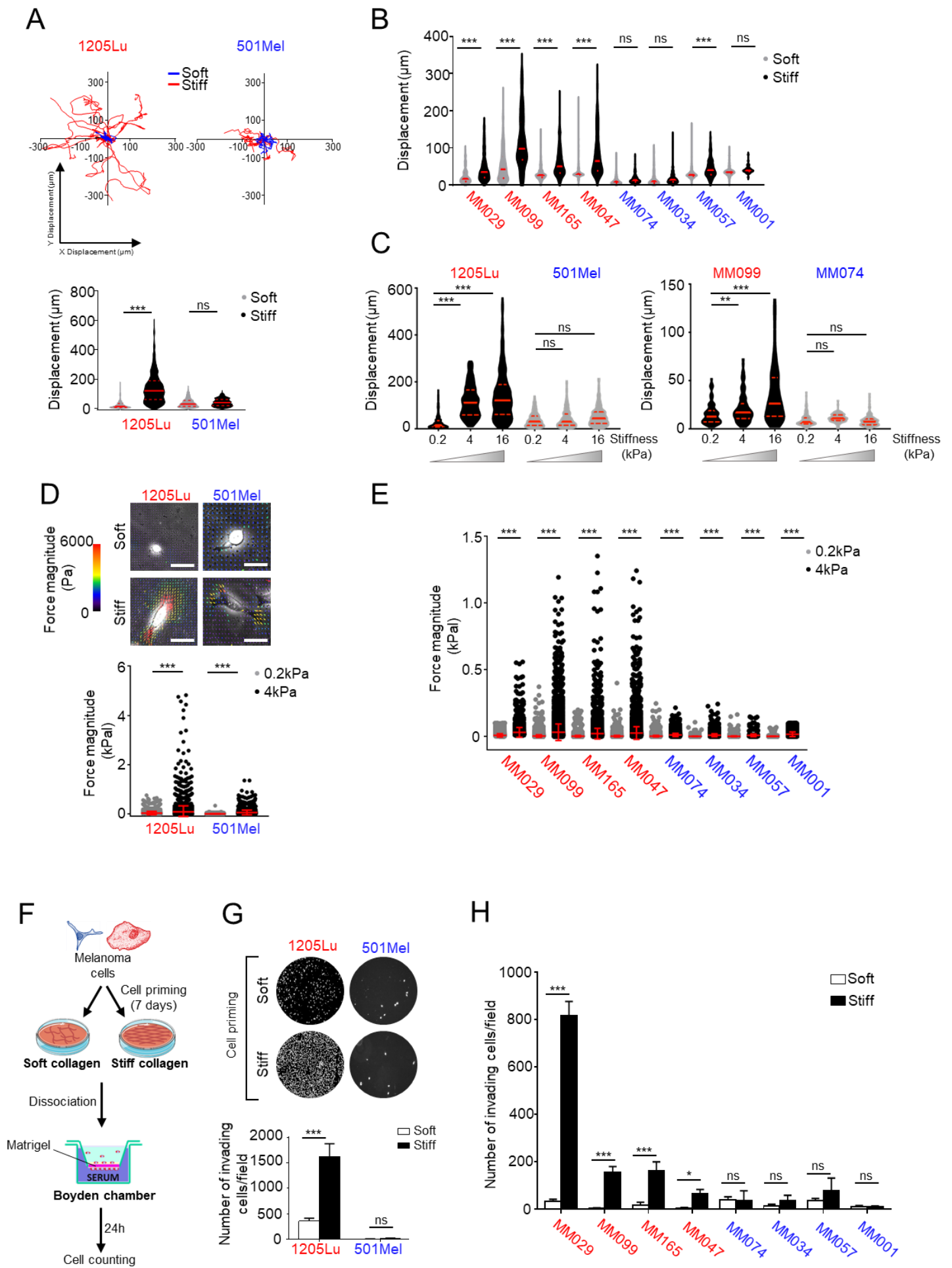


Figure 3

Figure 3 : Collagen stiffening increases dedifferentiated melanoma cells motile and invasive behavior.

(A) *Top*, Melanocytic (501Mel) versus Dedifferentiated (1205Lu) melanoma cells were plated on soft or stiff collagen-coated substrates for 24h, and cell migration was recorded over 24h and automatically tracked using ImageJ. For each condition, spider plots were created and cell displacement was analysed using the ImageJ. *Bottom*, Quantification of cell displacement (n = 200 cells). Data represent median \pm quartiles. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(B) Violin plot representing cell displacement of short-term patient derived cells seeded as in (A). Data represent median \pm quartiles. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(C) Quantification of cell displacement of melanoma cells 1205Lu and 501Mel or MM099 and MM074 plated on collagen-coated polyacrylamide hydrogels of increasing stiffness for 24h (n < 300 cells). Data represent median \pm quartiles. Data are representative of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(D) *Top*, Representative images of heat scale plot showing the traction forces applied by 1205Lu or 501Mel cells seeded on 0.2 or 4kPa fluorescent bead-embedded collagen coated hydrogels for 24h. Scale bar, 75 μ m. *Bottom*, quantification of contractile forces. Data are the mean \pm SD (n = 10 cells/field from 5 random fields). Data are representative of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(E) Scatter plot representing the quantification of contractile forces applied by short-term patient derived melanoma cells on 0.2 or 4kPa fluorescent bead-embedded collagen coated hydrogels for 24h. Data are represented as mean \pm SD of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(F) Melanoma cells (cell lines or short-term patient derived cells) presenting either a melanocytic or a Dedifferentiated phenotype were seeded for 7 days on soft or stiff collagen-coated substrates, then detached and counted. Their invasive properties were subsequently analysed in Boyden chamber for 24h.

(G) Representative images (*top*) and quantification (*bottom*) of invading cells in the different conditions. Bar graph represents the mean \pm SD of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(H). Quantification of invasive properties of indicated short term patient derived cells treated as in (F). Data represent the mean \pm SD of 3 independent experiments. ***, P<0.001; *, P< 0,05; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

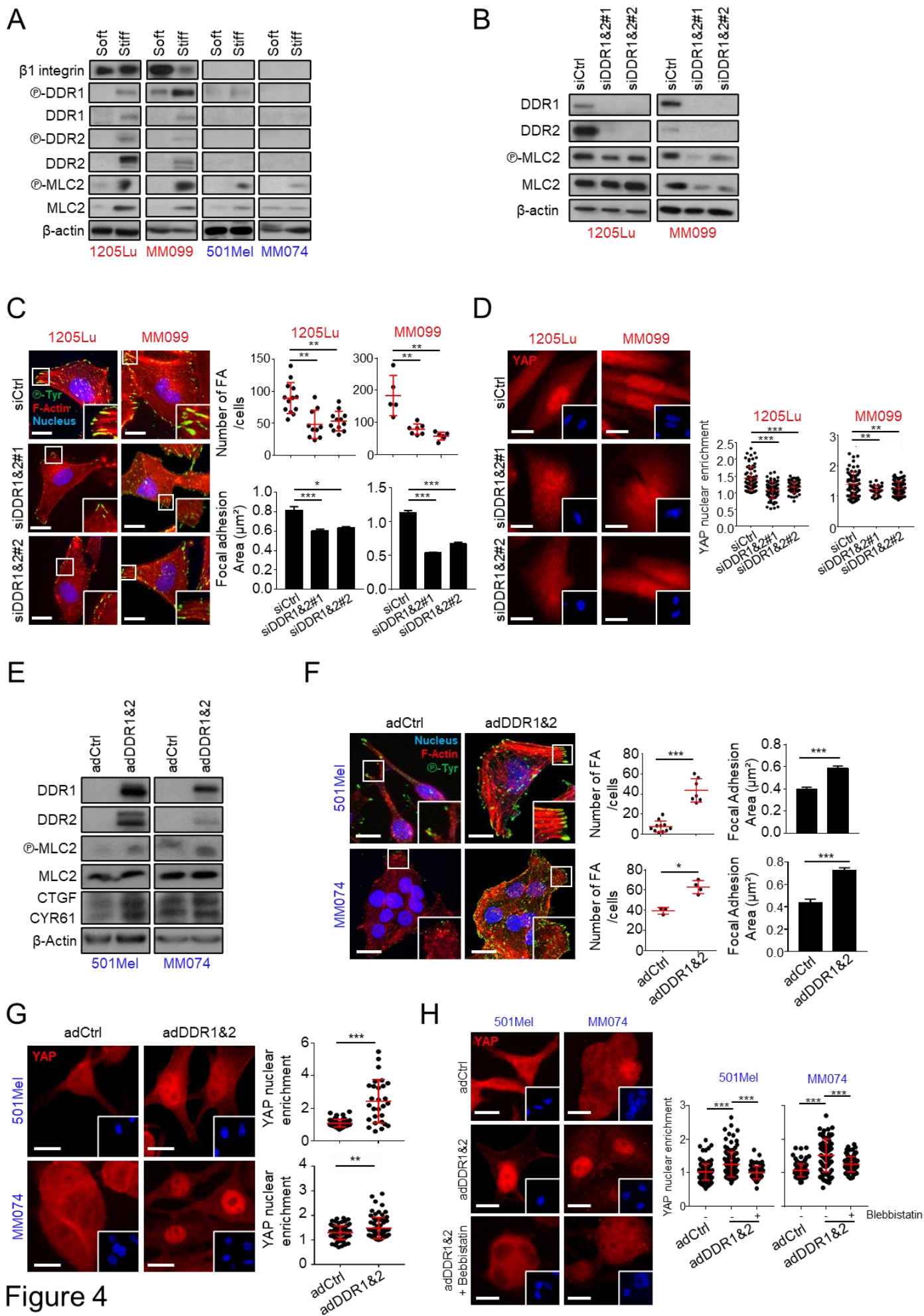


Figure 4

Figure 4 : Collagen receptors DDR1 and DDR2 mediate melanoma cells mechano-responsiveness.

(A) Immunoblot analysis of collagen receptors $\beta 1$ integrin, discoidin domain receptors DDR1 and DDR2 and their effector MLC2 on lysates from melanocytic versus Dedifferentiated melanoma cells cultured for 72h on soft or stiff collagen-coated substrate. β -Actin is used as loading control.

(B-D) 1205Lu or MM099 dedifferentiated melanoma cells seeded on stiff collagen substrate were transfected with two different sequences of siRNA targeting both DDR1 and DDR2 (siDDR1&2) or control siRNA (siCtrl) (72h, 50nM)

(B) Immunoblot analysis of DDR1, DDR2 and MLC2 on cell lysates from 1205Lu or MM099 melanoma cells 72h post transfection with indicated siRNA. β -actin is used as loading control.

(C) *Left*, Immunofluorescence analysis of focal adhesions of 1205Lu or MM099 cells described above. Focal adhesions were stained with anti-Phospho-Tyrosine antibody (green), F-Actin with Phalloidin (red) and nuclei with Hoechst (blue). Insets show higher magnification views of zones delineated by white square. Scale bar, 20 μ m. *Right-top*, Quantification of focal adhesions per cell (*top*) or focal adhesion area (*bottom*) of the indicated melanoma cell lines cultured as above. Data are representative of 3 independent experiments. *top*, each dot represents a field comprising 3-10 cells. Data are represented as scatter plot with mean \pm SD from 10 different fields. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis. *bottom*, bar graph represents the mean \pm SD (n > 150 cells) of triplicate experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(D) *Left*, Immunofluorescence analysis of YAP (red) of 1205Lu or MM099 cells described above. Insets show nuclei staining by Hoechst. Scale bar, 20 μ m. *Right*, quantification of the nucleocytoplasmic distribution of YAP (n \geq 30 cells per condition). Data represented mean \pm SD of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

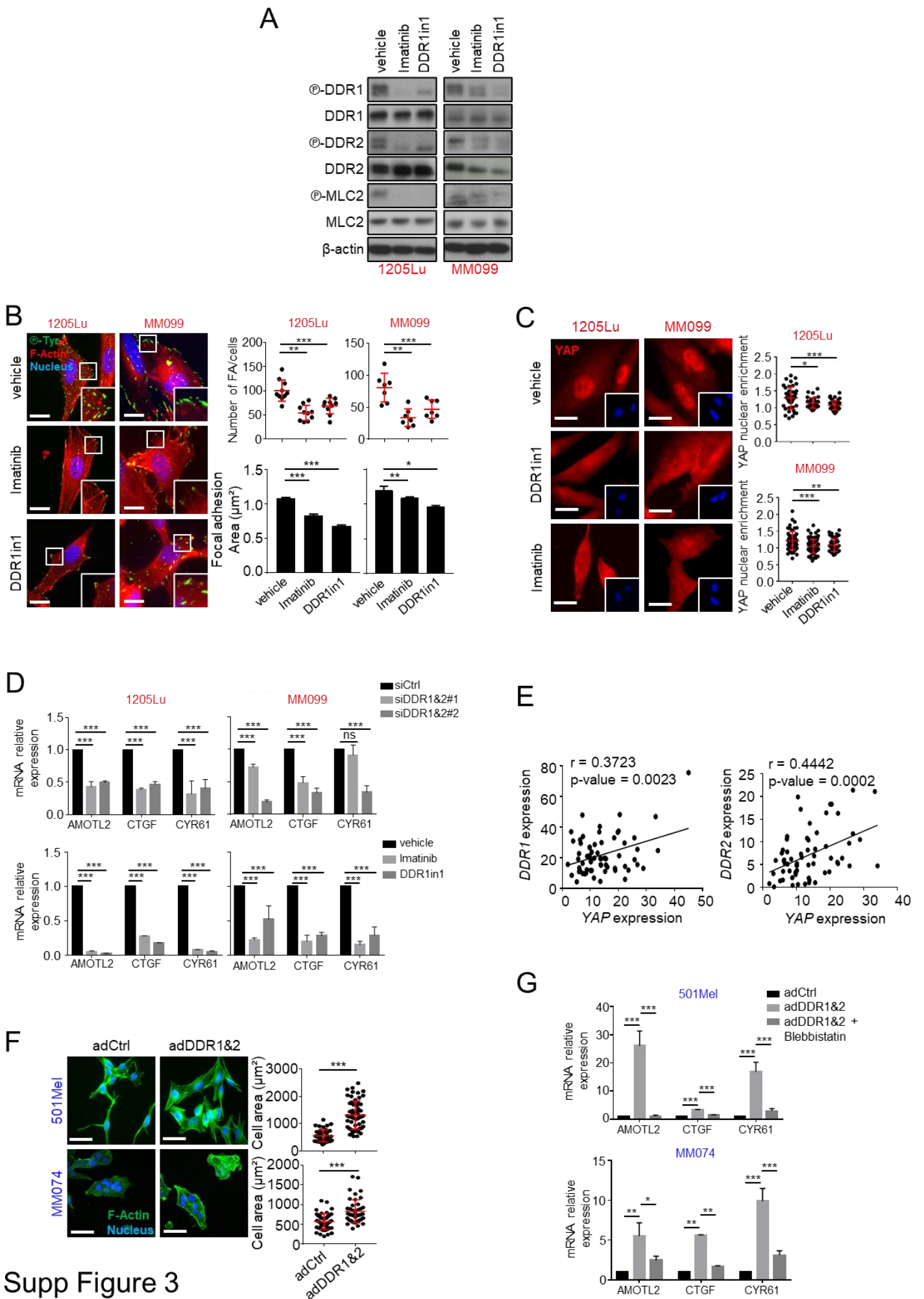
(E-G) 501Mel or MM074 melanocytic melanoma cells seeded on stiff collagen substrate were transduced with two different adenoviruses expressing DDR1 and DDR2 (adDDR1&2) or control adenovirus (adCtrl).

(E) Immunoblot analysis of DDR1, DDR2, MLC2 and YAP target genes on cell lysates from cells described above. β -Actin is used as loading control.

(F) *Left*, Immunofluorescence analysis of focal adhesions of 501Mel or MM074 cells described above. Focal adhesions were stained with anti-Phospho-Tyrosine antibody (green), F-Actin with Phalloidin (red) and nuclei with Hoechst (blue). Insets show higher magnification views of zones delineated by white square. Scale bar, 20 μ m. *Right-top*, Quantification of focal adhesions per cell (*top*) or focal adhesion area (*bottom*) of the indicated melanoma cell lines cultured as above. Data are representative of 3 independent experiments. *top*, Data are represented as scatter plot with mean \pm SD from 10 different fields. Each dot represents a field comprising 3-10 cells. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis. *bottom*, bar graph represents the mean \pm SD (n > 150 cells) of triplicate experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(G) *Left*, Immunofluorescence analysis of YAP (red) of 501Mel and MM074 described above. Insets show nuclei staining by Hoechst. Scale bar, 20 μ m. *Right*, quantification of the nucleocytoplasmic distribution of YAP (n \geq 30 cells per condition). Data represented mean \pm SD of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(H) *Left*, Representative Images of YAP staining of 501Mel and MM074 cells (seeded on high stiffness substrate) overexpressing DDR1 and DDR2 and treated for 72h with the myosin II inhibitor Blebbistatin (40 μ M). Insets represent nuclei stained with Hoechst. Scale bar, 20 μ m. *Right*, Quantification of the nucleocytoplasmic distribution of YAP (n \geq 30 cells per condition). Data represent mean \pm SD. Data are representative of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.



Supp Figure 3

Supplementary figure 3 :

(A-C) 1205Lu or MM099 Dedifferentiated melanoma cells seeded on stiff collagen substrate were treated for 72h with DDR inhibitors Imatinib (7 μ M) or DDR1in1 (1 μ M).

(A) Immunoblot analysis of activated (phosphorylated) and total forms of DDR1, DDR2 and MLC2 on cell lysates from 1205Lu or MM099 treated as above. β -Actin is used as loading control.

(B) *Left*, Immunofluorescence analysis of focal adhesions of 1205Lu or MM099 cells described above. Focal adhesions were stained with anti-Phospho-Tyrosine antibody (green), F-Actin with Phalloidin (red) and nuclei with Hoechst (blue). Insets show higher magnification views of zones delineated by white square. Scale bar, 20 μ m. *Right-top*, Quantification of focal adhesions per cell (*top*) or focal adhesion area (*bottom*) of the indicated melanoma cell lines cultured as above. Data are representative of 3 independent experiments. *top*, each dot represents a field comprising 3-10 cells. Data are represented as scatter plot with mean \pm SD from 10 different fields. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis. *bottom*, bar graph represents the mean \pm SD (n > 150 cells) of triplicate experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(C) *Left*, Immunofluorescence analysis of YAP (red) of 1205Lu or MM099 cells described above. Insets show nuclei staining by Hoechst. Scale bar, 15 μ m. *Right*, quantification of the nucleocytoplasmic distribution of YAP (n \geq 30 cells per condition). Data represented mean \pm SD of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(D) qPCR analysis of YAP target genes expression in 1205Lu or MM099 Dedifferentiated melanoma cells seeded on high stiffness substrate and either transfected with siRNA against DDR1 and DDR2 (*top*) or treated with DDR inhibitors (*bottom*) for 72h. Data are normalized to the expression in cells transfected with siCtrl or treated with vehicle, respectively. Data are represented as mean \pm SD from a technical triplicate representative of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, two-way ANOVA analysis.

(E) Spearman's correlation analysis of DDR1 and YAP (*left*) or DDR2 and YAP (*right*) mRNA expression from data of skin melanoma extracted from the TCGA.

(F) *Left*, Representative Images of 501Mel and MM074 cells cultured on stiff substrate transduced for 72h with adenoviruses expressing DDR1 and DDR2. F-Actin was stained with phalloidin (green) and nuclei with Hoechst (blue). Scale bar, 50 μ m. *Right*, quantification of cell area represented as scatter plot with mean \pm SD (n > 150 cells). Data are representative of 3 independent experiments. ***, P<0.001, Kruskal-Wallis analysis.

(G) qPCR analysis of YAP target genes expression in 501Mel and MM074 melanocytic cells transiently overexpressing DDR1 and DDR2 and treated with Blebbistatin (40 μ M) for 72h on stiff substrate. Data are normalized to the expression in cells infected with control adenovirus (adCtrl) and treated with vehicle. Data are represented as mean \pm SD from a technical triplicate representative of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, two-way ANOVA analysis.

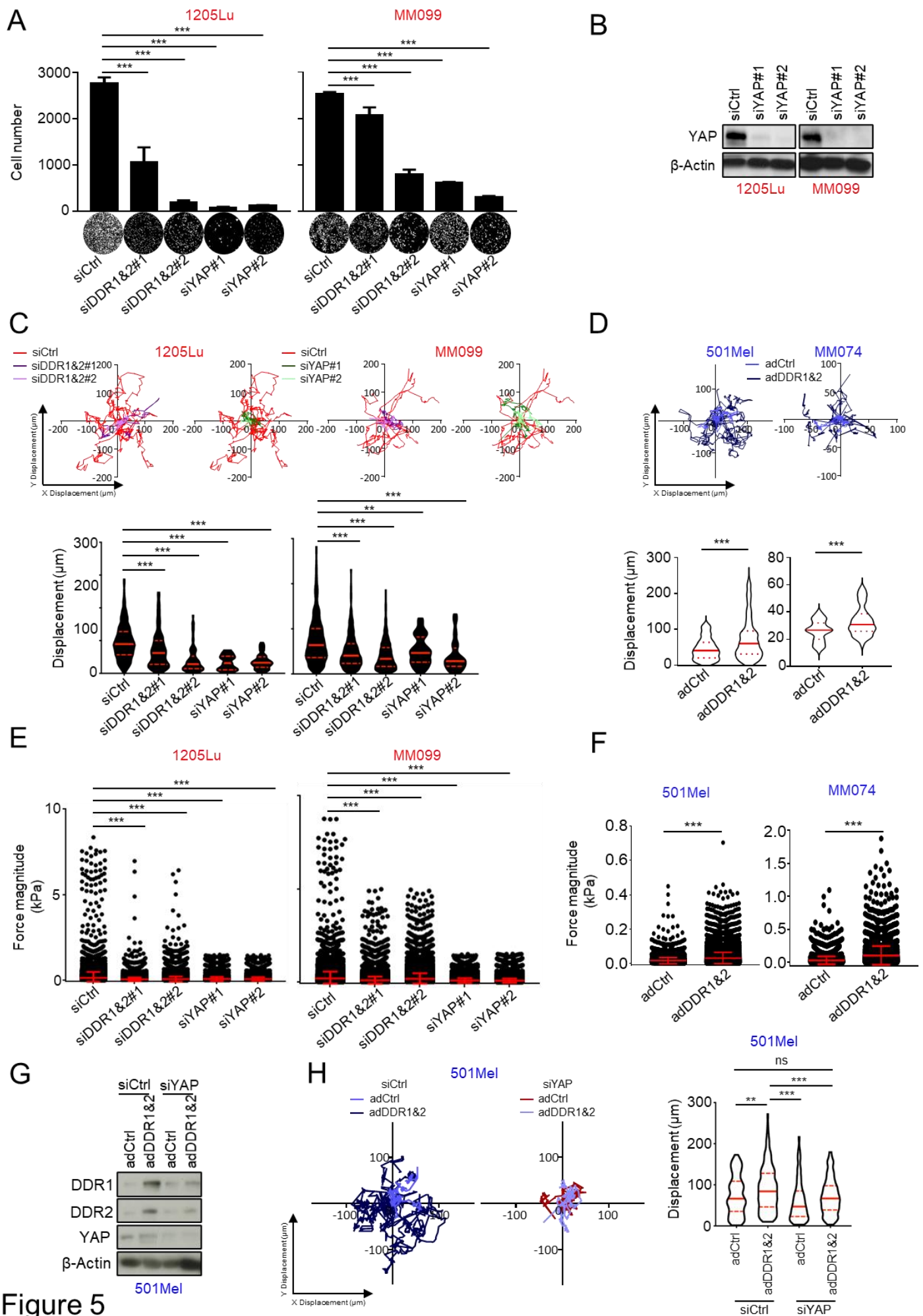


Figure 5

Figure 5 : Targeting DDR or YAP impairs rigidity induced aggressive behavior of dedifferentiated melanoma cells.

(A) Proliferation analysis of 1205Lu and MM099 melanoma cell cultured on collagen-coated stiff substrate, transfected with siRNA against both DDR1 and DDR2 (siDDR1&2) or against YAP (siYAP) for 72h. Cell nuclei were stained with Hoechst and counted using ImageJ software. Data are representative of 3 independent experiments. ***, $P < 0.001$; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(B) Immunoblot analysis of YAP on cell lysates from 1205Lu and MM099 melanoma cells 72h post-transfection with siRNA against YAP. β -Actin is used as loading control.

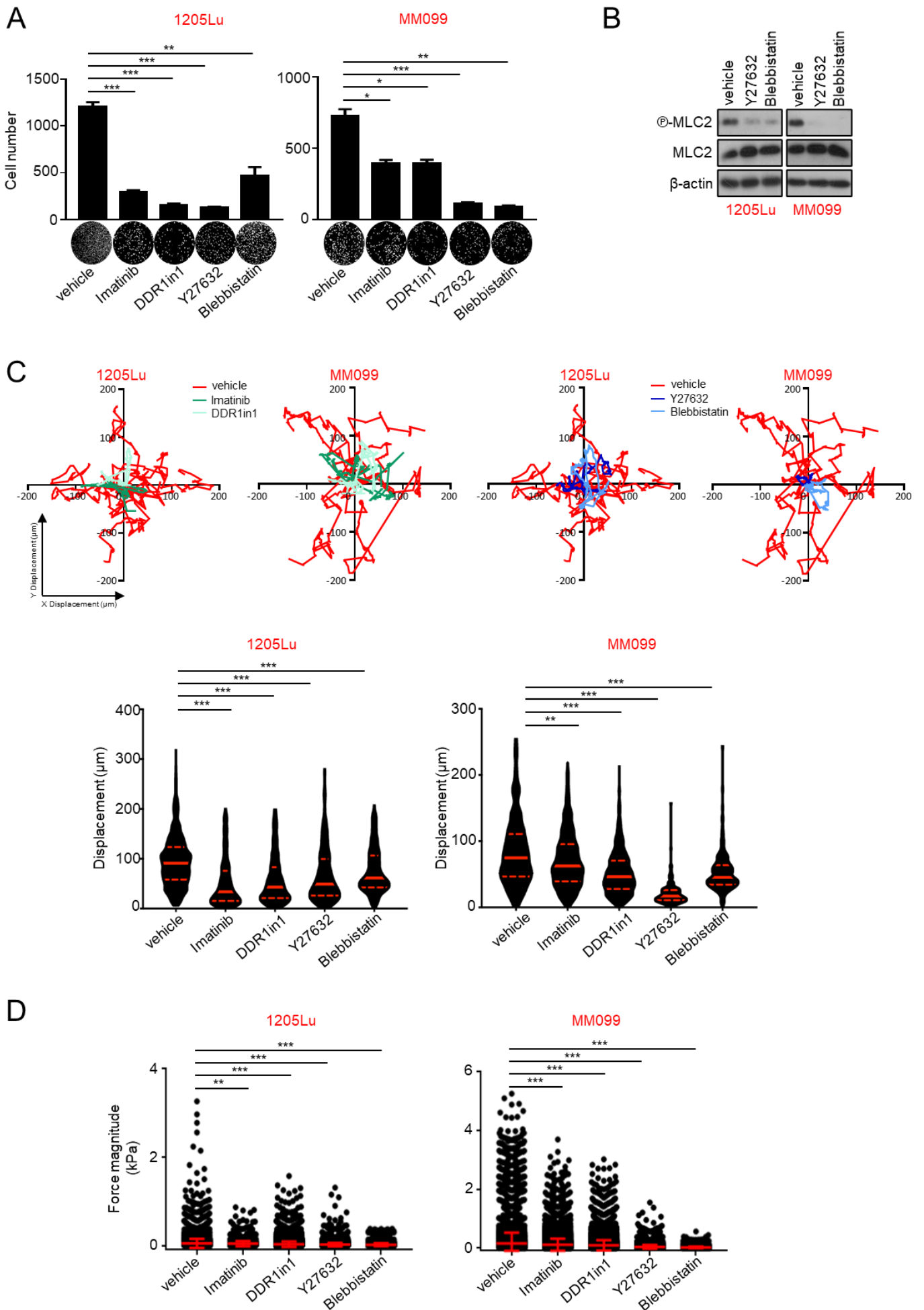
(C) *Top*, 1205Lu or MM099 cells treated as in (A) were plated on stiff collagen-coated substrates for 24h, and cell migration was recorded over 24h and automatically tracked using ImageJ. For each condition, spider plots were created and cell displacement was analysed using the ImageJ. *Bottom*, Quantification of cell displacement ($n = 200$ cells). Data represent median \pm quartiles. Data are representative of 3 independent experiments. ***, $P < 0.001$; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(D) *Top*, Cell displacement analysis of 501Mel and MM074 cells infected with adenovirus for DDR1 and DDR2 for 72h and seeded on stiff substrate for 24h. *Bottom*, Quantification of cell displacement ($n < 300$ cells). Data represent median \pm quartiles. Data are representative of 3 independent experiments. ***, $P < 0.001$; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(E,F) Quantification of contractile forces applied by 1205Lu or MM099 cells transfected with siRNA against DDR1 and DDR2 or YAP for 72h (E) or 501Mel and MM074 cells transiently overexpressing DDR1 and DDR2 for 72h (F) and seeded on 4kPa fluorescent bead-embedded collagen coated hydrogels for 24h. Data are the mean \pm SD ($n = 10$ cells/field from 5 random fields). Data are representative of 3 independent experiments. ***, $P < 0.001$; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(G) Immunoblot analysis of DDR1/2 and YAP on cell lysates from 501Mel cells transduced with DDR1 and DDR2 adenoviruses (adDDR1&2), then transfected with control (siCtrl) or YAP targeting siRNA (siYAP). β -Actin is used as loading control.

(H) *Left*, Cell displacement analysis of 501Mel treated as in (G), seeded on stiff substrate for 24h. *Right*, Quantification of cell displacement ($n < 300$ cells). Data represent median \pm quartiles. Data are representative of 3 independent experiments. ***, $P < 0.001$; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.



Supp Figure 4

Supplementary figure 4 :

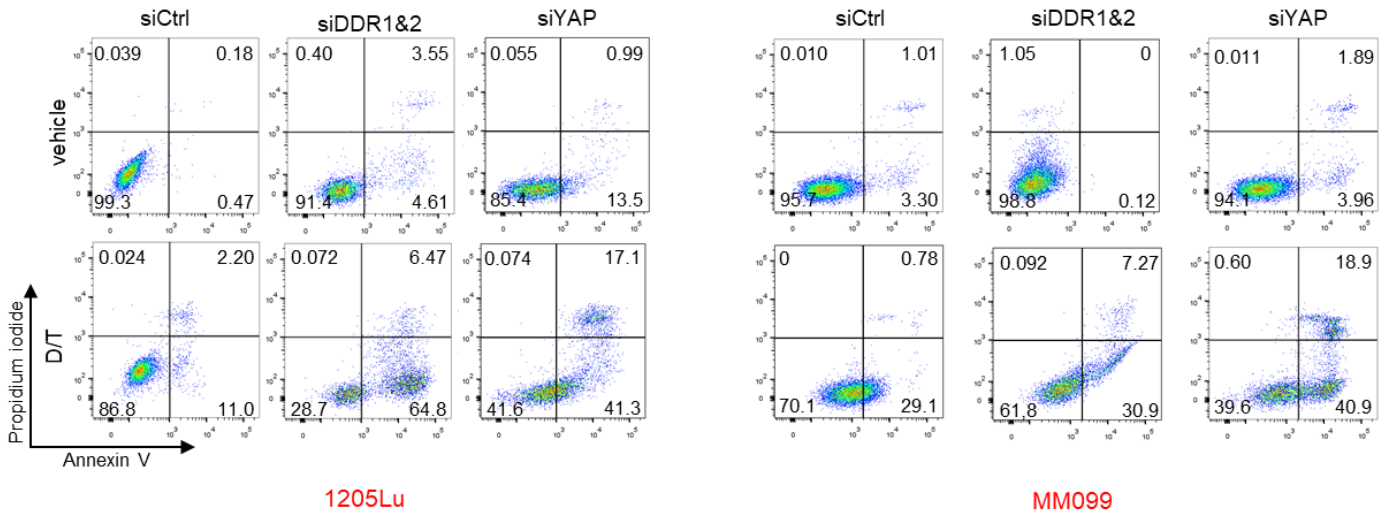
(A) Proliferation analysis of 1205Lu and MM099 melanoma cell cultured on collagen-coated stiff substrate, treated for 72h with DDR inhibitor Imatinib (7 μ M) or DDR1in1 (1 μ M), ROCK inhibitor Y27632 (40 μ M) or myosin II inhibitor Blebbistatin (40 μ M). Cell nuclei were stained with Hoechst and counted using ImageJ software. Data are representative of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(B) Immunoblot analysis of activated (*phosphorylated*) and total forms of MLC2 on cell lysates from 1205Lu and MM099 melanoma cells treated for 72h with ROCK inhibitor Y27632 (40 μ M) or myosin II inhibitor Blebbistatin (40 μ M). β -Actin is used as loading control.

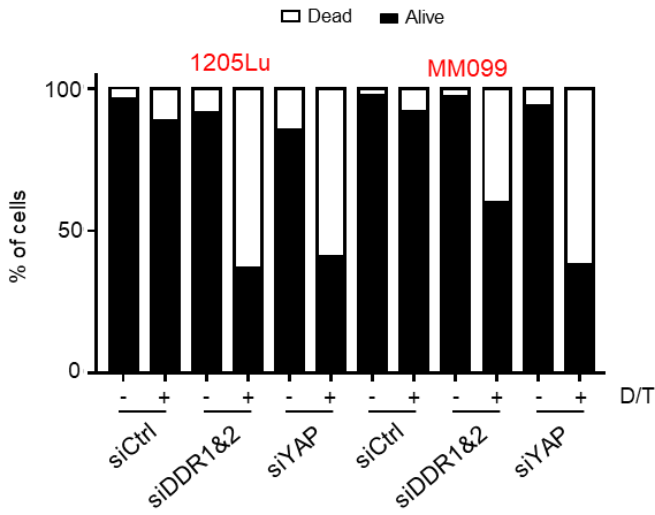
(C) *Top*, Cell displacement analysis of 1205Lu and MM099 cells treated with as in (A) and seeded on stiff substrate for 24h. *Bottom*, Quantification of cell displacement (n = 200 cells). Data represent median \pm quartiles. Data are representative of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

(D) Quantification of contractile forces applied by 1205Lu or MM099 cells treated as in (A) and seeded on 4kPa fluorescent beads-embedded collagen coated hydrogels for 24h. Data are the mean \pm SD (n = 10 cells/field from 5 random fields). Data are representative of 3 independent experiments. ***, P<0.001; ns, non-significant, Kruskal-Wallis analysis.

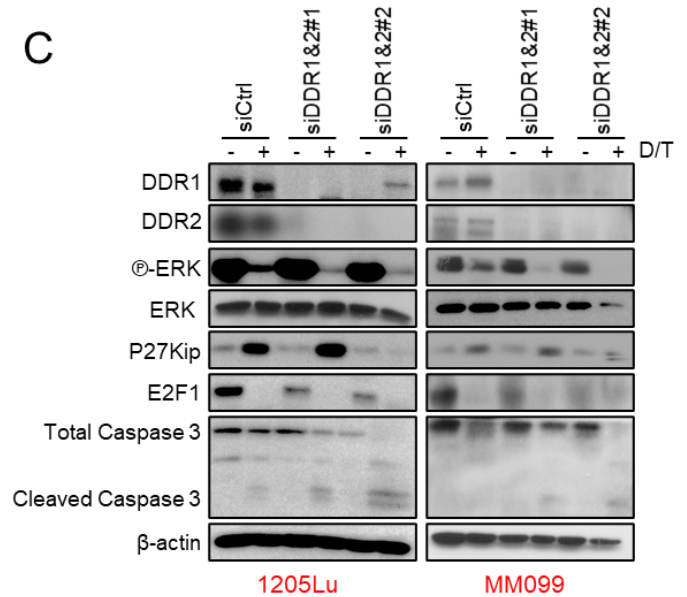
A



B



C



D

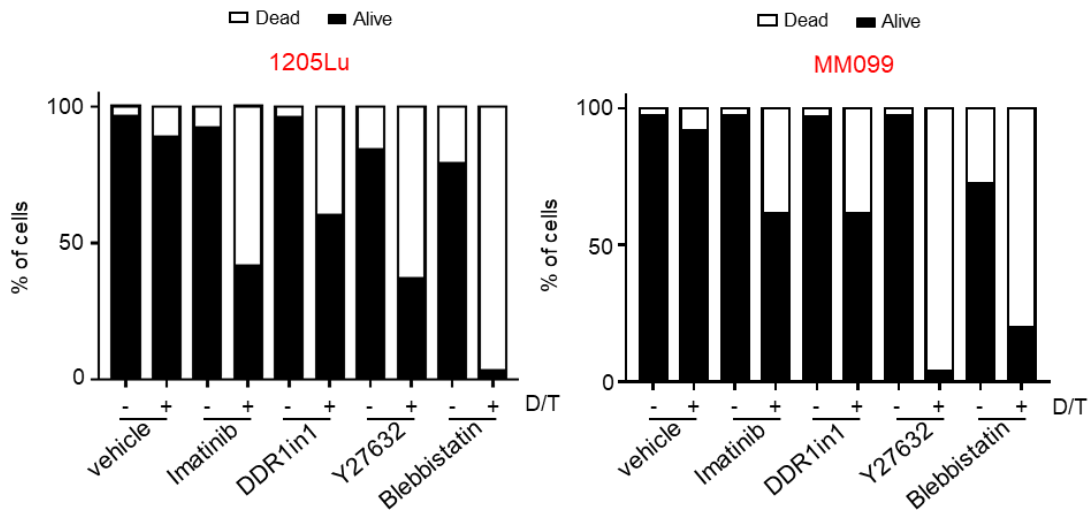


Figure 6

Figure 6 : Targeting DDR or YAP sensitizes mechano-addicted melanoma cells to oncogenic pathway inhibition.

(A) Quantification of apoptosis in 1205Lu or MM099 transfected with siRNA against DDR1 and DDR2 or against YAP then exposed for 72h to vehicle or 1 μ M of Dabrafenib and 0.1 μ M of Trametinib combotherapy (D/T) while plated on stiff substrate. The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry analysis of annexin V-FITC/PI-stained cells.

(B) Bar graph showing the percentage of dead (*white square*) and live (*black square*) cells from **(A)**. Data are representative of 3 independent experiments. Data represent mean \pm SD.

(C) Immunoblot analysis of cell cycle and apoptotic markers on lysates from melanoma cell lines 1205Lu and MM099 obtained from **(A)**. β -Actin is used as loading control.

(D) Bar graph showing the percentage of dead (*white square*) and live (*black square*) cells from 1205Lu and MM099 cells treated with DDR inhibitors (Imatinib and DDR1in1) or with ROCK/Myosin II inhibitors (Y27632 and Blebbistatin) in combination with 1 μ M of Dabrafenib and 0.1 μ M of Trametinib (D/T) for 72h while plated on stiff substrate. Data are representative of 3 independent experiments. Data represent mean \pm SD.

DISCUSSION

Le mélanome est le cancer cutané le plus agressif à cause de sa capacité à s'adapter aux stress de son environnement comme les paramètres physico-chimiques ou les traitements ciblés. Ainsi, des mécanismes de résistance se mettent en place pour échapper aux thérapies ciblées. Il est donc essentiel de comprendre ces différents mécanismes de résistance pour cibler efficacement le mélanome. La tumeur est un environnement complexe dans lequel les cellules tumorales interagissent avec des cellules stromales telles que les fibroblastes ou les cellules immunitaires pour favoriser leur progression et leur résistance thérapeutique. Ce microenvironnement tumoral est formé également par des constituants non cellulaires tels que les facteurs solubles ou les protéines matricielles qui peuvent influencer la progression tumorale en agissant directement sur les cellules tumorales, via des récepteurs de surface, ou, dans le cas des protéines matricielles, en s'organisant pour former un stroma rigide. Dans le mélanome, ce phénomène a également lieu mais il est peu décrit. C'est pour cela qu'au cours de ma thèse, je me suis intéressée au rôle des signaux mécaniques provenant de la matrice extracellulaire (MEC) et des voies de la mécanotransduction dans la progression, la plasticité et la résistance thérapeutique, à travers deux études.

I. Les cellules de phénotype dédifférencié sont les plus sensibles aux changements de rigidité du microenvironnement tumoral

A l'aide de deux modèles cellulaires différents de mélanome, j'ai montré que des cellules résistantes aux thérapies ciblées, par un mécanisme non génétique, et des cellules naïves aux traitements qui présentent une signature transcriptionnelle peu différenciée sont plus sensibles aux changements de rigidité du substrat. A l'inverse, des cellules résistantes par un mécanisme génétique ou naïves au traitement avec un phénotype mélanocytaire sont très peu sensibles aux changements de rigidité. De façon intéressante, cette mécano-sensibilité est indépendante de leur statut mutationnel, seulement dépendante de leur signature phénotype et de leur état de différenciation.

Cette capacité des cellules dédifférenciées à mieux intégrer les signaux mécaniques s'explique par une augmentation du nombre et de la maturation des adhésions focales ainsi que par l'activation des co-facteurs transcriptionnels MRTF-A et YAP. Ces cellules présentent également une augmentation de l'expression et de l'activation des intégrines et des DDR. En plus de sa régulation par la voie Hippo, il est maintenant bien décrit que l'activité de YAP est régulée par la rigidité matricielle et, qu'en retour, il régule la sensibilité des cellules aux changements de rigidité (Dupont et al., 2011). Dans le cancer du sein, les cellules possédant une activité de YAP présentent une résistance à la doxorubicine de façon dépendante de la rigidité matricielle tandis que les cellules ne possédant pas d'activité de YAP n'ont pas cette résistance (Joyce et al., 2018). L'activité de YAP dans les cellules de mélanome dédifférenciées expliquerait donc leur phénotype mécanosensible et

mécanotransducteur. De plus, une étude récente a montré que le facteur de transcription mélanocytaire MITF, marqueur des cellules de phénotype différencié, réprime la formation d'adhésions focales dans les cellules de mélanome (Dilshat et al., 2021). Cela est en accord ainsi nos résultats montrant que les cellules dédifférenciées, exprimant de très faibles niveaux de MITF, forment plus d'adhésions focales et sont donc plus mécanosensibles. Nos résultats montrent une faible mécanosensibilité associée à une faible translocation nucléaire de YAP dans les cellules différenciées. Cela est contradictoire par rapport aux travaux de l'équipe du Dr Wellbrock qui montrent que les 501Mel sont plus étalés et une translocation nucléaire de YAP plus importante (Miskolczi et al., 2018). Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'ils utilisent un anticorps reconnaissant YAP et TAZ, signifiant que TAZ pourrait être impliqué dans la mécanosensibilité des cellules différenciées.

Nous montrons que YAP et MRTF-A régulent le phénotype myofibroblastique des cellules présentant une résistance acquises aux thérapies ciblées, ce qui est en accord avec des travaux réalisés par d'autres équipes dans les CAF (Calvo et al., 2013; Foster et al., 2017). De plus, un traitement court avec les inhibiteurs de BRAF induit une réorganisation du cytosquelette d'actine associée à une activation de YAP et MRTF-A. Cela diffère d'un phénotype d'adaptation aux inhibiteurs de BRAF précédemment décrit, caractérisé par l'émergence d'une population de cellules persistantes NGFR^{HIGH} (Rambow et al., 2018 ; Titz et al., 2016). Mais ces résultats sont tout de même en accord avec des études précédentes montrant que les inhibiteurs de BRAF modulent l'organisation du cytosquelette d'actine (Klein et al., 2008) et l'activation de YAP (Fisher et al., 2017 ; Kim et al., 2016b) ou de MRTF (Misek et al., 2020). Cependant, ces études ont été réalisées sur support plastique et ne reflètent donc pas les propriétés mécaniques des tumeurs. Nos modèles expérimentaux ont ainsi l'avantage d'investiguer l'importance de la mécanotransduction et des changements de rigidité dans la progression et la résistance du mélanome.

De façon intéressante, nous avons montré, dans le premier article (Girard et al., 2020 ; Lecacheur et al., 2020)(Article 1) que les cellules de mélanome résistantes ou en réponse précoce aux inhibiteurs de la voie BRAF produisent et assemblent une MEC constituée de fibres alignées de collagènes, et de fibronectine, ainsi que de protéines matricielles comme la thrombospondine, constituant ainsi un environnement profibrotique. Nous avons montré que des cellules de mélanomes naïves ensemencées sur des MEC générées par des cellules de mélanome résistantes ou traitées aux inhibiteurs de BRAF présentent une activation des voies de la mécanotransduction, YAP et MRTF-A et sont protégées des effets cytostatiques des thérapies ciblées. Ces résultats suggèrent que la MEC produite par les cellules de mélanomes possède des propriétés biophysiques permettant l'activation des mécanotransducteurs YAP et MRTF-A. Des travaux récents de notre équipe ont montré que des matrices produites par des CAF de différentes origines (métastases cutanées ou ganglionnaires) sont également capables de protéger les cellules des thérapies ciblées (Berestjuk et al., 2019) (*Annexe II*). La MEC produite par les cellules de mélanome ou les CAF participe à la phase de tolérance aux thérapies ciblées qui a lieu avant l'apparition de la résistance génétique, comme cela a été montré dans l'étude du Dr Smith (Smith and Wellbrock, 2016). Nous avons également démontré que ce remodelage matriciel associé

à une rigidification tumorale, se met en place, *in vivo* dans des modèles de xénogreffe de cellules de mélanome et de PDX, en réponse aux thérapies ciblées. Ces résultats sont en accord avec l'étude de l'équipe du Dr Junntila, dans un modèle murin génétique de mélanome muté BRAF^{V600E} et délété pour PTEN (Long et al., 2019). La contribution des CAF dans ce remodelage matriciel n'a pas été exclue, car de nombreuses études ont déjà mis en évidence leur implication dans le développement de niches de résistance (Hirata et al., 2015; Kaur et al., 2016; Straussman et al., 2012). Nos résultats montrent que le remodelage de la matricielle niche tumorale en réponse aux inhibiteurs de BRAF est aussi le fait des cellules de mélanome, elles-mêmes, promouvant ainsi la production autocrine d'une MEC riche en fibre de collagène et rigide.

Comme la rigidité des tissus est définie par une augmentation du dépôt et de la réticulation du collagène, nous nous sommes intéressés aux rôles des récepteurs au collagène à domaine discoïdine DDR1 et DDR2 dans la mécanotransduction et les propriétés agressives des cellules de mélanomes. DDR1 a été décrit récemment comme pouvant être activé par les signaux mécaniques dans le contexte d'athérosclérose (Ngai et al., 2020). DDR2 contrôle la mécanotransduction dans les CAF par la régulation des intégrines (Bayer et al., 2019). Dans notre étude, à la fois DDR1 et DDR2 sont plus exprimés et activés par la rigidification du substrat dans les cellules différenciées. Cette observation confirme une étude récente du laboratoire montrant que les cellules résistantes présentent une augmentation de l'expression de DDR1 et DDR2. Cette étude montre également que les DDR contrôlent la résistance conférée par la MEC par la voie NFκB non canonique (Berestjuk et al., 2019) (*Annexe II*). De plus, une étude de l'équipe du Dr Saltel suggère le rôle de DDR2 dans la résistance acquise des cellules de mélanome aux inhibiteurs de BRAF. Ils montrent également que DDR2 est impliqué dans le remodelage du cytosquelette d'actine, suggérant un rôle de DDR2 dans la mécanosensibilité, dans leur modèle (Sala et al., 2021).

Nous avons montré, à l'aide d'approches gain et perte de fonction, que DDR1 et DDR2 sont des récepteurs de la signalisation mécanique des cellules de mélanome. Ils régulent la mécanotransduction en modulant la contractilité du cytosquelette d'actomyosine, la voie des adhésions focales et l'activité de YAP. DDR1 et DDR2 ont été décrits comme ayant des fonctions redondantes dans le cancer et plus récemment ils ont été impliqués dans la transmission de signaux biomécaniques. Dans notre modèle, il est nécessaire de cibler les deux récepteurs DDR pour obtenir un effet sur la mécanotransduction des cellules de mélanome. Cela est en accord avec les résultats que nous avons publiés précédemment montrant qu'à la fois DDR1 et DDR2 sont impliqués dans la résistance des cellules de mélanome conférée par la MEC (Berestjuk et al., 2019). DDR1 peut se lier à la myosine IIA non musculaire pour induire le remodelage du collagène dans les fibroblastes (Coelho et al., 2017). Le lien entre DDR2 et YAP/TAZ a été précédemment établi dans le cancer du sein (Lin et al., 2021). Dans notre cas, ce sont à la fois DDR1 et DDR2 qui contrôlent YAP. En revanche, le ciblage n'a pas d'effet sur TAZ dans notre modèle. Il serait intéressant d'analyser l'effet du ciblage des DDR sur le co-facteur mécanotransducteur MRTF.

Les inhibiteurs de la voie oncogénique BRAF promeuvent la mécanotransduction des cellules et cela s'accompagne de l'augmentation de l'expression du cluster de miR-143/miR-145 (Diazzi et al., 2021)(*Annexe III*). Cette étude montre également que ce cluster de miARN régule la formation d'adhésions focales, la réorganisation du cytosquelette et la translocation nucléaire de YAP et MRTF-A, par son activation de répression de la Fscn1, une protéine liée à l'actine. Il serait intéressant d'étudier si les signaux mécaniques régulent l'expression de ce cluster de miARN.

Notre travail décrypte pour la première fois la voie de mécanotransduction mise en place en réponse aux signaux rigides de la MEC, partant des récepteurs DDR à la surface des cellules de mélanome jusqu'à YAP dans le noyau en passant par le cytosquelette d'actomyosine. Au niveau fonctionnel, cette signalisation contribue aux propriétés agressives dépendantes des cellules de mélanome dédifférenciées au sein d'un environnement matriciel rigide.

II. La rigidification du stroma tumoral rend les cellules de mélanome de phénotype dédifférencié plus agressives

Nous avons ensuite montré dans les articles I et II que les cellules présentant un phénotype dédifférencié présentent une augmentation de leur agressivité, induit par la rigidité matricielle. En effet, la rigidité du substrat augmente la prolifération, la migration/invasion et la résistance thérapeutique de ces cellules.

La prolifération cellulaire peut être induite par un substrat rigide avec une accélération du cycle cellulaire dans le cancer du sein ou le glioblastome (Bae et al., 2014; Provenzano et al., 2008; Provenzano and Keely, 2011). En accord avec ces différentes publications, nos résultats montrent que l'augmentation de la prolifération des cellules de mélanome induite par la rigidité matricielle est également associée à une modification du cycle cellulaire avec une augmentation de l'expression des protéines régulant l'entrée dans le cycle ou l'arrêt en G0/G1.

Dans le mélanome, une étude récente a montré que la prolifération cellulaire est également améliorée sur substrat de collagène rigide via la régulation du facteur de transcription mélanocytaire MITF par le co-facteur de transcription YAP (Miskolczi et al., 2018). Nos résultats montrent que la prolifération est augmentée à la fois dans les cellules différenciées ou dédifférenciées. En revanche, l'expression de MITF est augmentée seulement dans les cellules déjà différenciées lorsqu'elles sont cultivées sur collagène rigide, confirmant les observations de l'équipe du Dr Wellbrock. L'expression de SOX10, un autre facteur de transcription mélanocytaire est également fortement induite dans nos conditions de culture rigide. En revanche, il n'y a pas d'augmentation des niveaux d'expression de MITF ou SOX10 dans les cellules dédifférenciées. Nos résultats montrent que la rigidité matricielle à elle seule n'est pas suffisante pour induire le switch phénotypique dans les cellules de mélanome contrairement aux signaux biochimiques comme le TNF α , le TGF β ou l'hypoxie. La rigidité matricielle ne fait que renforcer le phénotype préexistant des cellules de mélanome. Cela suggère

qu'il lui manque des signaux biochimiques pour induire le switch phénotypique et que la combinaison substrat rigide et facteurs biochimiques est sûrement nécessaire pour engager les cellules vers un état différencié ou dédifférencié.

La régulation de la prolifération mécano-induite des cellules de mélanome se fait par le mécanotransducteur YAP. Mais ce dernier régule des voies de signalisation différentes selon l'état phénotypique des cellules, en se liant soit au facteur transcriptionnel PAX3 pour induire l'expression de MITF dans les cellules différenciées, soit à TEAD dans les cellules dédifférenciées (Miskolczi et al., 2018; Verfaillie et al., 2015). Il serait intéressant de vérifier si c'est le cas dans notre modèle.

L'acquisition d'un phénotype motile et des capacités invasives sont requises dans le processus métastatique. De nombreuses études ont montré que la rigidité du substrat permet l'invasion et la formation de métastases par différents mécanismes. Cela peut se faire par l'augmentation des activités métalloprotéases (MMP) qui mène à la dégradation de la matrice et à l'invasion (Haage and Schneider, 2014). La rigidité peut également induire la formation d'invadopodes et l'assemblage des adhésions focales (Parekh et al., 2011). En augmentant l'efficacité du TGF β pour promouvoir l'EMT (Leight et al., 2012), la rigidité matricielle peut conduire à l'invasion et la formation de métastases (Wei et al., 2015b). La rigidité matricielle peut également augmenter l'invasion des cellules par la formation de filopodes et la contraction du cytosquelette d'actomyosine (Grasset et al., 2018) (Annexe I). Ici, nous montrons que les cellules dédifférenciées augmentent leur motilité sur un substrat rigide, par l'augmentation des forces de traction localement appliquées au substrat associée à une augmentation de la phosphorylation de MLC2. Il serait intéressant d'analyser l'activité des MMP selon la rigidité du substrat dans les cellules de mélanome dédifférenciées.

Une étude a montré, dans un modèle cellulaire murin de mélanome, que la rigidité matricielle favorise à la fois la prolifération et la formation de métastase dans les cellules primaires faiblement métastatiques. A l'inverse, les cellules métastatiques sont peu sensibles aux changements de rigidité (Li et al., 2019b). Leurs résultats semblent donc concordés partiellement avec nos résultats. En effet, nos résultats montrent que les cellules métastatiques différenciées sont peu sensibles aux changements de rigidité matricielle tandis que les cellules métastatiques dédifférenciées sont plus sensibles à ces modifications. Les résultats de cette étude pourraient s'expliquer par le fait qu'ils utilisent des cellules métastatiques B16 F10, caractérisées l'expression de MITF, donc un phénotype différencié (Kim et al., 2008). Les cellules primaires B16 F0 qu'ils utilisent expriment également de MITF et sont pigmentées mais elles semblent mécanosensibles dans leur système. Cela pourrait suggérer que les cellules primaires pourraient être plus mécanosensibles que les cellules métastatiques. Il serait intéressant de tester cette hypothèse sur des lignées cellulaires humaines primaires de mélanome.

De plus, la rigidité du substrat augmente également le nombre d'adhésion focale dans les cellules de type mésenchymateux. L'ensemencement des cellules sur un substrat rigide à plus long terme augmente leur capacité d'invasion, de pair avec une augmentation de l'expression du récepteur AXL et du facteur de transcription ZEB1.

Ces protéines ont été décrites comme étant impliquées dans l'invasion et la formation de métastases dans les cancers du sein, du pancréas ou des poumons, et comme marqueurs de l'EMT (Burk et al., 2008 ; Gjerdrum et al., 2010)}.

Ensemble, ces résultats montrent que la rigidité matricielle augmente l'agressivité des cellules de mélanome de type dédifférencié. A l'origine, la plasticité phénotypique était décrite comme une transition d'un état « prolifératif » vers un état « invasif » (Hoek et al., 2006), impliquant une exclusion mutuelle de ces propriétés phénotypiques dans les cellules de mélanome. Pourtant dans la seconde étude, nous montrons que la rigidité du substrat augmente à la fois la prolifération et la migration des cellules dédifférenciées, sans pour autant qu'elles reviennent vers un phénotype différencié mélanocytaire. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes dans un modèle de sphéroïdes 3D de mélanome (Haass et al., 2014) ou un modèle murin de mélanome spontané (Tuncer et al., 2019) qui montrent l'existence d'une population de mélanome à la fois très proliférative et très invasive. De plus des études montrent qu'il existe une coopération entre les cellules différenciées et les cellules dédifférenciées, pour promouvoir la formation de métastases (Campbell et al., 2021; Chapman et al., 2014; Rowling et al., 2020). De façon intéressante, cette migration coopérative n'est pas accompagnée d'un switch phénotypique et les cellules gardent leur phénotype préexistant. Cela est en accord avec ce que l'on observe dans notre modèle dans lequel la rigidité matricielle accentue les phénotypes préexistants et peut promouvoir les propriétés prolifératives et migratoires des cellules de mélanome dédifférenciées indépendamment du switch phénotypique.

La résistance aux chimiothérapies peut être induite par la rigidité du substrat dans le cancer du sein, du pancréas ou les carcinomes épidermoïdes (Hui et al., 2017; Joyce et al., 2018; Rice et al., 2017). La première étude que j'ai présentée montre que la rigidité du collagène induit la résistance dans les cellules de mélanome en réponse aux thérapies ciblées. De plus, nous avons également montré que les cellules résistantes ou en réponse aux traitements, produisent une matrice rigide qui favorise la résistance thérapeutique des cellules de mélanome (Girard et al., 2020 ; Lecacheur et al., 2020)(Article 1). L'inhibiteur de BRAF, Vémurafénib, a été montré comme activant les CAF pour qu'ils génèrent une niche favorisant la tolérance aux traitements par l'activation de la voie fibronectine/intégrine $\beta 1$ /FAK (Hirata et al., 2015). Notre première étude a montré que la résistance aux inhibiteurs de BRAF est améliorée lorsque les cellules sont ensemencées sur des matrices de collagène rigides, suggérant qu'en plus de la fibronectine (Fedorenko et al., 2016; Hirata et al., 2015), le réseau de collagène et la rigidité matricielle sont des acteurs importants de la résistance thérapeutique du mélanome. Des études précédentes ont également montré que la résistance des cellules de mélanome ou de carcinome suit la rigidité du substrat (Nguyen et al., 2014; Tokuda et al., 2014). Dans la seconde étude, nous avons montré que les cellules de phénotype dédifférenciées sont plus résistantes aux thérapies ciblées sur un support rigide que sur un support mou. Pour les cellules différenciées MITF^{HIGH}/AXL^{LOW}, qui sont connues pour être plus sensibles aux thérapies ciblées (Muller et al., 2014), le changement de rigidité du substrat ne modifie pas leur réponse aux thérapies ciblées. Ce qui est en accord avec la très faible activation des voies de mécanotransduction que nous avons observée dans ces cellules. En revanche, les

cellules dédifférenciées présentent une addiction aux signaux mécaniques, étant donné qu'une mort apoptotique est induite en présence des thérapies ciblées sur un support souple. Cet effet cyto-toxique des thérapies ciblées sur un substrat souple peut s'expliquer par une diminution de l'efficacité de la réparation de l'ADN, comme cela a été montré récemment en réponse à des agents génotoxiques (Deng et al., 2020). Des travaux récents de l'équipe de Dr Marine montrent que, dans le mélanome, les thérapies ciblées induisent l'apparition d'une sous-population tolérante, qu'ils ont nommé « Neural Crest Stem Cell Like » (NCSCCL) car elle présente des marqueurs de cellules souches de la crête neurale (Rambow et al., 2018). Cette même équipe a montré que les cellules NCSCCL présentent une résistance non-génétique et réactivent une voie de survie alternative à la voie des MAPK ERK, la voie AKT via la kinase FAK. Le ciblage de la kinase FAK dans leur modèle de PDX ralentit l'apparition de résistance et empêche l'émergence de résistance non-génétique. Ces résultats suggèrent l'importance d'une des voies de la mécanostransduction dans la résistance non-génétique aux thérapies ciblées.

L'addiction aux signaux mécaniques des cellules de phénotype dédifférencié, menant à l'augmentation de la sensibilité des cellules lorsqu'elles sont soumises aux thérapies ciblées sur un substrat souple, soulève l'importance du ciblage de la rigidité du tissu tumoral pour contrer la résistance et les rechutes du mélanome.

III. Les voies de la mécanostransduction contrôlent l'agressivité des cellules de mélanome de phénotype dédifférencié

Enfin, ces deux études nous ont permis de montrer que les voies de la mécanostransduction sont impliquées dans différentes caractéristiques tumorales du mélanome menant à son agressivité, telles que la prolifération, la migration/invasion et la résistance thérapeutique.

Pour montrer l'implication fonctionnelle des DDR dans la prolifération, la migration et la résistance thérapeutiques induites par les signaux mécaniques dans les cellules dédifférenciées, nous avons comparé l'effet de son ciblage à celui, déjà bien connu, des voies actomyosine et YAP.

Des études précédentes ont impliqué les récepteurs DDR dans les propriétés prolifératives et invasives des cellules de mélanome. Le rôle de DDR1 dans la prolifération, la migration et la survie des cellules de mélanome a été publié récemment (Reger de Moura et al., 2019), de même que le rôle de DDR2 dans la migration et l'invasion des cellules de mélanome (Poudel et al., 2015). Une étude du laboratoire a démontré le rôle clé des DDR dans la résistance thérapeutique du mélanome induite par la MEC (Berestjuk et al., 2019) (Annexe II). Nos résultats confirment une partie des résultats précédemment publiés mais mettent en lumière l'importance de la coopération fonctionnelle entre DDR1 et DDR2 dans la prolifération, la migration et la résistance thérapeutique dépendantes de la rigidité matricielle dans les cellules dédifférenciées.

La voie actomyosine est impliquée dans la prolifération et la migration via la voie ERK dans le cancer du sein (Zhou et al., 2008). La myosine II est également impliquée dans la migration et l'étalement cellulaire dans le cancer du sein (Betapudi et al., 2006). Tandis que dans le mélanome, la myosine II est associée à la résistance aux thérapies ciblées et aux immunothérapies (Orgaz et al., 2020). Dans notre modèle, en réponse aux signaux mécaniques, la voie actomyosine, en activant YAP, joue un rôle dans la prolifération, la migration et également dans la résistance thérapeutique des cellules de mélanome dédifférenciées.

Le cofacteur transcriptionnel YAP contribue à la prolifération, la migration et la résistance aux traitements dans de nombreux cancers dont le mélanome (Lin et al., 2015b; Miskolczi et al., 2018 ; Zhang et al., 2020). Notre première étude a démontré le rôle de YAP dans la résistance non-génétique acquise aux thérapies ciblées (Girard et al., 2020 ; Lecacheur et al., 2020)(*Article 1*). Dans la seconde étude, nous avons révélé l'importance de YAP dans la prolifération, la migration et la résistance thérapeutique mécano-induite dans les cellules de mélanome dédifférenciées. YAP est également impliqué dans la prolifération mécano-induite des cellules différenciées mais son effet est moins important que dans les cellules dédifférenciées. Etant donné qu'une récente étude a déjà montré le rôle de YAP dans la différenciation et la prolifération dépendante de la rigidité matricielle dans les cellules différenciées (Miskolczi et al., 2018), nous avons décidé d'étudier plus en détail la voie de signalisation liée à YAP régulant les propriétés agressives des cellules de mélanome dédifférenciées.

En accord avec le rôle de la signature YAP dans la rechute des mélanomes (Hugo et al., 2015), l'hétérogénéité phénotypique (Verfaillie et al., 2015) ou la résistance thérapeutique que nous avons montré *in vitro*, nous avons confirmé nos résultats *in vivo* en traitant les tumeurs avec un inhibiteur de YAP, la Vertéporfine. L'inhibition de YAP-TEAD par la Vertéporfine empêche le remodelage du collagène induit par les thérapies ciblées. Le traitement avec la Vertéporfine coopère avec le Vémurafénib pour réduire la croissance des xénogreffes de mélanome. De la même façon, nous avons montré, dans l'étude du Dr Berestjuk (Berestjuk et al., 2019) (Annexe II), que le ciblage, *in vivo*, des DDR avec de l'Imatinib en combinaison avec le Vémurafénib améliore l'efficacité du traitement en ralentissant les rechutes et en empêchant le remodelage du collagène induit par l'inhibiteur de BRAF.

L'ensemble de ces résultats montre que les signaux mécaniques du microenvironnement tumoral pourraient participer activement à l'hétérogénéité intra-tumorale qui est la signature des tumeurs les plus agressives, en renforçant les phénotypes tumoraux préexistant. Nous proposons que le ciblage des voies de la mécanotransduction représente une approche prometteuse pour améliorer les traitements ciblant la voie oncogénique BRAF et lutter contre l'échappement thérapeutiques des mélanomes.

CONCLUSION

Une tumeur est caractérisée par un remodelage matriciel menant à la rigidification du tissu tumoral comparé aux tissus sains adjacents. Plus particulièrement, cette rigidification tissulaire est présente dans des lésions précancéreuses, comme les naevi, et dans le mélanome. Le mélanome est le plus agressif et le plus mortel des cancers cutanés. Son agressivité est due à la coexistence de plusieurs sous-populations de cellules cancéreuses, sa grande plasticité et sa résistance thérapeutique. Malgré l'avancée spectaculaire des traitements disponibles pour les formes avancées et métastatiques, aucun n'est complètement efficace et plus de 50% des patients sont toujours en échec thérapeutique. Il est donc essentiel d'identifier de nouveaux mécanismes permettant de cibler plus efficacement ce cancer. L'objectif de ma thèse était d'étudier le rôle de la mécanotransduction et des signaux biomécaniques du microenvironnement dans la résistance, la plasticité et la progression du mélanome.

Dans un premier temps, j'ai montré que les cellules présentant une résistance non génétique associée à un phénotype dédifférencié présentent une mécanosensibilité accrue par l'activation des voies YAP et MRTF-A. Ce phénotype mécanosensible s'accompagne de l'acquisition de propriétés typiques des CAF comme la génération de forces contractiles et la production d'une MEC de fibres alignées. De façon intéressante, cette MEC est plus rigide et mène à la résistance des cellules de mélanomes naïfs en activant les voies YAP et MRTF-A. Ce travail révèle ainsi une boucle de rétrocontrôle positif où les voies YAP et MRTF-A et la rigidité de la MEC s'alimentent entre elles pour conférer une résistance aux thérapies ciblées.

Dans un deuxième temps, j'ai montré une différence de réponse des cellules de mélanome aux signaux mécaniques de la matrice selon leur état de différenciation phénotypique, suggérant que la capacité de certaines sous-populations tumorales à s'adapter et à répondre à l'environnement matriciel renforce l'hétérogénéité intratumorale, source de métastases, d'évasion immunitaire et d'échappement thérapeutique. Comparé aux cellules cancéreuses bien différenciées, les cellules peu différenciées sont plus sensibles aux changements de rigidité. En retour ces signaux mécaniques accentuent leur phénotype et les rendent plus agressives en augmentant leur prolifération, leur migration/invasion et leur résistance thérapeutique. De plus, nous avons identifié la voie DDR/Actomyosine/YAP comme responsable de la mécanosensibilité et de l'agressivité des cellules de mélanome (figure).

Ces travaux ont permis de mettre en évidence le rôle de la mécanotransduction et du dialogue mécanique entre les cellules de mélanome et le stroma tumoral dans la progression et la résistance thérapeutique. Ces travaux pourraient permettre de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques pour mieux cibler les cellules cancéreuses et en particulier éliminer les sous-populations cellulaires dédifférenciées reconnues comme agressives et réfractaires aux traitements.

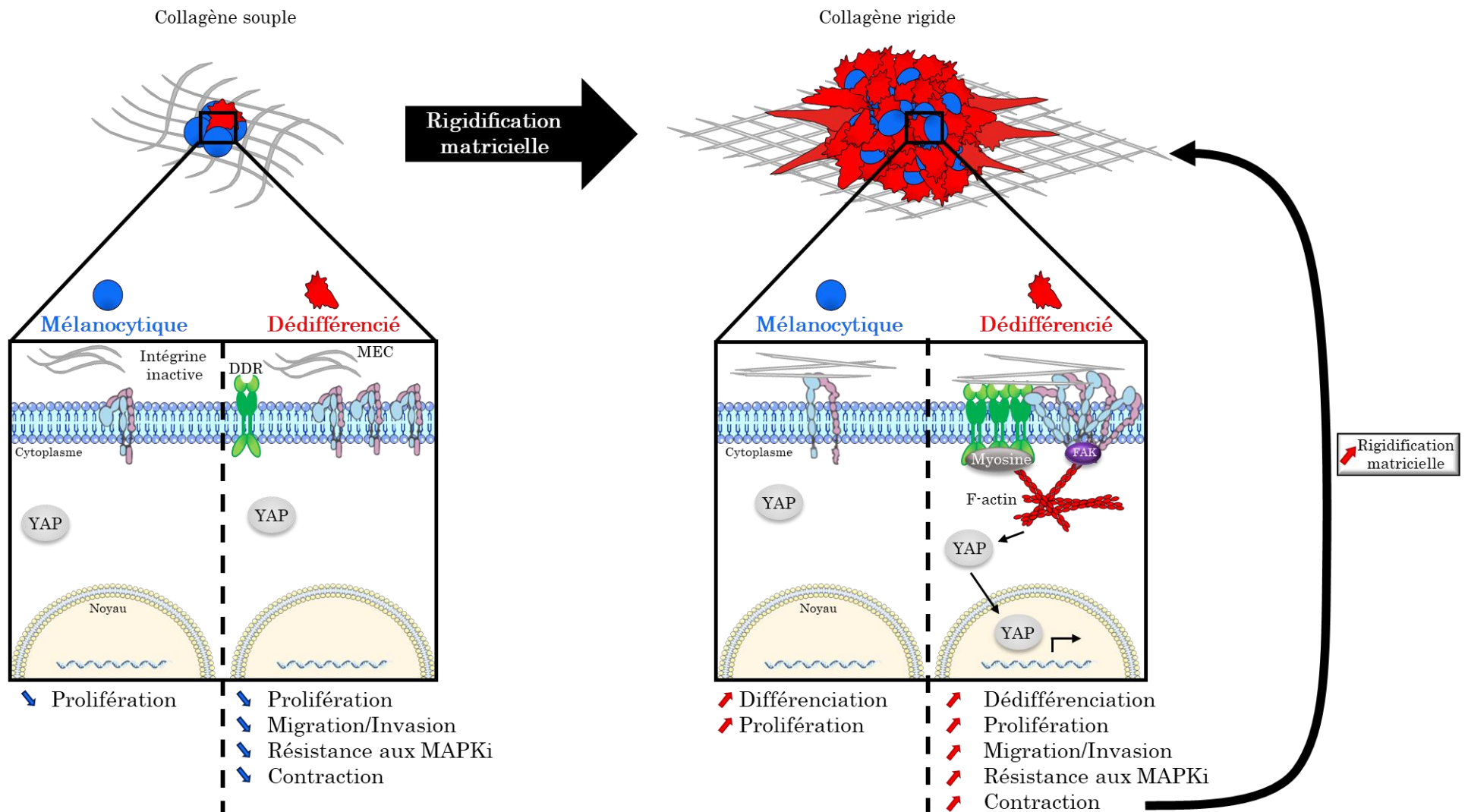


Figure 1 : Schéma de conclusion

La rigidification du substrat a un effet fonctionnel différent entre les cellules mélanocytiques et les cellules dédifférenciées.

Dans les cellules mélanocytiques, la rigidité du substrat induit une accentuation du phénotype différencié ainsi qu'une augmentation de la prolifération des cellules.

Dans les cellules dédifférenciées, l'augmentation de la rigidité accentue la dédifférenciation et augmente leur prolifération, migration/invasion, résistance aux thérapies ciblées et leurs capacités contractiles. Ces propriétés contractiles leur permettent de remodeler leur substrat environnant, en le rendant plus rigide, maintenant ainsi les signaux mécaniques dont ils sont très dépendants.

Les cellules répondent différemment aux signaux mécaniques, car les cellules dédifférenciées forment plus d'adhésions focales et expriment les récepteurs aux collagènes DDR1 et DDR2 contrairement aux cellules mélanocytiques. L'activation de ces récepteurs par la rigidité matricielle, et potentiellement leur coopération avec la voie des intégrines, active le mécanosenseur YAP, par un remodelage du cytosquelette d'actomyosine.

PERSPECTIVES

Ces travaux posent de nouvelles questions et ouvrent des perspectives de travail intéressantes.

- Quelles sont les voies de signalisation en aval des DDR qui régule YAP ?

Nos travaux montrent que la rigidité matricielle active les récepteurs au collagène DDR1 et DDR2, qui vont réguler la mécano-transduction en modulant la formation d'adhésions focales, le remodelage cytosquelette d'actomyosine et l'activation de la voie YAP. Cependant, nous ne savons pas de quelle façon les DDR transduisent les signaux mécaniques dépendants de YAP. Les DDR peuvent interagir avec d'autres récepteurs au collagène comme les intégrines $\alpha1\beta1$ ou $\alpha2\beta1$ par exemple. Des études ont montré que soit DDR1 soit DDR2, selon le type cellulaire étudié, peuvent réguler l'activité positivement ou négativement de l'intégrine $\beta1$. Cependant on ne sait pas si les DDR régulent son activité par une interaction directe, en étant présents dans les adhésions focales, ou indirectement par d'autres protéines. Nos résultats préliminaires montrent que DDR1 et DDR2 phosphorylés colocalisent avec la vinculine au niveau des adhésions focales (figure 1). Il est donc probable que l'activation des DDR par le collagène rigide participe à l'assemblage et l'architecture des adhésions focales. Il serait intéressant d'étudier la contribution des intégrines dans les effets fonctionnels transmis par les DDR sur YAP dans les cellules de mélanome dédifférenciées.

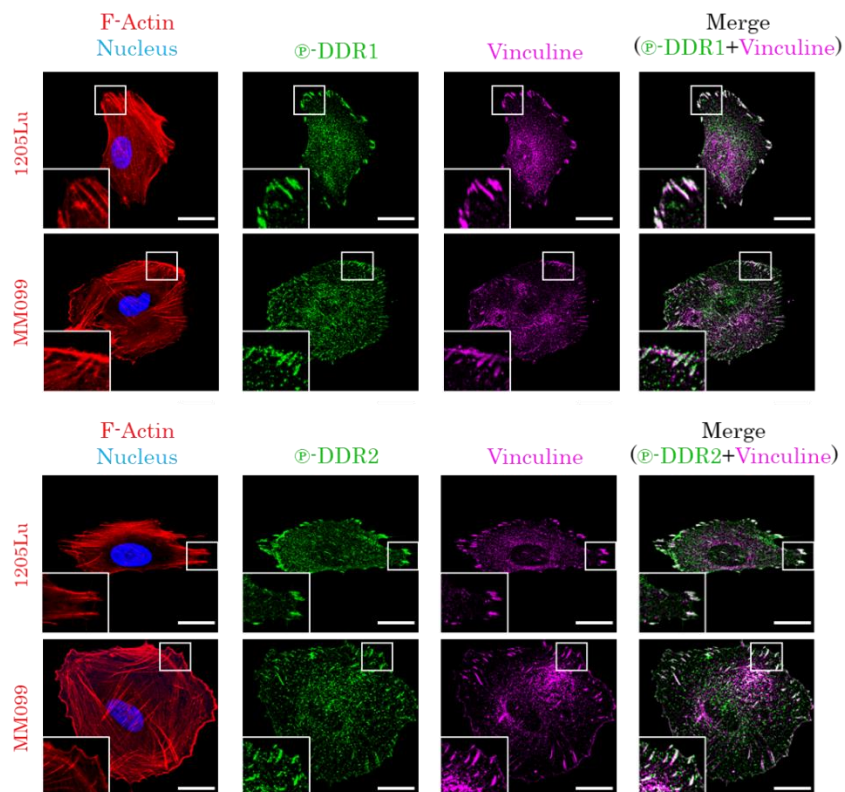


Figure 1 : Les DDR sont localisés dans les adhésions focales

Immunofluorescence de p-DDR1 ou p-DDR2 (en vert) et de la vinculine (en violet), une protéine des adhésions focales. Expérience réalisée sur les cellules dédifférenciées 1205Lu et MM099 ensemencées sur substrat rigide pendant 24h.

Au niveau cytoplasmique, nous avons montré que les DDR régulent le remodelage du cytosquelette d'actomyosine et la formation de fibres de stress et que cela passe par l'activation de la voie RHO/ROCK/MLC2. Il est donc très probable que la translocation nucléaire et l'activation de YAP par les DDR passe par une réorganisation du réseau d'actomyosine. Il est bien décrit que la myosine II peut interagir avec DDR1 dans les fibroblastes (Coelho et al., 2017) mais cela n'a pas été montré pour DDR2. En revanche nous ne savons pas si leur interaction est directe ou s'ils font partie d'un complexe protéique commun. Différentes molécules adaptatrices ont été décrites pour être recrutées au niveau des sites de phosphorylation de DDR1 et DDR2 telles que SHP-1/2, NCK1/2, LYN, ou STAT (Leitinger, 2014) qui pourraient être de possibles régulateurs en amont de la voie RHO/ROCK. Dans notre modèle, nous avons besoin de cibler les deux récepteurs pour observer un effet fonctionnel. Cela suggère qu'il y a une compensation entre les deux récepteurs et qu'ils convergent vers une cible cytoplasmique commune, qu'il serait intéressant d'identifier, par des approches protéomiques, dans un contexte de rigidité contrôlée.

Concernant d'autres mécanismes possibles impliqués dans la régulation de la translocation nucléaire de YAP par les DDR, on peut envisager un rôle du système ubiquitine-protéasome. Il a été montré, dans le cancer du sein, que les DDR contrôlent la stabilité de facteurs de transcription de l'EMT comme Snail, en empêchant son ubiquitination et donc sa dégradation (Zhang et al., 2013). Il est bien connu que les composants de la voie de signalisation Hippo sont ciblés par le système ubiquitine-protéasome et que les niveaux de YAP sont régulés par sa liaison avec l'E3-ligase β -TrCP, provoquant son ubiquitination et son adressage au protéasome pour être dégradée (Zhao et al., 2010a). Dans notre modèle, il est possible que la mécano-activation des DDR interfère dans ce processus pour favoriser la stabilisation de YAP et sa translocation vers le noyau. De plus, il existe des enzymes, les déubiquitinases, qui catalysent la réaction inverse des E3-ligases, en enlevant un groupement ubiquitine, et entraînent la stabilisation des protéines. On pourrait émettre l'hypothèse que la rigidité et les DDR activent une ou plusieurs enzyme(s) de cette famille pour permettre la stabilisation de YAP et son activité transcriptionnelle.

Comme nous l'avons montré dans une étude précédente, la signalisation du collagène par les récepteurs DDR1 et DDR2 confère au mélanome une résistance aux thérapies ciblées via l'activation de la voie NF- κ B non canonique (Berestjuk et al., 2019) (*Annexe II*). Dans mon étude, je montre que YAP est impliqué dans la résistance induite par les DDR en réponse aux signaux mécaniques. De façon intéressante, la voie NF- κ B non canonique fait partie de la signature des sous-populations de mélanome différenciées et de type cellules souches de la crête neurale (NCSCL) (Tsoi et al., 2018), tout comme les DDR (Berestjuk et al., 2019). Nous pourrions étudier le lien entre la voie NF- κ B non-canonique et la voie YAP et éventuellement la contribution de la voie NF- κ B non-canonique dans la réponse mécanique des cellules de mélanome différenciées.

- *Est-ce que la rigidité matricielle et la voie des DDR influencent la résistance aux immunothérapies ?*

Notre seconde étude montre que les signaux mécaniques et les récepteurs DDR1 et DDR2 sont essentiels pour la résistance des cellules dédifférenciées aux thérapies ciblées. De façon intéressante, nous avons également montré que les cellules dédifférenciées, en réponse aux thérapies ciblées, sont plus mécanosensibles et créent une niche matricielle rigide qui favorise la résistance thérapeutique des cellules de mélanome différenciées et sensibles aux traitements. Cela suggère une coopération possible entre les différentes sous-populations de cellules co-existant dans la tumeur pour promouvoir un échappement thérapeutique. Un nombre croissant d'études mettent en relation la résistance aux thérapies ciblées avec la résistance aux anticorps dirigés contre les points de contrôles immunologiques (PD1, PD-L1 ou CTLA4) dans le mélanome. Il a été montré qu'une signature transcriptionnelle commune est retrouvée dans les deux types de résistance. Cette signature est liée à une augmentation d'expression de gènes régulant le switch vers un phénotype dédifférencié, l'adhésion cellulaire, le remodelage matriciel et une signature YAP (Hugo et al., 2016; Orgaz et al., 2020). Comme nous avons montré que la rigidité matricielle accentue le phénotype dédifférencié et que les cellules dédifférenciées sont très dépendantes des signaux d'adhésions à une matrice rigide pour survivre aux thérapies ciblées, il serait intéressant de vérifier si ces cellules sont également résistantes aux immunothérapies. Pour cela, nous pourrions utiliser un modèle murin syngénique dont nous disposons au laboratoire. Nos résultats préliminaires montrent que des cellules primaires de mélanome murin syngénique Yumm1.7 ($Braf^{V600E/WT}$ $Pten^{-/-}$ $Cdkn2^{-/-}$) sont sensibles aux changements de rigidité matricielle et qu'en réponse à la thérapie ciblée, elles subissent une reprogrammation biomécanique associée à une réaction pro-fibrotique similaire à celle que nous avons montrée dans l'Article 1 dans les cellules humaines mutées pour BRAF (Diazi et al., 2021; Girard et al., 2020) (*Annexe III*) (figure 2). Ce modèle murin semble donc un bon modèle pour étudier la résistance croisée entre les thérapies ciblées et les immunothérapies en lien avec les propriétés biomécaniques de la MEC.

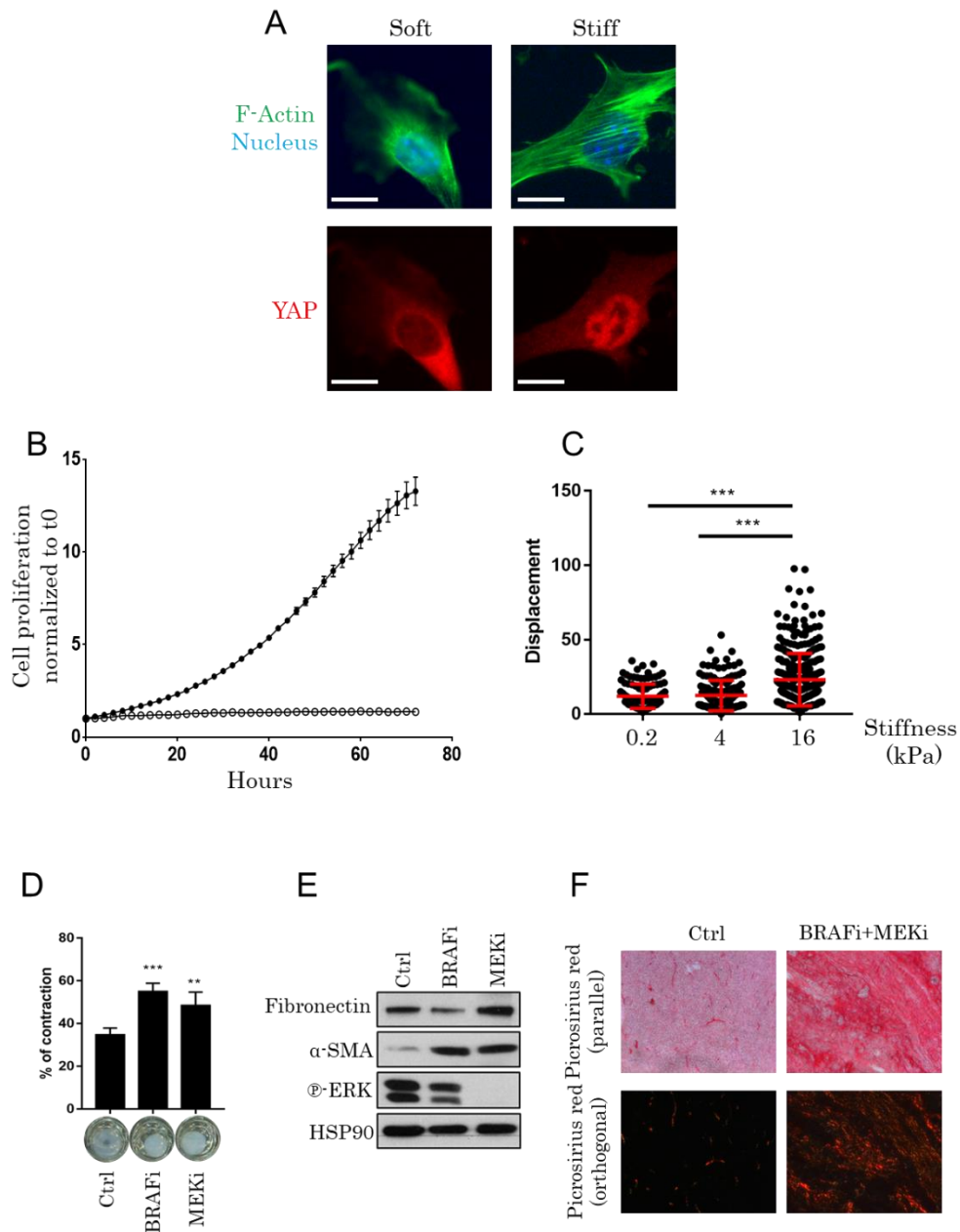


Figure 2 : Les cellules de mélanome murins Yum1.7 sont mécanosensibles et présentent une reprogrammation biomécanique en réponse aux thérapies ciblées *in vitro* et *in vivo*.

(A) Immunofluorescence des Yum1.7 ensemencées sur support souple ou rigide pendant 24h. L'actine est marquée en vert, les noyaux en bleu et YAP en rouge. Echelle = 15µm.

(B) Suivi de la prolifération des Yum1.7 cultivées sur substrat souples ou rigides pendant 72h en temps réel à l'aide de l'Incucyte®.

(C) Mesure du déplacement des cellules ensemencées sur support souple ou rigide pendant 24h par vidéomicroscopie.

(D) Contraction des Yum1.7 dans un gel de collagène 3D après 72h de traitement avec BRAFi ou MEKi.

(E) Western blot des lysats de cellules traitées pendant 72h avec BRAFi ou MEKi. HSP90 sert de contrôle de charge.

(F) Images représentatives de coloration du collagène à l'aide de picrosirius red dans des tumeurs de Yum1.7 après traitement des souris C57/BL6 au DMSO (Ctrl) ou à la combothérapie (BRAFi+MEKi).

Les tumeurs ayant rechuté après un traitement aux thérapies ciblées sont dans de nombreux cas également résistants aux immunothérapies, soit de façon intrinsèque par des voies de signalisation modulées dans la cellule cancéreuse, soit de façon extrinsèque au niveau du stroma tumoral avec la mise en place par la cellule résistante d'un microenvironnement immunosuppresseur (Hugo et al., 2015). Les signaux mécaniques provenant du réseau matriciel peuvent également moduler le trafic et la fonction des cellules immunitaires et affecter leur action antitumorale. En effet, la rigidité matricielle diminue la migration des cellules dendritiques présentatrices d'antigène et des lymphocytes T cytotoxiques (Mennens et al., 2017; Nicolas-Boluda et al., 2021). De plus, cette étude de l'équipe du Dr Donnadieu a montré que le ciblage de la rigidité matricielle améliore l'efficacité des immunothérapies dans un modèle murin d'adénocarcinome du pancréas (Nicolas-Boluda et al., 2021). Dans le cas du mélanome, l'augmentation de la rigidité matricielle peut être induite par les thérapies ciblées et peut-être normalisée par le ciblage des DDR ou de YAP (Berestjuk et al., 2019)(*Annexe II*) (Girard et al., 2020 ; Lecacheur et al., 2020) (*Article 1*). De plus, une étude récente a montré que le ciblage de DDR2 améliore l'efficacité des immunothérapies anti-PD1 (Tu et al., 2019). Le ciblage de la rigidité matricielle peut également être réalisé en utilisant le BAPN, un inhibiteur des LOX, la famille de protéines responsables de la réticulation du collagène pour rigidifier la matrice extracellulaire, ou des anticorps bloquant anti-LOX (Barker et al., 2012). Il serait donc intéressant d'analyser dans le modèle murin syngénique Yumm1.7, après échappement aux thérapies ciblées, la réponse antitumorale immune et l'effet du ciblage du remodelage du collagène, dans la réponse aux anti-PD1. Cette étude permettrait de révéler l'importance de la rigidité matricielle et de la voie des DDR/YAP dans les fonctions et le recrutement des cellules immunitaires. Tout cela améliorerait la compréhension du processus de cross-résistance et éventuellement d'améliorer l'efficacité des immunothérapies proposées en seconde ligne pour les patients ayant rechuté sous thérapie ciblée.

- *Est-ce que la rigidité matricielle peut devenir un biomarqueur d'agressivité et de réponse thérapeutique ?*

Nos résultats ont montré que la rigidité matricielle favorise différents paramètres de l'agressivité des cellules de mélanome métastatique avec un phénotype dédifférencié. En revanche, nous ne savons pas comment le microenvironnement matriciel du mélanome est modulé lors de sa progression. Des résultats préliminaires de marquage du collagène I avec du picrosirius red suggère qu'un remodelage matriciel a lieu lors du stade 2, qui correspond à la phase de croissance verticale (figure 3)

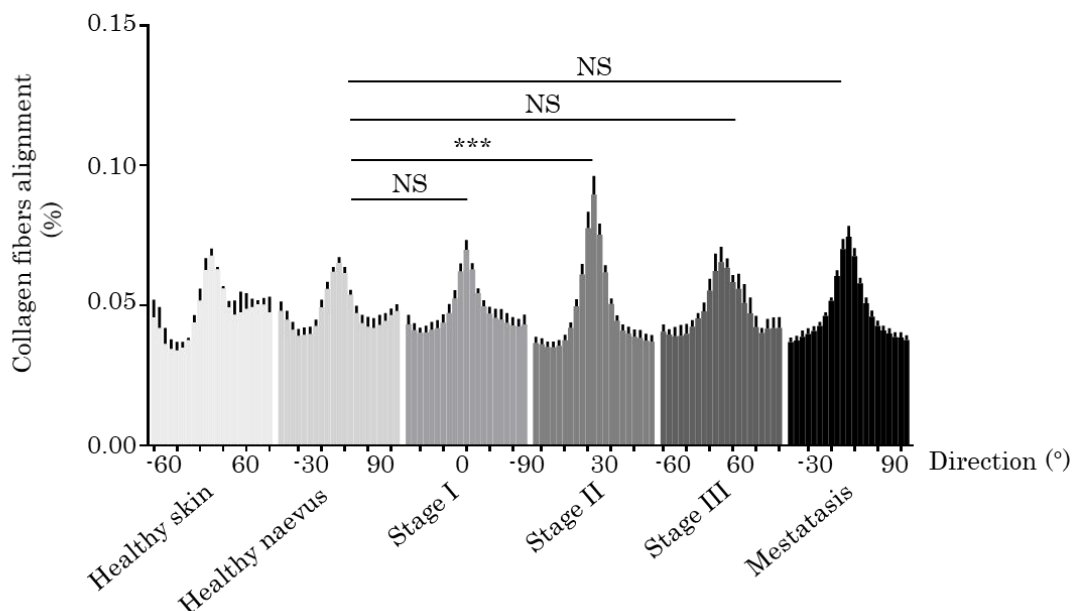
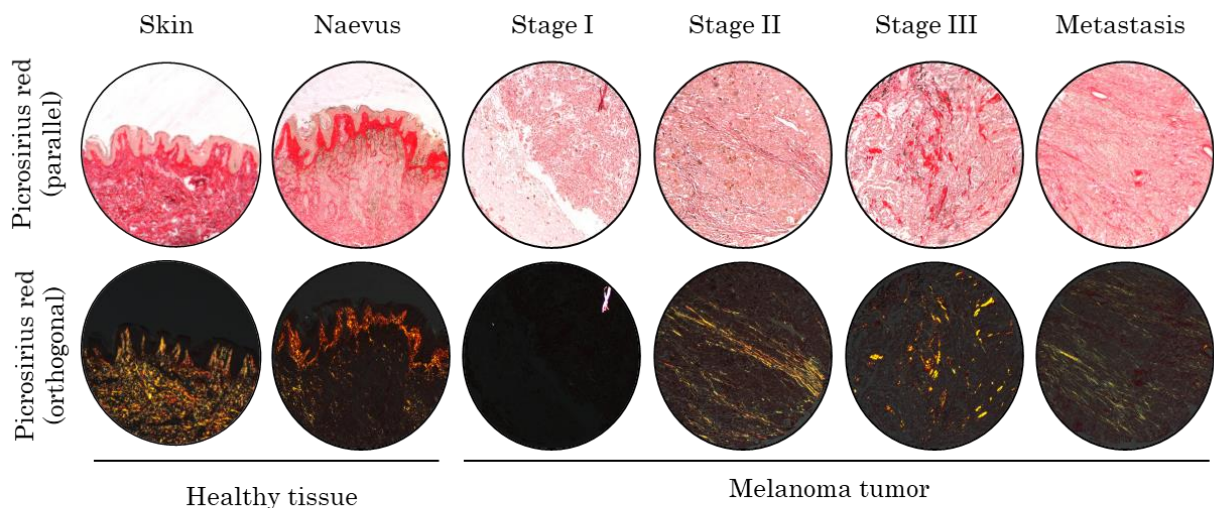


Figure 3 : Le collagène I est remodelé au cours de la progression du mélanome

(Haut) Marquage du collagène I avec du picrosirius red sur des coupes humaines de peau, de naevus, ou de tumeurs de mélanome à différents stades (TMA ME1004G, Biomax). Images prises au microscope photonique à lumière blanche ou lumière polarisée pour visualiser les fibres de collagène matures.

(Bas) Quantification de l'alignement des fibres de collagène à l'aide du logiciel Image J

Ces résultats montrent que la remodelage et l'alignement des fibres en plus de la rigidité matricielle peuvent jouer un rôle également à des étapes plus précoces de l'histoire du mélanome. Il serait intéressant d'étudier plus en détail le rôle de la matrice dans les propriétés tumorales telles que la prolifération, la migration et invasion et la différenciation, en utilisant, notamment, des matrices dérivées de fibroblastes (CDM, cf chapitre 2) provenant de tissu sain ou de niches métastatiques d'origine différentes comme la peau, les ganglions lymphatiques ou d'autres organes (Berestjuk et al., 2019).

La rigidité matricielle n'est pas la seule source de stress mécanique pour les cellules tumorales. Les cellules au sein de la cellule tumorale, dans les cancers solides, peuvent subir notamment un stress de compression, lié à la proximité et à l'augmentation du nombre de cellules mais également du stroma environnant. Une étude récente a montré, dans le cancer de pancréas, que le stress de compression améliore la résistance aux chimiothérapies (Rizzuti et al., 2020). Il serait intéressant de savoir si ce type de stress mécanique peut également influencer la résistance aux thérapies ciblées et l'agressivité des cellules de mélanome.

Récemment, il a été montré que la rigidité matricielle favorise la transformation maligne de cellules mammaires saines ou pré-cancéreuses dans le cancer du sein (Panciera et al., 2020; Weaver et al., 1995). De plus, une étude clinique a suggéré qu'un stress mécanique pourrait favoriser l'apparition de mélanome plantaire (Minagawa et al., 2016). Il serait donc intéressant de tester, dans un modèle murin, si la rigidité matricielle, ou un stress mécanique en général, peut provoquer la transformation d'un naevus, une lésion pré-cancéreuse, en mélanome. Il serait également intéressant de confirmer sur un plus large panel la rigidité des naevi et d'analyser la rigidité des métastases avant traitement mais également des tumeurs après rechute aux thérapies ciblées ou immunothérapies chez les patients, de façon non invasive par élastographie optico-acoustique comme décrit dans l'étude de Kirkpatrick et al. (Kirkpatrick et al., 2006). Cela permettrait de savoir si l'apparition de fibrose peut être corrélée à un type de résistance et ainsi prévoir son agressivité et sa réponse thérapeutique. La rigidité matricielle pourrait ainsi devenir un biomarqueur prédictif d'une non-réponse aux thérapies anti-mélanome. A terme, cela pourrait permettre de choisir une meilleure option thérapeutique avec notamment le repositionnement d'anti-fibrotiques comme l'Imatinib ou le Nintedanib en combinaison avec les thérapies ciblées et pour finalement améliorer la survie des patients atteints de mélanome métastatique.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbonante, V., Gruppi, C., Rubel, D., Gross, O., Moratti, R., and Balduini, A. (2013). Discoidin domain receptor 1 protein is a novel modulator of megakaryocyte-collagen interactions. *The Journal of biological chemistry* *288*, 16738-16746.
- Abel, E.V., Basile, K.J., Kugel, C.H., 3rd, Witkiewicz, A.K., Le, K., Amaravadi, R.K., Karakousis, G.C., Xu, X., Xu, W., Schuchter, L.M., *et al.* (2013). Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *The Journal of clinical investigation* *123*, 2155-2168.
- Afasizheva, A., Devine, A., Tillman, H., Fung, K.L., Vieira, W.D., Blehm, B.H., Kotobuki, Y., Busby, B., Chen, E.I., and Tanner, K. (2016). Mitogen-activated protein kinase signaling causes malignant melanoma cells to differentially alter extracellular matrix biosynthesis to promote cell survival. *BMC cancer* *16*, 186.
- Ahmadzadeh, H., Webster, M.R., Behera, R., Jimenez Valencia, A.M., Wirtz, D., Weeraratna, A.T., and Shenoy, V.B. (2017). Modeling the two-way feedback between contractility and matrix realignment reveals a nonlinear mode of cancer cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *114*, E1617-E1626.
- Akhurst, R.J. (2017). Targeting TGF-beta Signaling for Therapeutic Gain. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *9*.
- Akiyama, S.K., Yamada, S.S., Chen, W.T., and Yamada, K.M. (1989). Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *The Journal of cell biology* *109*, 863-875.
- Alan, J.K., and Lundquist, E.A. (2013). Mutationally activated Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* *4*, 159-163.
- Albregues, J., Bourget, I., Pons, C., Butet, V., Hofman, P., Tartare-Deckert, S., Feral, C.C., Meneguzzi, G., and Gaggioli, C. (2014a). LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell reports* *7*, 1664-1678.
- Albregues, J., Meneguzzi, G., and Gaggioli, C. (2014b). [Carcinoma-associated fibroblasts in cancer: the great escape]. *Medicine sciences : M/S* *30*, 391-397.
- Albregues, J., Shields, M.A., Ng, D., Park, C.G., Ambrico, A., Poindexter, M.E., Upadhyay, P., Uyeminami, D.L., Pommier, A., Kuttner, V., *et al.* (2018). Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* *361*.
- Alford, A.I., and Hankenson, K.D. (2006). Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone* *38*, 749-757.
- Alitalo, K. (2011). The lymphatic vasculature in disease. *Nature medicine* *17*, 1371-1380.
- Alves, F., Vogel, W., Mossie, K., Millauer, B., Hofler, H., and Ullrich, A. (1995). Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. *Oncogene* *10*, 609-618.
- Anderberg, C., Li, H., Fredriksson, L., Andrae, J., Betsholtz, C., Li, X., Eriksson, U., and Pietras, K. (2009). Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer research* *69*, 369-378.
- Andersen, L.B., Fountain, J.W., Gutmann, D.H., Tarle, S.A., Glover, T.W., Dracopoli, N.C., Housman, D.E., and Collins, F.S. (1993). Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines. *Nature genetics* *3*, 118-121.
- Appleton, K.M., Palsuledesai, C.C., Misek, S.A., Blake, M., Zagorski, J., Gallo, K.A., Dexheimer, T.S., and Neubig, R.R. (2021). Inhibition of the Myocardin-Related Transcription Factor Pathway Increases Efficacy of Trametinib in NRAS-Mutant Melanoma Cell Lines. *Cancers* *13*.
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* *154*, 1047-1059.
- Armulik, A., Genove, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental cell* *21*, 193-215.

- Arnold, J.N., Magiera, L., Kraman, M., and Fearon, D.T. (2014). Tumoral immune suppression by macrophages expressing fibroblast activation protein- α and heme oxygenase-1. *Cancer immunology research* *2*, 121-126.
- Arozarena, I., and Wellbrock, C. (2017). Overcoming resistance to BRAF inhibitors. *Annals of translational medicine* *5*, 387.
- Arozarena, I., and Wellbrock, C. (2019). Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nature reviews Cancer* *19*, 377-391.
- Ascierto, P.A., Kirkwood, J.M., Grob, J.J., Simeone, E., Grimaldi, A.M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F.M., and Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of translational medicine* *10*, 85.
- Asparuhova, M.B., Ferralli, J., Chiquet, M., and Chiquet-Ehrismann, R. (2011). The transcriptional regulator megakaryoblastic leukemia-1 mediates serum response factor-independent activation of tenascin-C transcription by mechanical stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *25*, 3477-3488.
- Asparuhova, M.B., Gelman, L., and Chiquet, M. (2009). Role of the actin cytoskeleton in tuning cellular responses to external mechanical stress. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* *19*, 490-499.
- Badiola, I., Olaso, E., Crende, O., Friedman, S.L., and Vidal-Vanaclocha, F. (2012). Discoidin domain receptor 2 deficiency predisposes hepatic tissue to colon carcinoma metastasis. *Gut* *61*, 1465-1472.
- Bae, Y.H., Mui, K.L., Hsu, B.Y., Liu, S.L., Cretu, A., Razinia, Z., Xu, T., Pure, E., and Assoian, R.K. (2014). A FAK-Cas-Rac-lamellipodin signaling module transduces extracellular matrix stiffness into mechanosensitive cell cycling. *Science signaling* *7*, ra57.
- Bai, X., and Flaherty, K.T. (2021). Targeted and immunotherapies in BRAF mutant melanoma: where we stand and what to expect. *The British journal of dermatology* *185*, 253-262.
- Balar, A.V., Castellano, D., O'Donnell, P.H., Grivas, P., Vuky, J., Powles, T., Plimack, E.R., Hahn, N.M., de Wit, R., Pang, L., *et al.* (2017). First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology* *18*, 1483-1492.
- Ballester, B., Milara, J., and Cortijo, J. (2019). Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer: Mechanisms and Molecular Targets. *International journal of molecular sciences* *20*.
- Barak, V., Goike, H., Panaretakis, K.W., and Einarsson, R. (2004). Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clinical biochemistry* *37*, 529-540.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and tissue research* *339*, 269-280.
- Bargal, R., Cormier-Daire, V., Ben-Neriah, Z., Le Merrer, M., Sosna, J., Melki, J., Zangen, D.H., Smithson, S.F., Borochowitz, Z., Belostotsky, R., *et al.* (2009). Mutations in DDR2 gene cause SMED with short limbs and abnormal calcifications. *American journal of human genetics* *84*, 80-84.
- Barker, H.E., Chang, J., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Nicolau, M., Evans, H.R., Gartland, A., and Erler, J.T. (2011). LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer research* *71*, 1561-1572.
- Barker, H.E., Cox, T.R., and Erler, J.T. (2012). The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nature reviews Cancer* *12*, 540-552.
- Barnes, J.M., Przybyla, L., and Weaver, V.M. (2017). Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *Journal of cell science* *130*, 71-82.
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H.M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., *et al.* (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nature medicine* *16*, 1009-1017.
- Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M., and Downward, J. (2003). Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Molecular cell* *11*, 11-23.

- Bayer, S.V., Grither, W.R., Brenot, A., Hwang, P.Y., Barcus, C.E., Ernst, M., Pence, P., Walter, C., Pathak, A., and Longmore, G.D. (2019). DDR2 controls breast tumor stiffness and metastasis by regulating integrin mediated mechanotransduction in CAFs. *eLife* *8*.
- Beacham, D.A., Amatangelo, M.D., and Cukierman, E. (2007). Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Current protocols in cell biology Chapter 10*, Unit 10 19.
- Beiter, K., Hiendlmeyer, E., Brabletz, T., Hlubek, F., Haynl, A., Knoll, C., Kirchner, T., and Jung, A. (2005). beta-Catenin regulates the expression of tenascin-C in human colorectal tumors. *Oncogene* *24*, 8200-8204.
- Belli, C., Trapani, D., Viale, G., D'Amico, P., Duso, B.A., Della Vigna, P., Orsi, F., and Curigliano, G. (2018). Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer treatment reviews* *65*, 22-32.
- Benson, A.B., 3rd, Wainberg, Z.A., Hecht, J.R., Vyushkov, D., Dong, H., Bendell, J., and Kudrik, F. (2017). A Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Simtuzumab or Placebo in Combination with Gemcitabine for the First-Line Treatment of Pancreatic Adenocarcinoma. *The oncologist* *22*, 241-e215.
- Berestjuk, I., Lecacheur, M., Diazzi, S., Rovera, C., Prod'homme, V., Mallavialle, A., Larbret, F., Pisano, S., Audebert, S., Passeron, T., *et al.* (2019). Targeting DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated melanoma cell adaptation to BRAF-targeted therapy. *bioRxiv*, 857896.
- Berking, C., Takemoto, R., Schaidler, H., Showe, L., Satyamoorthy, K., Robbins, P., and Herlyn, M. (2001). Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer research* *61*, 8306-8316.
- Berube, M., Talbot, M., Collin, C., Paquet-Bouchard, C., Germain, L., Guerin, S.L., and Petitclerc, E. (2005). Role of the extracellular matrix proteins in the resistance of SP6.5 uveal melanoma cells toward cisplatin. *International journal of oncology* *26*, 405-413.
- Betapudi, V., Licate, L.S., and Egelhoff, T.T. (2006). Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. *Cancer research* *66*, 4725-4733.
- Bevona, C., Goggins, W., Quinn, T., Fullerton, J., and Tsao, H. (2003). Cutaneous melanomas associated with nevi. *Archives of dermatology* *139*, 1620-1624; discussion 1624.
- Bhattacharya, R., Gonzalez, A.M., Debiase, P.J., Trejo, H.E., Goldman, R.D., Flitney, F.W., and Jones, J.C. (2009). Recruitment of vimentin to the cell surface by beta3 integrin and plectin mediates adhesion strength. *Journal of cell science* *122*, 1390-1400.
- Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of pathology* *196*, 254-265.
- Biswas, S.K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., *et al.* (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* *107*, 2112-2122.
- Bittner, M., Meltzer, P., Chen, Y., Jiang, Y., Seftor, E., Hendrix, M., Radmacher, M., Simon, R., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., *et al.* (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* *406*, 536-540.
- Blehm, B.H., Jiang, N., Kotobuki, Y., and Tanner, K. (2015). Deconstructing the role of the ECM microenvironment on drug efficacy targeting MAPK signaling in a pre-clinical platform for cutaneous melanoma. *Biomaterials* *56*, 129-139.
- Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R., and Marchlewicz, M. (2016). Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postepy dermatologii i alergologii* *33*, 1-5.
- Bohme, I., and Bosserhoff, A. (2020). Extracellular acidosis triggers a senescence-like phenotype in human melanoma cells. *Pigment cell & melanoma research* *33*, 41-51.

- Bonanno, E., Iurlaro, M., Madri, J.A., and Nicosia, R.F. (2000). Type IV collagen modulates angiogenesis and neovessel survival in the rat aorta model. *In vitro cellular & developmental biology Animal* *36*, 336-340.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* *15*, 786-801.
- Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. *Annual review of immunology* *24*, 175-208.
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D.R., Steins, M., Ready, N.E., Chow, L.Q., Vokes, E.E., Felip, E., Holgado, E., *et al.* (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* *373*, 1627-1639.
- Borsellino, N., Bonavida, B., Ciliberto, G., Toniatti, C., Travali, S., and D'Alessandro, N. (1999). Blocking signaling through the Gp130 receptor chain by interleukin-6 and oncostatin M inhibits PC-3 cell growth and sensitizes the tumor cells to etoposide and cisplatin-mediated cytotoxicity. *Cancer* *85*, 134-144.
- Bose P., (2018). *Extracellular Matrix Architecture And Biomechanics Of 3d Engineered Microtissues*, [Thèse de Doctorat, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA]. DOI : 10.13140/RG.2.2.23413.83688
- Boshuizen, J., Koopman, L.A., Krijgsman, O., Shahrabi, A., van den Heuvel, E.G., Ligtenberg, M.A., Vredevoogd, D.W., Kemper, K., Kuilman, T., Song, J.Y., *et al.* (2018). Cooperative targeting of melanoma heterogeneity with an AXL antibody-drug conjugate and BRAF/MEK inhibitors. *Nature medicine* *24*, 203-212.
- Boussemart, L., Girault, I., Malka-Mahieu, H., Mateus, C., Routier, E., Rubington, M., Kamsu-Kom, N., Thomas, M., Tomasic, G., Agoussi, S., *et al.* (2016). Secondary Tumors Arising in Patients Undergoing BRAF Inhibitor Therapy Exhibit Increased BRAF-CRAF Heterodimerization. *Cancer research* *76*, 1476-1484.
- Boyd, N.F., Guo, H., Martin, L.J., Sun, L., Stone, J., Fishell, E., Jong, R.A., Hislop, G., Chiarelli, A., Minkin, S., *et al.* (2007). Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *The New England journal of medicine* *356*, 227-236.
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M.A., and Weinberg, R.A. (2018). EMT in cancer. *Nature reviews Cancer* *18*, 128-134.
- Brand, A., Singer, K., Koehl, G.E., Kolitzus, M., Schoenhammer, G., Thiel, A., Matos, C., Bruss, C., Klobuch, S., Peter, K., *et al.* (2016). LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell metabolism* *24*, 657-671.
- Brennen, W.N., Isaacs, J.T., and Denmeade, S.R. (2012). Rationale behind targeting fibroblast activation protein-expressing carcinoma-associated fibroblasts as a novel chemotherapeutic strategy. *Molecular cancer therapeutics* *11*, 257-266.
- Brichkina, A., Bertero, T., Loh, H.M., Nguyen, N.T., Emelyanov, A., Rigade, S., Ilie, M., Hofman, P., Gaggioli, C., and Bulavin, D.V. (2016). p38MAPK builds a hyaluronan cancer niche to drive lung tumorigenesis. *Genes & development* *30*, 2623-2636.
- Broders-Bondon, F., Nguyen Ho-Boulidoires, T.H., Fernandez-Sanchez, M.E., and Farge, E. (2018). Mechanotransduction in tumor progression: The dark side of the force. *The Journal of cell biology* *217*, 1571-1587.
- Brohawn, S.G., Su, Z., and MacKinnon, R. (2014). Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 3614-3619.
- Bucheit, A.D., Syklawer, E., Jakob, J.A., Bassett, R.L., Jr., Curry, J.L., Gershenwald, J.E., Kim, K.B., Hwu, P., Lazar, A.J., and Davies, M.A. (2013). Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. *Cancer* *119*, 3821-3829.

- Buder-Bakhaya, K., and Hassel, J.C. (2018). Biomarkers for Clinical Benefit of Immune Checkpoint Inhibitor Treatment-A Review From the Melanoma Perspective and Beyond. *Frontiers in immunology* *9*, 1474.
- Burger, E.H., and Klein-Nulend, J. (1999). Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *13 Suppl*, S101-112.
- Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., and Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO reports* *9*, 582-589.
- Butcher, D.T., Alliston, T., and Weaver, V.M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nature reviews Cancer* *9*, 108-122.
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R.P., Chaudhry, S.I., Harrington, K., Williamson, P., Moeendarbary, E., Charras, G., *et al.* (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nature cell biology* *15*, 637-646.
- Calvo, F., Ranftl, R., Hooper, S., Farrugia, A.J., Moeendarbary, E., Bruckbauer, A., Batista, F., Charras, G., and Sahai, E. (2015). Cdc42EP3/BORG2 and Septin Network Enables Mechano-transduction and the Emergence of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell reports* *13*, 2699-2714.
- Campbell, D.J., and Koch, M.A. (2011). Treg cells: patrolling a dangerous neighborhood. *Nature medicine* *17*, 929-930.
- Campbell, I.D., and Humphries, M.J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *3*.
- Campbell, N.R., Rao, A., Hunter, M.V., Sznurkowska, M.K., Briker, L., Zhang, M., Baron, M., Heilmann, S., Deforet, M., Kenny, C., *et al.* (2021). Cooperation between melanoma cell states promotes metastasis through heterotypic cluster formation. *Developmental cell* *56*, 2808-2825 e2810.
- Camps, J.L., Chang, S.M., Hsu, T.C., Freeman, M.R., Hong, S.J., Zhau, H.E., von Eschenbach, A.C., and Chung, L.W. (1990). Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 75-79.
- Cancer Genome Atlas, N. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* *161*, 1681-1696.
- Cao, J.J., Zhao, X.M., Wang, D.L., Chen, K.H., Sheng, X., Li, W.B., Li, M.C., Liu, W.J., and He, J. (2014). YAP is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma and its knockdown reduces cell proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis. *Oncology reports* *32*, 1594-1600.
- Carafoli, F., Mayer, M.C., Shiraishi, K., Pecheva, M.A., Chan, L.Y., Nan, R., Leitinger, B., and Hohenester, E. (2012). Structure of the discoidin domain receptor 1 extracellular region bound to an inhibitory Fab fragment reveals features important for signaling. *Structure* *20*, 688-697.
- 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.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* *473*, 298-307.
- Carmichael, S.W. (2014). The tangled web of Langer's lines. *Clinical anatomy* *27*, 162-168.
- 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 Dial1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes & development* *20*, 3426-3439.
- Castellani, P., Viale, G., Dorcaratto, A., Nicolo, G., Kaczmarek, J., Querze, G., and Zardi, L. (1994). The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *International journal of cancer* *59*, 612-618.

- Castello-Cros, R., Khan, D.R., Simons, J., Valianou, M., and Cukierman, E. (2009). Staged stromal extracellular 3D matrices differentially regulate breast cancer cell responses through PI3K and beta1-integrins. *BMC cancer* *9*, 94.
- Catterall, W.A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *3*, a003947.
- Cavallo, F., Calogero, R.A., and Forni, G. (2007). Are oncoantigens suitable targets for anti-tumour therapy? *Nature reviews Cancer* *7*, 707-713.
- Cawston, T.E., and Young, D.A. (2010). Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell and tissue research* *339*, 221-235.
- Celia-Terrassa, T., Meca-Cortes, O., Mateo, F., Martinez de Paz, A., Rubio, N., Arnal-Estape, A., Ell, B.J., Bermudo, R., Diaz, A., Guerra-Rebollo, M., *et al.* (2012). Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *The Journal of clinical investigation* *122*, 1849-1868.
- Cenik, B.K., Liu, N., Chen, B., Bezprozvannaya, S., Olson, E.N., and Bassel-Duby, R. (2016). Myocardin-related transcription factors are required for skeletal muscle development. *Development* *143*, 2853-2861.
- Chacon, A.C., Melucci, A.D., Qin, S.S., and Prieto, P.A. (2021). Thinking Small: Small Molecules as Potential Synergistic Adjuncts to Checkpoint Inhibition in Melanoma. *International journal of molecular sciences* *22*.
- Chambers, R., Fell, H.B., and Hardy, W.B. (1931). Micro-operations on cells in tissue cultures. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character* *109*, 380-403.
- Chang, L., and Goldman, R.D. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nature reviews Molecular cell biology* *5*, 601-613.
- Chao, Y., Wu, Q., Shepard, C., and Wells, A. (2012). Hepatocyte induced re-expression of E-cadherin in breast and prostate cancer cells increases chemoresistance. *Clinical & experimental metastasis* *29*, 39-50.
- Chapman, A., Fernandez del Ama, L., Ferguson, J., Kamarashev, J., Wellbrock, C., and Hurlstone, A. (2014). Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion. *Cell reports* *8*, 688-695.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., *et al.* (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine* *364*, 2507-2516.
- 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.
- Chen, C.S. (2008). Mechanotransduction - a field pulling together? *Journal of cell science* *121*, 3285-3292.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* *198*, 1875-1886.
- Chen, Y., Leask, A., Abraham, D.J., Kennedy, L., Shi-Wen, X., Denton, C.P., Black, C.M., Verjee, L.S., and Eastwood, M. (2011). Thrombospondin 1 is a key mediator of transforming growth factor beta-mediated cell contractility in systemic sclerosis via a mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent mechanism. *Fibrogenesis & tissue repair* *4*, 9.
- Chu, T.Y., Yang, J.T., Huang, T.H., and Liu, H.W. (2014). Crosstalk with cancer-associated fibroblasts increases the growth and radiation survival of cervical cancer cells. *Radiation research* *181*, 540-547.

- Cirri, P., and Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *American journal of cancer research* *1*, 482-497.
- Clark, J.A., Cheng, J.C., and Leung, K.S. (1996). Mechanical properties of normal skin and hypertrophic scars. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* *22*, 443-446.
- 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.
- Coelho, N.M., Arora, P.D., van Putten, S., Boo, S., Petrovic, P., Lin, A.X., Hinz, B., and McCulloch, C.A. (2017). Discoidin Domain Receptor 1 Mediates Myosin-Dependent Collagen Contraction. *Cell reports* *18*, 1774-1790.
- Colak, S., and Ten Dijke, P. (2017). Targeting TGF-beta Signaling in Cancer. *Trends in cancer* *3*, 56-71.
- Colombo, M.P., Modesti, A., Parmiani, G., and Forni, G. (1992). Local cytokine availability elicits tumor rejection and systemic immunity through granulocyte-T-lymphocyte cross-talk. *Cancer research* *52*, 4853-4857.
- Colombo, S., Berlin, I., Delmas, V., and Larue, L. Classical and Nonclassical Melanocytes in Vertebrates. In *Melanins and Melanosomes*, pp. 21-61.
- Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* *124*, 263-266.
- Conic, R.Z., Cabrera, C.I., Khorana, A.A., and Gastman, B.R. (2018). Determination of the impact of melanoma surgical timing on survival using the National Cancer Database. *Journal of the American Academy of Dermatology* *78*, 40-46 e47.
- Cooke, V.G., LeBleu, V.S., Keskin, D., Khan, Z., O'Connell, J.T., Teng, Y., Duncan, M.B., Xie, L., Maeda, G., Vong, S., *et al.* (2012). Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer cell* *21*, 66-81.
- Cooper, J., and Giancotti, F.G. (2019). Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer cell* *35*, 347-367.
- Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A.R., Poletti, A., *et al.* (2011). The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* *147*, 759-772.
- Coronella, J.A., Telleman, P., Kingsbury, G.A., Truong, T.D., Hays, S., and Junghans, R.P. (2001). Evidence for an antigen-driven humoral immune response in medullary ductal breast cancer. *Cancer research* *61*, 7889-7899.
- Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., *et al.* (2018). Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer cell* *33*, 463-479 e410.
- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T.J., Ranade, S., Petrus, M.J., Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* *330*, 55-60.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., *et al.* (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* *3*, 301-313.
- Culver, J.C., Hoffmann, J.C., Poche, R.A., Slater, J.H., West, J.L., and Dickinson, M.E. (2012). Three-dimensional biomimetic patterning in hydrogels to guide cellular organization. *Advanced materials* *24*, 2344-2348.
- Curat, C.A., and Vogel, W.F. (2002). Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* *13*, 2648-2656.
- Curti, B.D., and Faries, M.B. (2021). Recent Advances in the Treatment of Melanoma. *The New England journal of medicine* *384*, 2229-2240.

- Cymerman, R.M., Shao, Y., Wang, K., Zhang, Y., Murzaku, E.C., Penn, L.A., Osman, I., and Polsky, D. (2016). De Novo vs Nevus-Associated Melanomas: Differences in Associations With Prognostic Indicators and Survival. *Journal of the National Cancer Institute* *108*.
- Dai, J., Qin, L., Chen, Y., Wang, H., Lin, G., Li, X., Liao, H., and Fang, H. (2019). Matrix stiffness regulates epithelial-mesenchymal transition via cytoskeletal remodeling and MRTF-A translocation in osteosarcoma cells. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* *90*, 226-238.
- Daly, N., Meleady, P., Walsh, D., and Clynes, M. (1998). Regulation of keratin and integrin gene expression in cancer and drug resistance. *Cytotechnology* *27*, 321-344.
- Damiano, J.S., Cress, A.E., Hazlehurst, L.A., Shtil, A.A., and Dalton, W.S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* *93*, 1658-1667.
- Damsky, W.E., Curley, D.P., Santhanakrishnan, M., Rosenbaum, L.E., Platt, J.T., Gould Rothberg, B.E., Taketo, M.M., Dankort, D., Rimm, D.L., McMahon, M., *et al.* (2011). beta-catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer cell* *20*, 741-754.
- Dangerfield, J., Larbi, K.Y., Huang, M.T., Dewar, A., and Nourshargh, S. (2002). PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *The Journal of experimental medicine* *196*, 1201-1211.
- Dantonio, P.M., Klein, M.O., Freire, M., Araujo, C.N., Chiacetti, A.C., and Correa, R.G. (2018). Exploring major signaling cascades in melanomagenesis: a rationale route for targeted skin cancer therapy. *Bioscience reports* *38*.
- Darby, I.A., Laverdet, B., Bonte, F., and Desmouliere, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology* *7*, 301-311.
- Das, S., Ongusaha, P.P., Yang, Y.S., Park, J.M., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2006). Discoidin domain receptor 1 receptor tyrosine kinase induces cyclooxygenase-2 and promotes chemoresistance through nuclear factor-kappaB pathway activation. *Cancer research* *66*, 8123-8130.
- Daverey, A., Drain, A.P., and Kidambi, S. (2015). Physical Intimacy of Breast Cancer Cells with Mesenchymal Stem Cells Elicits Trastuzumab Resistance through Src Activation. *Scientific reports* *5*, 13744.
- 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.
- Davies, M.A., Stemke-Hale, K., Tellez, C., Calderone, T.L., Deng, W., Prieto, V.G., Lazar, A.J., Gershenwald, J.E., and Mills, G.B. (2008). A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *British journal of cancer* *99*, 1265-1268.
- de la Fuente, M.T., Casanova, B., Moyano, J.V., Garcia-Gila, M., Sanz, L., Garcia-Marco, J., Silva, A., and Garcia-Pardo, A. (2002). Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *Journal of leukocyte biology* *71*, 495-502.
- De Larco, J.E., Wuertz, B.R., and Furcht, L.T. (2004). The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *10*, 4895-4900.
- de Visser, K.E., Korets, L.V., and Coussens, L.M. (2005). De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer cell* *7*, 411-423.
- De Wever, O., Van Bockstal, M., Mareel, M., Hendrix, A., and Bracke, M. (2014). Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis. *Seminars in cancer biology* *25*, 33-46.
- Debelle, L., and Tamburro, A.M. (1999). Elastin: molecular description and function. *The international journal of biochemistry & cell biology* *31*, 261-272.

- Delbaldo, C., Raymond, E., Vera, K., Hammershaimb, L., Kaucic, K., Lozahic, S., Marty, M., and Faivre, S. (2008). Phase I and pharmacokinetic study of etaracizumab (Abegrin), a humanized monoclonal antibody against alphavbeta3 integrin receptor, in patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs* *26*, 35-43.
- Delmas, A., Cherier, J., Pohorecka, M., Medale-Giamarchi, C., Meyer, N., Casanova, A., Sordet, O., Lamant, L., Savina, A., Pradines, A., *et al.* (2015). The c-Jun/RHOB/AKT pathway confers resistance of BRAF-mutant melanoma cells to MAPK inhibitors. *Oncotarget* *6*, 15250-15264.
- Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., *et al.* (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes & development* *21*, 2923-2935.
- Demoulin, S., Herfs, M., Delvenne, P., and Hubert, P. (2013). Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms. *Journal of leukocyte biology* *93*, 343-352.
- Deng, L., Li, G., Li, R., Liu, Q., He, Q., and Zhang, J. (2010). Rho-kinase inhibitor, fasudil, suppresses glioblastoma cell line progression in vitro and in vivo. *Cancer biology & therapy* *9*, 875-884.
- Deng, M., Lin, J., Nowsheen, S., Liu, T., Zhao, Y., Villalta, P.W., Sicard, D., Tschumperlin, D.J., Lee, S., Kim, J., *et al.* (2020). Extracellular matrix stiffness determines DNA repair efficiency and cellular sensitivity to genotoxic agents. *Science advances* *6*.
- Desgrosellier, J.S., and Cheresch, D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews Cancer* *10*, 9-22.
- Desmouliere, A., Darby, I.A., and Gabbiani, G. (2003). Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *83*, 1689-1707.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* *26*, 3279-3290.
- Di Martino, J., Henriot, E., Ezzoukhry, Z., Goetz, J.G., Moreau, V., and Saltel, F. (2016). The microenvironment controls invadosome plasticity. *Journal of cell science* *129*, 1759-1768.
- Diaz Osterman, C.J., Ozmadenci, D., Kleinschmidt, E.G., Taylor, K.N., Barrie, A.M., Jiang, S., Bean, L.M., Sulzmaier, F.J., Jean, C., Tancioni, I., *et al.* (2019). FAK activity sustains intrinsic and acquired ovarian cancer resistance to platinum chemotherapy. *eLife* *8*.
- Diazzi, S., Baeri, A., Fassy, J., Lecacheur, M., Marin-Bejar, O., Girard, C.A., Lefevre, L., Lacoux, C., Irondelle, M., Mounier, C., *et al.* (2021). Blockade of pro-fibrotic response mediated by the miR-143/-145 cluster prevents targeted therapy-induced phenotypic plasticity and resistance in melanoma. *bioRxiv*, 2021.2007.2002.450838.
- Diazzi, S., Tartare-Deckert, S., and Deckert, M. (2020). Bad Neighborhood: Fibrotic Stroma as a New Player in Melanoma Resistance to Targeted Therapies. *Cancers* *12*.
- Didier, R., Mallavialle, A., Ben Jouira, R., Domdom, M.A., Tichet, M., Auberger, P., Luciano, F., Ohanna, M., Tartare-Deckert, S., and Deckert, M. (2018). Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Molecular cancer therapeutics* *17*, 1416-1429.
- Dilshat, R., Fock, V., Kenny, C., Gerritsen, I., Lasseur, R.M.J., Travnickova, J., Eichhoff, O.M., Cerny, P., Moller, K., Sigurbjornsdottir, S., *et al.* (2021). MITF reprograms the extracellular matrix and focal adhesion in melanoma. *eLife* *10*.
- Direkze, N.C., Hodivala-Dilke, K., Jeffery, R., Hunt, T., Poulson, R., Oukrif, D., Alison, M.R., and Wright, N.A. (2004). Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer research* *64*, 8492-8495.
- Distler, J.H., Jungel, A., Huber, L.C., Schulze-Horsel, U., Zwerina, J., Gay, R.E., Michel, B.A., Hauser, T., Schett, G., Gay, S., *et al.* (2007). Imatinib mesylate reduces production of extracellular

- matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis and rheumatism* *56*, 311-322.
- Domingues, B., Lopes, J.M., Soares, P., and Populo, H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and therapy* *7*, 35-49.
- Domogatskaya, A., Rodin, S., and Tryggvason, K. (2012). Functional diversity of laminins. *Annual review of cell and developmental biology* *28*, 523-553.
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A., and Pan, D. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* *130*, 1120-1133.
- Doudican, N.A., and Orlow, S.J. (2017). Inhibition of the CRAF/prohibitin interaction reverses CRAF-dependent resistance to vemurafenib. *Oncogene* *36*, 423-428.
- Douglass, A., Wallace, K., Parr, R., Park, J., Durward, E., Broadbent, I., Barelle, C., Porter, A.J., and Wright, M.C. (2008). Antibody-targeted myofibroblast apoptosis reduces fibrosis during sustained liver injury. *Journal of hepatology* *49*, 88-98.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews Cancer* *4*, 11-22.
- Drobits, B., Holcman, M., Amberg, N., Swiecki, M., Grundtner, R., Hammer, M., Colonna, M., and Sibilina, M. (2012). Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *The Journal of clinical investigation* *122*, 575-585.
- Duffy, M.J., and O'Grady, P. (1984). Plasminogen activator and cancer. *European journal of cancer & clinical oncology* *20*, 577-582.
- Dummer, R., Ascierto, P.A., Gogas, H.J., Arance, A., Mandala, M., Liskay, G., Garbe, C., Schadendorf, D., Krajsova, I., Gutzmer, R., *et al.* (2018a). Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* *19*, 603-615.
- Dummer, R., Ascierto, P.A., Gogas, H.J., Arance, A., Mandala, M., Liskay, G., Garbe, C., Schadendorf, D., Krajsova, I., Gutzmer, R., *et al.* (2018b). Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* *19*, 1315-1327.
- Dummer, R., Lebbe, C., Atkinson, V., Mandala, M., Nathan, P.D., Arance, A., Richtig, E., Yamazaki, N., Robert, C., Schadendorf, D., *et al.* (2020). Combined PD-1, BRAF and MEK inhibition in advanced BRAF-mutant melanoma: safety run-in and biomarker cohorts of COMBI-i. *Nature medicine* *26*, 1557-1563.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., *et al.* (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* *474*, 179-183.
- Durand, R.E., and Sutherland, R.M. (1972). Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Experimental cell research* *71*, 75-80.
- Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell and tissue research* *339*, 259-268.
- Durvasula, R.V., and Shankland, S.J. (2005). Mechanical strain increases SPARC levels in podocytes: implications for glomerulosclerosis. *American journal of physiology Renal physiology* *289*, F577-584.
- Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine* *315*, 1650-1659.
- Eberl, D.F., Hardy, R.W., and Kernan, M.J. (2000). Genetically similar transduction mechanisms for touch and hearing in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *20*, 5981-5988.
- Eckes, B., Nischt, R., and Krieg, T. (2010). Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis & tissue repair* *3*, 4.

- Eggermont, A.M., and Kirkwood, J.M. (2004). Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *European journal of cancer* *40*, 1825-1836.
- Eitaki, M., Yamamori, T., Meike, S., Yasui, H., and Inanami, O. (2012). Vincristine enhances amoeboid-like motility via GEF-H1/RhoA/ROCK/Myosin light chain signaling in MKN45 cells. *BMC cancer* *12*, 469.
- Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A.E.M., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalka, A.J., Oria, R., Kechagia, J.Z., Rico-Lastres, P., Le Roux, A.L., *et al.* (2017). Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell* *171*, 1397-1410 e1314.
- Elwood, J.M., and Jopson, J. (1997). Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *International journal of cancer* *73*, 198-203.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* *126*, 677-689.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Nicolau, M., Dornhofer, N., Kong, C., Le, Q.T., Chi, J.T., Jeffrey, S.S., and Giaccia, A.J. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* *440*, 1222-1226.
- Esnault, C., Stewart, A., Gualdrini, F., East, P., Horswell, S., Matthews, N., and Treisman, R. (2014). Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts. *Genes & development* *28*, 943-958.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629-635.
- Evanko, S.P., and Vogel, K.G. (1990). Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix* *10*, 420-436.
- Eyckmans, J., Boudou, T., Yu, X., and Chen, C.S. (2011). A hitchhiker's guide to mechanobiology. *Developmental cell* *21*, 35-47.
- Fallahi-Sichani, M., Becker, V., Izar, B., Baker, G.J., Lin, J.R., Boswell, S.A., Shah, P., Rotem, A., Garraway, L.A., and Sorger, P.K. (2017). Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Molecular systems biology* *13*, 905.
- Falletta, 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.
- Faraci-Orf, E., McFadden, C., and Vogel, W.F. (2006). DDR1 signaling is essential to sustain Stat5 function during lactogenesis. *Journal of cellular biochemistry* *97*, 109-121.
- Fedorenko, I.V., Abel, E.V., Koomen, J.M., Fang, B., Wood, E.R., Chen, Y.A., Fisher, K.J., Iyengar, S., Dahlman, K.B., Wargo, J.A., *et al.* (2016). Fibronectin induction abrogates the BRAF inhibitor response of BRAF V600E/PTEN-null melanoma cells. *Oncogene* *35*, 1225-1235.
- Fedorenko, I.V., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., Messina, J.L., and Smalley, K.S.M. (2015). BRAF Inhibition Generates a Host-Tumor Niche that Mediates Therapeutic Escape. *The Journal of investigative dermatology* *135*, 3115-3124.
- Fenouille, N., Puissant, A., Dufies, M., Robert, G., Jacquet, A., Ohanna, M., Deckert, M., Pasquet, J.M., Mahon, F.X., Cassuto, J.P., *et al.* (2010). Persistent activation of the Fyn/ERK kinase signaling axis mediates imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cells through upregulation of intracellular SPARC. *Cancer research* *70*, 9659-9670.
- Fenouille, N., Puissant, A., Tichet, M., Zimniak, G., Abbe, P., Mallavialle, A., Rocchi, S., Ortonne, J.P., Deckert, M., Ballotti, R., *et al.* (2011). SPARC functions as an anti-stress factor by inactivating p53 through Akt-mediated MDM2 phosphorylation to promote melanoma cell survival. *Oncogene* *30*, 4887-4900.
- Fenouille, N., Tichet, M., Dufies, M., Pottier, A., Mogha, A., Soo, J.K., Rocchi, S., Mallavialle, A., Galibert, M.D., Khammari, A., *et al.* (2012). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory

factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS one* 7, e40378.

Ferguson, J., Smith, M., Zudaire, I., Wellbrock, C., and Arozarena, I. (2017). Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. *Oncotarget* 8, 32946-32959.

Fernandes, J.V., Cobucci, R.N., Jatoba, C.A., Fernandes, T.A., de Azevedo, J.W., and de Araujo, J.M. (2015). The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathology oncology research : POR* 21, 527-534.

Ferrigno, O., Lallemand, F., Verrecchia, F., L'Hoste, S., Camonis, J., Atfi, A., and Mauviel, A. (2002). Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. *Oncogene* 21, 4879-4884.

Fields, G.B. (2015). New strategies for targeting matrix metalloproteinases. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 44-46, 239-246.

Filmus, J., Robles, A.I., Shi, W., Wong, M.J., Colombo, L.L., and Conti, C.J. (1994). Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 9, 3627-3633.

Finch-Edmondson, M.L., Strauss, R.P., Passman, A.M., Sudol, M., Yeoh, G.C., and Callus, B.A. (2015). TAZ Protein Accumulation Is Negatively Regulated by YAP Abundance in Mammalian Cells. *The Journal of biological chemistry* 290, 27928-27938.

Fischbach, C., Chen, R., Matsumoto, T., Schmelzle, T., Brugge, J.S., Polverini, P.J., and Mooney, D.J. (2007). Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nature methods* 4, 855-860.

Fisher, M.L., Grun, D., Adhikary, G., Xu, W., and Eckert, R.L. (2017). Inhibition of YAP function overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma cancer stem cells. *Oncotarget* 8, 110257-110272.

Flach, E.H., Rebecca, V.W., Herlyn, M., Smalley, K.S., and Anderson, A.R. (2011). Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. *Molecular pharmaceutics* 8, 2039-2049.

Flaherty, K.T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L.V., Hassel, J.C., Rutkowski, P., Mohr, P., *et al.* (2012). Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *The New England journal of medicine* 367, 107-114.

Foster, C.T., Gualdrini, F., and Treisman, R. (2017). Mutual dependence of the MRTF-SRF and YAP-TEAD pathways in cancer-associated fibroblasts is indirect and mediated by cytoskeletal dynamics. *Genes & development* 31, 2361-2375.

Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science* 123, 4195-4200.

Frassanito, M.A., Cusmai, A., Iodice, G., and Dammacco, F. (2001). Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* 97, 483-489.

Fridman, R., Giaccone, G., Kanemoto, T., Martin, G.R., Gazdar, A.F., and Mulshine, J.L. (1990). Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 6698-6702.

Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer* 12, 298-306.

Fu, C., and Jiang, A. (2018). Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology* 9, 3059.

Fu, H.L., Valiathan, R.R., Arkwright, R., Sohail, A., Mihai, C., Kumarasiri, M., Mahasenan, K.V., Mobashery, S., Huang, P., Agarwal, G., *et al.* (2013). Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling. *The Journal of biological chemistry* 288, 7430-7437.

Fuchs, E., and Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annual review of biochemistry* 63, 345-382.

- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E.C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R.K., *et al.* (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* *94*, 715-725.
- Furue, M., Ito, T., Wada, N., Wada, M., Kadono, T., and Uchi, H. (2018). Melanoma and Immune Checkpoint Inhibitors. *Current oncology reports* *20*, 29.
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews Immunology* *12*, 253-268.
- Gaggioli, C., Deckert, M., Robert, G., Abbe, P., Batoz, M., Ehrengruber, M.U., Ortonne, J.P., Ballotti, R., and Tartare-Deckert, S. (2005). HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene* *24*, 1423-1433.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., and Sahai, E. (2007a). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nature cell biology* *9*, 1392-1400.
- Gaggioli, C., Robert, G., Bertolotto, C., Bailet, O., Abbe, P., Spadafora, A., Bahadoran, P., Ortonne, J.P., Baron, V., Ballotti, R., *et al.* (2007b). Tumor-derived fibronectin is involved in melanoma cell invasion and regulated by V600E B-Raf signaling pathway. *The Journal of investigative dermatology* *127*, 400-410.
- Gallant-Behm, C.L., Piper, J., Lynch, J.M., Seto, A.G., Hong, S.J., Mustoe, T.A., Maari, C., Pestano, L.A., Dalby, C.M., Jackson, A.L., *et al.* (2019). A MicroRNA-29 Mimic (Reamlarsen) Represses Extracellular Matrix Expression and Fibroplasia in the Skin. *The Journal of investigative dermatology* *139*, 1073-1081.
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Zanetti, R., Masini, C., Boyle, P., and Melchi, C.F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European journal of cancer* *41*, 2040-2059.
- Ganguly, A., Yang, H., Sharma, R., Patel, K.D., and Cabral, F. (2012). The role of microtubules and their dynamics in cell migration. *The Journal of biological chemistry* *287*, 43359-43369.
- Garcia-Cardena, G., Comander, J., Anderson, K.R., Blackman, B.R., and Gimbrone, M.A., Jr. (2001). Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 4478-4485.
- Gascard, P., and Tlsty, T.D. (2016). Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes & development* *30*, 1002-1019.
- Gasparics, A., and Sebe, A. (2018). MRTFs- master regulators of EMT. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* *247*, 396-404.
- Gembarska, A., Luciani, F., Fedele, C., Russell, E.A., Dewaele, M., Villar, S., Zwolinska, A., Haupt, S., de Lange, J., Yip, D., *et al.* (2012). MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nature medicine* *18*, 1239-1247.
- George, E.L., Georges-Labouesse, E.N., Patel-King, R.S., Rayburn, H., and Hynes, R.O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* *119*, 1079-1091.
- Georges, P.C., Hui, J.J., Gombos, Z., McCormick, M.E., Wang, A.Y., Uemura, M., Mick, R., Janmey, P.A., Furth, E.E., and Wells, R.G. (2007). Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* *293*, G1147-1154.
- Gerber, D.E., Camidge, D.R., Morgensztern, D., Cetnar, J., Kelly, R.J., Ramalingam, S.S., Spigel, D.R., Jeong, W., Scaglioni, P.P., Zhang, S., *et al.* (2020). Phase 2 study of the focal adhesion kinase inhibitor defactinib (VS-6063) in previously treated advanced KRAS mutant non-small cell lung cancer. *Lung cancer* *139*, 60-67.
- Gesbert, F., and Larue, L. (2018). [Cutaneous melanoma: from rationalized models to patients care]. *Medicine sciences : M/S* *34*, 407-416.

- Ghosh, S., Ashcraft, K., Jahid, M.J., April, C., Ghajar, C.M., Ruan, J., Wang, H., Foster, M., Hughes, D.C., Ramirez, A.G., *et al.* (2013). Regulation of adipose oestrogen output by mechanical stress. *Nature communications* *4*, 1821.
- Gibney, G.T., Messina, J.L., Fedorenko, I.V., Sondak, V.K., and Smalley, K.S. (2013). Paradoxical oncogenesis--the long-term effects of BRAF inhibition in melanoma. *Nature reviews Clinical oncology* *10*, 390-399.
- Gieni, R.S., and Hendzel, M.J. (2008). Mechanotransduction from the ECM to the genome: are the pieces now in place? *Journal of cellular biochemistry* *104*, 1964-1987.
- Gilkes, D.M., Chaturvedi, P., Bajpai, S., Wong, C.C., Wei, H., Pitcairn, S., Hubbi, M.E., Wirtz, D., and Semenza, G.L. (2013). Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer research* *73*, 3285-3296.
- Gimbrone, M.A., Jr., Topper, J.N., Nagel, T., Anderson, K.R., and Garcia-Cardena, G. (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* *902*, 230-239; discussion 239-240.
- Girard, C.A., Lecacheur, M., Ben Jouira, R., Berestjuk, I., Diazzi, S., Prod'homme, V., Mallavialle, A., Larbret, F., Gesson, M., Schaub, S., *et al.* (2020). A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma. *Cancer research* *80*, 1927-1941.
- Gjerdrum, C., Tiron, C., Hoiby, T., Stefansson, I., Haugen, H., Sandal, T., Collett, K., Li, S., McCormack, E., Gjertsen, B.T., *et al.* (2010). Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 1124-1129.
- Gorantla, V.C., and Kirkwood, J.M. (2014). State of melanoma: an historic overview of a field in transition. *Hematology/oncology clinics of North America* *28*, 415-435.
- Graham, D.M., and BurrIDGE, K. (2016). Mechanotransduction and nuclear function. *Current opinion in cell biology* *40*, 98-105.
- Granot, Z., Henke, E., Comen, E.A., King, T.A., Norton, L., and Benezra, R. (2011). Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer cell* *20*, 300-314.
- Grasset, E.M., Bertero, T., Bozec, A., Friard, J., Bourget, I., Pisano, S., Lecacheur, M., Maiel, M., Bailleux, C., Emelyanov, A., *et al.* (2018). Matrix Stiffening and EGFR Cooperate to Promote the Collective Invasion of Cancer Cells. *Cancer research* *78*, 5229-5242.
- Gribova, V., Crouzier, T., and Picart, C. (2011). A material's point of view on recent developments of polymeric biomaterials: control of mechanical and biochemical properties. *Journal of materials chemistry* *21*, 14354-14366.
- Grieve, S., Wajnberg, G., Lees, M., Chacko, S., Weir, J., Crapoulet, N., and Reiman, T. (2019). TAZ functions as a tumor suppressor in multiple myeloma by downregulating MYC. *Blood advances* *3*, 3613-3625.
- Grill, C., and Larue, L. (2016). NRAS, NRAS, Which Mutation Is Fairest of Them All? *The Journal of investigative dermatology* *136*, 1936-1938.
- Griss, J., Bauer, W., Wagner, C., Simon, M., Chen, M., Grabmeier-Pfistershammer, K., Maurer-Granofszky, M., Roka, F., Penz, T., Bock, C., *et al.* (2019). B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma. *Nature communications* *10*, 4186.
- Grither, W.R., and Longmore, G.D. (2018). Inhibition of tumor-microenvironment interaction and tumor invasion by small-molecule allosteric inhibitor of DDR2 extracellular domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *115*, E7786-E7794.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* *140*, 883-899.

- Gross, O., Beirowski, B., Harvey, S.J., McFadden, C., Chen, D., Tam, S., Thorner, P.S., Smyth, N., Addicks, K., Bloch, W., *et al.* (2004). DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. *Kidney international* *66*, 102-111.
- Grunwald, B.T., Devisme, A., Andrieux, G., Vyas, F., Aliar, K., McCloskey, C.W., Macklin, A., Jang, G.H., Denroche, R., Romero, J.M., *et al.* (2021). Spatially confined sub-tumor microenvironments in pancreatic cancer. *Cell*.
- Gruosso, T., Garnier, C., Abelanet, S., Kieffer, Y., Lemesre, V., Bellanger, D., Bieche, I., Marangoni, E., Sastre-Garau, X., Mieulet, V., *et al.* (2015). MAP3K8/TPL-2/COT is a potential predictive marker for MEK inhibitor treatment in high-grade serous ovarian carcinomas. *Nature communications* *6*, 8583.
- Grzywa, T.M., Paskal, W., and Wlodarski, P.K. (2017). Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Translational oncology* *10*, 956-975.
- Guilluy, C., Osborne, L.D., Van Landeghem, L., Sharek, L., Superfine, R., Garcia-Mata, R., and Burridge, K. (2014). Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nature cell biology* *16*, 376-381.
- Guimberteau, J.C., Delage, J.P., McGrouther, D.A., and Wong, J.K. (2010). The microvacuolar system: how connective tissue sliding works. *The Journal of hand surgery, European volume* *35*, 614-622.
- Guo, T., Lu, Y., Li, P., Yin, M.X., Lv, D., Zhang, W., Wang, H., Zhou, Z., Ji, H., Zhao, Y., *et al.* (2013). A novel partner of Scalloped regulates Hippo signaling via antagonizing Scalloped-Yorkie activity. *Cell research* *23*, 1201-1214.
- Gutzmer, R., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Robert, C., Lewis, K., Protsenko, S., Pereira, R.P., Eigentler, T., Rutkowski, P., Demidov, L., *et al.* (2020). Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAF(V600) mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* *395*, 1835-1844.
- Haage, A., and Schneider, I.C. (2014). Cellular contractility and extracellular matrix stiffness regulate matrix metalloproteinase activity in pancreatic cancer cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *28*, 3589-3599.
- Haas, L., Elewaut, A., Gerard, C.L., Umkehrer, C., Leiendecker, L., Pedersen, M., Krecioch, I., Hoffmann, D., Novatchkova, M., Kuttke, M., *et al.* (2021). Acquired resistance to anti-MAPK targeted therapy confers an immune-evasive tumor microenvironment and cross-resistance to immunotherapy in melanoma. *Nature Cancer* *2*, 693-708.
- Haass, N.K., Beaumont, K.A., Hill, D.S., Anfosso, A., Mrass, P., Munoz, M.A., Kinjyo, I., and Wenginger, W. (2014). Real-time cell cycle imaging during melanoma growth, invasion, and drug response. *Pigment cell & melanoma research* *27*, 764-776.
- Haga, R.B., and Ridley, A.J. (2016). Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* *7*, 207-221.
- Halper, J., and Kjaer, M. (2014). Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Advances in experimental medicine and biology* *802*, 31-47.
- Hamm, M., Sohler, P., Petit, V., Raymond, J.H., Delmas, V., Le Coz, M., Gesbert, F., Kenny, C., Aktary, Z., Pouteaux, M., *et al.* (2021). BRN2 is a non-canonical melanoma tumor-suppressor. *Nature communications* *12*, 3707.
- Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* *21*, 309-322.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Hantschel, O., Rix, U., and Superti-Furga, G. (2008). Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leukemia & lymphoma* *49*, 615-619.

- Hao, Y., Chun, A., Cheung, K., Rashidi, B., and Yang, X. (2008). Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *The Journal of biological chemistry* *283*, 5496-5509.
- Hapach, L.A., VanderBurgh, J.A., Miller, J.P., and Reinhart-King, C.A. (2015). Manipulation of in vitro collagen matrix architecture for scaffolds of improved physiological relevance. *Physical biology* *12*, 061002.
- Haq, R., Yokoyama, S., Hawryluk, E.B., Jonsson, G.B., Frederick, D.T., McHenry, K., Porter, D., Tran, T.N., Love, K.T., Langer, R., *et al.* (2013). BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 4321-4326.
- Hartman, M.A., and Spudich, J.A. (2012). The myosin superfamily at a glance. *Journal of cell science* *125*, 1627-1632.
- Hartmann, T.N., Burger, J.A., Glodek, A., Fujii, N., and Burger, M. (2005). CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* *24*, 4462-4471.
- Harvey, K.F., Zhang, X., and Thomas, D.M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nature reviews Cancer* *13*, 246-257.
- Hauschild, A., Grob, J.J., Demidov, L.V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Miller, W.H., Jr., Kaempgen, E., *et al.* (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* *380*, 358-365.
- Hayashi, K., Watanabe, B., Nakagawa, Y., Minami, S., and Morita, T. (2014). RPEL proteins are the molecular targets for CCG-1423, an inhibitor of Rho signaling. *PloS one* *9*, e89016.
- Heck, J.N., Ponik, S.M., Garcia-Mendoza, M.G., Pehlke, C.A., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., and Keely, P.J. (2012). Microtubules regulate GEF-H1 in response to extracellular matrix stiffness. *Molecular biology of the cell* *23*, 2583-2592.
- Hersey, P., Sosman, J., O'Day, S., Richards, J., Bedikian, A., Gonzalez, R., Sharfman, W., Weber, R., Logan, T., Buzoianu, M., *et al.* (2010). A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin alpha(v)beta(3), + or - dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. *Cancer* *116*, 1526-1534.
- Hilman, D., and Gat, U. (2011). The evolutionary history of YAP and the hippo/YAP pathway. *Molecular biology and evolution* *28*, 2403-2417.
- Hilton, H.N., Stanford, P.M., Harris, J., Oakes, S.R., Kaplan, W., Daly, R.J., and Ormandy, C.J. (2008). KIBRA interacts with discoidin domain receptor 1 to modulate collagen-induced signalling. *Biochimica et biophysica acta* *1783*, 383-393.
- Hinz, B., Gabbiani, G., and Chaponnier, C. (2002). The NH2-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *The Journal of cell biology* *157*, 657-663.
- Hirata, E., Girotti, M.R., Viros, A., Hooper, S., Spencer-Dene, B., Matsuda, M., Larkin, J., Marais, R., and Sahai, E. (2015). Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer cell* *27*, 574-588.
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., *et al.* (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* *363*, 711-723.
- Hodkinson, P.S., Elliott, T., Wong, W.S., Rintoul, R.C., Mackinnon, A.C., Haslett, C., and Sethi, T. (2006). ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through beta1 integrin-dependent activation of PI3-kinase. *Cell death and differentiation* *13*, 1776-1788.
- 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.

- Hoek, K.S., Schlegel, N.C., Brafford, P., Sucker, A., Ugurel, S., Kumar, R., Weber, B.L., Nathanson, K.L., Phillips, D.J., Herlyn, M., *et al.* (2006). Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment cell research* *19*, 290-302.
- Holme, R.H., and Steel, K.P. (2001). Hair cell function - it's all a matter of organization. *Trends in molecular medicine* *7*, 138.
- Hong, W., and Guan, K.L. (2012). The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Seminars in cell & developmental biology* *23*, 785-793.
- Hossain, Z., Ali, S.M., Ko, H.L., Xu, J., Ng, C.P., Guo, K., Qi, Z., Ponniah, S., Hong, W., and Hunziker, W. (2007). Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of *Wwtr1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 1631-1636.
- Houghton, A.M., Quintero, P.A., Perkins, D.L., Kobayashi, D.K., Kelley, D.G., Marconcini, L.A., Mecham, R.P., Senior, R.M., and Shapiro, S.D. (2006). Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *The Journal of clinical investigation* *116*, 753-759.
- Hsieh, C.S., Lee, H.M., and Lio, C.W. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature reviews Immunology* *12*, 157-167.
- Huang, B., Pan, P.Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., and Chen, S.H. (2006). Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research* *66*, 1123-1131.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* *122*, 421-434.
- Huber, V., Vallacchi, V., Fleming, V., Hu, X., Cova, A., Dugo, M., Shahaj, E., Sulsenti, R., Vergani, E., Filipazzi, P., *et al.* (2018). Tumor-derived microRNAs induce myeloid suppressor cells and predict immunotherapy resistance in melanoma. *The Journal of clinical investigation* *128*, 5505-5516.
- Huggett, M.T., Jermyn, M., Gillams, A., Illing, R., Mosse, S., Novelli, M., Kent, E., Bown, S.G., Hasan, T., Pogue, B.W., *et al.* (2014). Phase I/II study of verteporfin photodynamic therapy in locally advanced pancreatic cancer. *British journal of cancer* *110*, 1698-1704.
- Hugo, W., Shi, H., Sun, L., Piva, M., Song, C., Kong, X., Moriceau, G., Hong, A., Dahlman, K.B., Johnson, D.B., *et al.* (2015). Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell* *162*, 1271-1285.
- Hugo, W., Zaretsky, J.M., Sun, L., Song, C., Moreno, B.H., Hu-Lieskovan, S., Berent-Maoz, B., Pang, J., Chmielowski, B., Cherry, G., *et al.* (2016). Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* *165*, 35-44.
- Hui, L., Zhang, J., Ding, X., Guo, X., and Jiang, X. (2017). Matrix stiffness regulates the proliferation, stemness and chemoresistance of laryngeal squamous cancer cells. *International journal of oncology* *50*, 1439-1447.
- Humphrey, J.D., Dufresne, E.R., and Schwartz, M.A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology* *15*, 802-812.
- Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. (2006). Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science* *119*, 3901-3903.
- Humphries, M.J., Olden, K., and Yamada, K.M. (1986). A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* *233*, 467-470.
- Hynes, R.O. (1990). *Fibronectins* (New York: Springer-Verlag).
- Ihalainen, T.O., Aires, L., Herzog, F.A., Schwartlander, R., Moeller, J., and Vogel, V. (2015). Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. *Nature materials* *14*, 1252-1261.
- Ikeda, K., Wang, L.H., Torres, R., Zhao, H., Olaso, E., Eng, F.J., Labrador, P., Klein, R., Lovett, D., Yancopoulos, G.D., *et al.* (2002). Discoidin domain receptor 2 interacts with Src and Shc following its activation by type I collagen. *The Journal of biological chemistry* *277*, 19206-19212.

INCA, Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 volume 1 : tumeurs solides.

Infante, J.R., Camidge, D.R., Mileskin, L.R., Chen, E.X., Hicks, R.J., Rischin, D., Fingert, H., Pierce, K.J., Xu, H., Roberts, W.G., *et al.* (2012). Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic phase I dose-escalation trial of PF-00562271, an inhibitor of focal adhesion kinase, in advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *30*, 1527-1533.

Ingallina, E., Sorrentino, G., Bertolio, R., Lisek, K., Zannini, A., Azzolin, L., Severino, L.U., Scaini, D., Mano, M., Mantovani, F., *et al.* (2018). Mechanical cues control mutant p53 stability through a mevalonate-RhoA axis. *Nature cell biology* *20*, 28-35.

Iozzo, R.V. (2000). *Proteoglycans : structure, biology, and molecular interactions* (New York: Marcel Dekker).

Iozzo, R.V., and Sanderson, R.D. (2011). Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine* *15*, 1013-1031.

Ishikawa, T., Wondimu, Z., Oikawa, Y., Gentilcore, G., Kiessling, R., Egyhazi Brage, S., Hansson, J., and Patarroyo, M. (2014). Laminins 411 and 421 differentially promote tumor cell migration via alpha6beta1 integrin and MCAM (CD146). *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* *38*, 69-83.

Ishiwata, T., Matsuda, Y., and Naito, Z. (2011). Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World journal of gastroenterology* *17*, 409-418.

Ito, T., Yang, M., Wang, Y.H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.F., Liu, Y.J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *The Journal of experimental medicine* *204*, 105-115.

Iwai, L.K., Payne, L.S., Luczynski, M.T., Chang, F., Xu, H., Clinton, R.W., Paul, A., Esposito, E.A., Gridley, S., Leitinger, B., *et al.* (2013). Phosphoproteomics of collagen receptor networks reveals SHP-2 phosphorylation downstream of wild-type DDR2 and its lung cancer mutants. *The Biochemical journal* *454*, 501-513.

Iyer, K.V., Pulford, S., Mogilner, A., and Shivashankar, G.V. (2012). Mechanical activation of cells induces chromatin remodeling preceding MKL nuclear transport. *Biophysical journal* *103*, 1416-1428.

Izbicki, G., Segel, M.J., Christensen, T.G., Conner, M.W., and Breuer, R. (2002). Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *International journal of experimental pathology* *83*, 111-119.

Jacobetz, M.A., Chan, D.S., Neesse, A., Bapiro, T.E., Cook, N., Frese, K.K., Feig, C., Nakagawa, T., Caldwell, M.E., Zecchini, H.I., *et al.* (2013). Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* *62*, 112-120.

Jahed, Z., and Mofrad, M.R. (2019). The nucleus feels the force, LINCed in or not! Current opinion in cell biology *58*, 114-119.

Janostiak, R., Malvi, P., and Wajapeyee, N. (2019). Anaplastic Lymphoma Kinase Confers Resistance to BRAF Kinase Inhibitors in Melanoma. *iScience* *16*, 453-467.

Javelaud, D., Alexaki, V.I., and Mauviel, A. (2008). Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma. *Pigment cell & melanoma research* *21*, 123-132.

Jeitany, M., Leroy, C., Tosti, P., Lafitte, M., Le Guet, J., Simon, V., Bonenfant, D., Robert, B., Grillet, F., Mollevi, C., *et al.* (2018). Inhibition of DDR1-BCR signalling by nilotinib as a new therapeutic strategy for metastatic colorectal cancer. *EMBO molecular medicine* *10*.

Jenkins, R.W., Barbie, D.A., and Flaherty, K.T. (2018). Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *British journal of cancer* *118*, 9-16.

Jia, J., Zhang, W., Wang, B., Trinko, R., and Jiang, J. (2003). The Drosophila Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes & development* *17*, 2514-2519.

- Jiang, H., Hegde, S., and DeNardo, D.G. (2017). Tumor-associated fibrosis as a regulator of tumor immunity and response to immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII *66*, 1037-1048.
- Jiang, H., Hegde, S., Knolhoff, B.L., Zhu, Y., Herndon, J.M., Meyer, M.A., Nywening, T.M., Hawkins, W.G., Shapiro, I.M., Weaver, D.T., *et al.* (2016). Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nature medicine* *22*, 851-860.
- Jiao, S., Wang, H., Shi, Z., Dong, A., Zhang, W., Song, X., He, F., Wang, Y., Zhang, Z., Wang, W., *et al.* (2014). A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer. *Cancer cell* *25*, 166-180.
- Jin, Y., and Blikslager, A.T. (2020). The Regulation of Intestinal Mucosal Barrier by Myosin Light Chain Kinase/Rho Kinases. *International journal of molecular sciences* *21*.
- Jiu, Y., Peranen, J., Schaible, N., Cheng, F., Eriksson, J.E., Krishnan, R., and Lappalainen, P. (2017). Vimentin intermediate filaments control actin stress fiber assembly through GEF-H1 and RhoA. *Journal of cell science* *130*, 892-902.
- 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, L.A., Rodansky, E.S., Haak, A.J., Larsen, S.D., Neubig, R.R., and Higgins, P.D. (2014). Novel Rho/MRTF/SRF inhibitors block matrix-stiffness and TGF-beta-induced fibrogenesis in human colonic myofibroblasts. *Inflammatory bowel diseases* *20*, 154-165.
- Johnson, R., and Halder, G. (2014). The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nature reviews Drug discovery* *13*, 63-79.
- Joyce, J.A. (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer cell* *7*, 513-520.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews Cancer* *9*, 239-252.
- Joyce, M.H., Lu, C., James, E.R., Hegab, R., Allen, S.C., Suggs, L.J., and Brock, A. (2018). Phenotypic Basis for Matrix Stiffness-Dependent Chemoresistance of Breast Cancer Cells to Doxorubicin. *Frontiers in oncology* *8*, 337.
- Juin, A., Di Martino, J., Leitinger, B., Henriot, E., Gary, A.S., Paysan, L., Bomo, J., Baffet, G., Gauthier-Rouviere, C., Rosenbaum, J., *et al.* (2014). Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42-Tuba pathway. *The Journal of cell biology* *207*, 517-533.
- Jun, J.I., and Lau, L.F. (2011). Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nature reviews Drug discovery* *10*, 945-963.
- Juric, V., Chen, C.C., and Lau, L.F. (2009). Fas-mediated apoptosis is regulated by the extracellular matrix protein CCN1 (CYR61) in vitro and in vivo. *Molecular and cellular biology* *29*, 3266-3279.
- Kakadia, S., Yarlagadda, N., Awad, R., Kundranda, M., Niu, J., Naraev, B., Mina, L., Dragovich, T., Gimbel, M., and Mahmoud, F. (2018). Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *OncoTargets and therapy* *11*, 7095-7107.
- Kalbasi, A., and Ribas, A. (2020). Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nature reviews Immunology* *20*, 25-39.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer* *16*, 582-598.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer* *6*, 392-401.
- Kamai, T., Yamanishi, T., Shirataki, H., Takagi, K., Asami, H., Ito, Y., and Yoshida, K. (2004). Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *10*, 4799-4805.

- Kanai, F., Marignani, P.A., Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R.A., Donowitz, M., Hisaminato, A., Fujiwara, T., Ito, Y., Cantley, L.C., *et al.* (2000). TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *The EMBO journal* *19*, 6778-6791.
- Kannan, K., Sharpless, N.E., Xu, J., O'Hagan, R.C., Bosenberg, M., and Chin, L. (2003). Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 1221-1225.
- Kappelmann, M., Bosserhoff, A., and Kuphal, S. (2014). AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma. *European journal of cell biology* *93*, 76-81.
- Karakashev, S.V., and Reginato, M.J. (2015). Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy. *Cancer management and research* *7*, 253-264.
- Karantza, V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* *30*, 127-138.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* *449*, 557-563.
- Kaupilla, S., Stenback, F., Risteli, J., Jukkola, A., and Risteli, L. (1998). Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *The Journal of pathology* *186*, 262-268.
- Kaur, A., Ecker, B.L., Douglass, S.M., Kugel, C.H., 3rd, Webster, M.R., Almeida, F.V., Somasundaram, R., Hayden, J., Ban, E., Ahmadzadeh, H., *et al.* (2019). Remodeling of the Collagen Matrix in Aging Skin Promotes Melanoma Metastasis and Affects Immune Cell Motility. *Cancer discovery* *9*, 64-81.
- Kaur, A., Webster, M.R., Marchbank, K., Behera, R., Ndoye, A., Kugel, C.H., 3rd, Dang, V.M., Appleton, J., O'Connell, M.P., Cheng, P., *et al.* (2016). sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. *Nature* *532*, 250-254.
- Kavallaris, M. (2010). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature reviews Cancer* *10*, 194-204.
- Kehrl, J.H., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., Jakowlew, S., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986a). Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *Journal of immunology* *137*, 3855-3860.
- Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986b). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *The Journal of experimental medicine* *163*, 1037-1050.
- Keilholz, U., Mehnert, J.M., Bauer, S., Bourgeois, H., Patel, M.R., Gravenor, D., Nemunaitis, J.J., Taylor, M.H., Wyrwicz, L., Lee, K.W., *et al.* (2019). Avelumab in patients with previously treated metastatic melanoma: phase 1b results from the JAVELIN Solid Tumor trial. *Journal for immunotherapy of cancer* *7*, 12.
- Keiser, H.R., and Sjoerdsma, A. (1967). Studies on beta-aminopropionitrile in patients with scleroderma. *Clinical pharmacology and therapeutics* *8*, 593-602.
- Khalili, J.S., Liu, S., Rodriguez-Cruz, T.G., Whittington, M., Wardell, S., Liu, C., Zhang, M., Cooper, Z.A., Frederick, D.T., Li, Y., *et al.* (2012). Oncogenic BRAF(V600E) promotes stromal cell-mediated immunosuppression via induction of interleukin-1 in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *18*, 5329-5340.
- Khavari, T.A., and Rinn, J. (2007). Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia. *Cell cycle* *6*, 2928-2931.
- Kim, A., Yang, Y., Lee, M.S., Yoo, Y.D., Lee, H.G., and Lim, J.S. (2008). NDRG2 gene expression in B16F10 melanoma cells restrains melanogenesis via inhibition of Mitf expression. *Pigment cell & melanoma research* *21*, 653-664.

- Kim, H.G., Hwang, S.Y., Aaronson, S.A., Mandinova, A., and Lee, S.W. (2011). DDR1 receptor tyrosine kinase promotes prosurvival pathway through Notch1 activation. *The Journal of biological chemistry* *286*, 17672-17681.
- Kim, J., Yang, C., Kim, E.J., Jang, J., Kim, S.J., Kang, S.M., Kim, M.G., Jung, H., Park, D., and Kim, C. (2016a). Vimentin filaments regulate integrin-ligand interactions by binding to the cytoplasmic tail of integrin beta3. *Journal of cell science* *129*, 2030-2042.
- Kim, M.H., Kim, C.G., Kim, S.K., Shin, S.J., Choe, E.A., Park, S.H., Shin, E.C., and Kim, J. (2018a). YAP-Induced PD-L1 Expression Drives Immune Evasion in BRAFi-Resistant Melanoma. *Cancer immunology research* *6*, 255-266.
- Kim, M.H., Kim, J., Hong, H., Lee, S.H., Lee, J.K., Jung, E., and Kim, J. (2016b). Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. *The EMBO journal* *35*, 462-478.
- Kim, M.K., Jang, J.W., and Bae, S.C. (2018b). DNA binding partners of YAP/TAZ. *BMB reports* *51*, 126-133.
- Kim, T., Hwang, D., Lee, D., Kim, J.H., Kim, S.Y., and Lim, D.S. (2017). MRTF potentiates TEAD-YAP transcriptional activity causing metastasis. *The EMBO journal* *36*, 520-535.
- Kirkpatrick, S.J., Wang, R.K., Duncan, D.D., Kulesz-Martin, M., and Lee, K. (2006). Imaging the mechanical stiffness of skin lesions by in vivo acousto-optical elastography. *Optics express* *14*, 9770-9779.
- Klein, B., Zhang, X.G., Lu, Z.Y., and Bataille, R. (1995). Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* *85*, 863-872.
- Klein, R.M., and Higgins, P.J. (2011). A switch in RND3-RHOA signaling is critical for melanoma cell invasion following mutant-BRAF inhibition. *Molecular cancer* *10*, 114.
- Klein, R.M., Spofford, L.S., Abel, E.V., Ortiz, A., and Aplin, A.E. (2008). B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Molecular biology of the cell* *19*, 498-508.
- Ko, K.S., Arora, P.D., and McCulloch, C.A. (2001). Cadherins mediate intercellular mechanical signaling in fibroblasts by activation of stretch-sensitive calcium-permeable channels. *The Journal of biological chemistry* *276*, 35967-35977.
- Koga, M., Kai, H., Egami, K., Murohara, T., Ikeda, A., Yasuoka, S., Egashira, K., Matsuishi, T., Kai, M., Kataoka, Y., *et al.* (2008). Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. *Biochemical and biophysical research communications* *365*, 279-284.
- Koh, M., Woo, Y., Valiathan, R.R., Jung, H.Y., Park, S.Y., Kim, Y.N., Kim, H.R., Fridman, R., and Moon, A. (2015). Discoidin domain receptor 1 is a novel transcriptional target of ZEB1 in breast epithelial cells undergoing H-Ras-induced epithelial to mesenchymal transition. *International journal of cancer* *136*, E508-520.
- Kong, Y., Si, L., Li, Y., Wu, X., Xu, X., Dai, J., Tang, H., Ma, M., Chi, Z., Sheng, X., *et al.* (2016). Analysis of mTOR Gene Aberrations in Melanoma Patients and Evaluation of Their Sensitivity to PI3K-AKT-mTOR Pathway Inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *22*, 1018-1027.
- 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.
- Koo, D.H., McFadden, C., Huang, Y., Abdulhussein, R., Friese-Hamim, M., and Vogel, W.F. (2006). Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1. *FEBS letters* *580*, 15-22.
- Koo, J.H., and Guan, K.L. (2018). Interplay between YAP/TAZ and Metabolism. *Cell metabolism* *28*, 196-206.

- Koontongkaew, S. (2013). The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Cancer* *4*, 66-83.
- Kozar, I., Margue, C., Rothengatter, S., Haan, C., and Kreis, S. (2019). Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochimica et biophysica acta Reviews on cancer* *1871*, 313-322.
- 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.
- Kumari, N., Dwarakanath, B.S., Das, A., and Bhatt, A.N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* *37*, 11553-11572.
- Kung, C., Martinac, B., and Sukharev, S. (2010). Mechanosensitive channels in microbes. *Annual review of microbiology* *64*, 313-329.
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., and Gabrilovich, D.I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *Journal of immunology* *172*, 989-999.
- Kwok, J.C., Dick, G., Wang, D., and Fawcett, J.W. (2011). Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Developmental neurobiology* *71*, 1073-1089.
- Kyriakides, T.R., and Bornstein, P. (2003). Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thrombosis and haemostasis* *90*, 986-992.
- Labrador, J.P., Azcoitia, V., Tuckermann, J., Lin, C., Olaso, E., Manes, S., Bruckner, K., Goergen, J.L., Lemke, G., Yancopoulos, G., *et al.* (2001). The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism. *EMBO reports* *2*, 446-452.
- Labrousse, A.L., Ntayi, C., Hornebeck, W., and Bernard, P. (2004). Stromal reaction in cutaneous melanoma. *Critical reviews in oncology/hematology* *49*, 269-275.
- Ladoux, B., and Mege, R.M. (2017). Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nature reviews Molecular cell biology* *18*, 743-757.
- Lai, D., Ho, K.C., Hao, Y., and Yang, X. (2011). Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer research* *71*, 2728-2738.
- Lam, R.H., Weng, S., Lu, W., and Fu, J. (2012). Live-cell subcellular measurement of cell stiffness using a microengineered stretchable micropost array membrane. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* *4*, 1289-1298.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology* *15*, 178-196.
- Lampi, M.C., and Reinhart-King, C.A. (2018). Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials. *Science translational medicine* *10*.
- Larkin, J., Ascierto, P.A., Dreno, B., Atkinson, V., Liskay, G., Maio, M., Mandala, M., Demidov, L., Stroyakovskiy, D., Thomas, L., *et al.* (2014). Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *The New England journal of medicine* *371*, 1867-1876.
- Laugier, F., Finet-Benyair, A., Andre, J., Rachakonda, P.S., Kumar, R., Bensussan, A., and Dumaz, N. (2015). RICTOR involvement in the PI3K/AKT pathway regulation in melanocytes and melanoma. *Oncotarget* *6*, 28120-28131.
- Laurent, T.C., and Fraser, J.R. (1992). Hyaluronan. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *6*, 2397-2404.
- LeBlanc, L., Ramirez, N., and Kim, J. (2021). Context-dependent roles of YAP/TAZ in stem cell fates and cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *78*, 4201-4219.

- Lecacheur, M., Girard, C.A., Deckert, M., and Tartare-Deckert, S. (2020). [Melanoma therapeutic escape: the biomechanical track]. *Medecine sciences : M/S* *36*, 961-965.
- Lee, E.Y., Parry, G., and Bissell, M.J. (1984). Modulation of secreted proteins of mouse mammary epithelial cells by the collagenous substrata. *The Journal of cell biology* *98*, 146-155.
- Lee, J.E., Kang, C.S., Guan, X.Y., Kim, B.T., Kim, S.H., Lee, Y.M., Moon, W.S., and Kim, D.K. (2007). Discoidin domain receptor 2 is involved in the activation of bone marrow-derived dendritic cells caused by type I collagen. *Biochemical and biophysical research communications* *352*, 244-250.
- Lee, J.H., Shklovskaya, E., Lim, S.Y., Carlino, M.S., Menzies, A.M., Stewart, A., Pedersen, B., Irvine, M., Alavi, S., Yang, J.Y.H., *et al.* (2020). Transcriptional downregulation of MHC class I and melanoma de- differentiation in resistance to PD-1 inhibition. *Nature communications* *11*, 1897.
- Lehoux, S., and Tedgui, A. (2004). [Shear and signal transduction in the endothelial cell]. *Medecine sciences : M/S* *20*, 551-556.
- Leight, J.L., Drain, A.P., and Weaver, V.M. (2017). Extracellular Matrix Remodeling and Stiffening Modulate Tumor Phenotype and Treatment Response. *Annual Review of Cancer Biology* *1*, 313-334.
- Leight, J.L., Tokuda, E.Y., Jones, C.E., Lin, A.J., and Anseth, K.S. (2015). Multifunctional bioscaffolds for 3D culture of melanoma cells reveal increased MMP activity and migration with BRAF kinase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, 5366-5371.
- Leight, J.L., Wozniak, M.A., Chen, S., Lynch, M.L., and Chen, C.S. (2012). Matrix rigidity regulates a switch between TGF-beta1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Molecular biology of the cell* *23*, 781-791.
- Leitinger, B. (2014). Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *International review of cell and molecular biology* *310*, 39-87.
- Leitinger, B., and Kwan, A.P. (2006). The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* *25*, 355-364.
- Lenselink, E.A. (2015). Role of fibronectin in normal wound healing. *International wound journal* *12*, 313-316.
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., *et al.* (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* *139*, 891-906.
- Li, H., Li, Q., Dang, K., Ma, S., Cotton, J.L., Yang, S., Zhu, L.J., Deng, A.C., Ip, Y.T., Johnson, R.L., *et al.* (2019a). YAP/TAZ Activation Drives Uveal Melanoma Initiation and Progression. *Cell reports* *29*, 3200-3211 e3204.
- Li, J., Yang, M., Li, P., Su, Z., Gao, P., and Zhang, J. (2014). Idiopathic pulmonary fibrosis will increase the risk of lung cancer. *Chinese medical journal* *127*, 3142-3149.
- Li, M., Li, M., Yin, T., Shi, H., Wen, Y., Zhang, B., Chen, M., Xu, G., Ren, K., and Wei, Y. (2016). Targeting of cancer-associated fibroblasts enhances the efficacy of cancer chemotherapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular medicine reports* *13*, 2476-2484.
- Li, S., Wu, J., Zhu, S., Liu, Y.J., and Chen, J. (2017). Disease-Associated Plasmacytoid Dendritic Cells. *Frontiers in immunology* *8*, 1268.
- Li, Y., Fanous, M.J., Kilian, K.A., and Popescu, G. (2019b). Quantitative phase imaging reveals matrix stiffness-dependent growth and migration of cancer cells. *Scientific reports* *9*, 248.
- Li, Y., Lu, X., Ren, X., and Ding, K. (2015). Small molecule discoidin domain receptor kinase inhibitors and potential medical applications. *Journal of medicinal chemistry* *58*, 3287-3301.
- Liao, X.H., Wang, N., Liu, L.Y., Zheng, L., Xing, W.J., Zhao, D.W., Sun, X.G., Hu, P., Dong, J., and Zhang, T.C. (2014). MRTF-A and STAT3 synergistically promote breast cancer cell migration. *Cellular signalling* *26*, 2370-2380.

- Lim, S.T., Chen, X.L., Lim, Y., Hanson, D.A., Vo, T.T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S.J., Schlaepfer, D.D., and Ilic, D. (2008). Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Molecular cell* *29*, 9-22.
- Lin, C.C., Yang, W.H., Lin, Y.T., Tang, X., Chen, P.H., Ding, C.C., Qu, D.C., Alvarez, J.V., and Chi, J.T. (2021). DDR2 upregulation confers ferroptosis susceptibility of recurrent breast tumors through the Hippo pathway. *Oncogene*.
- Lin, C.H., Pelissier, F.A., Zhang, H., Lakins, J., Weaver, V.M., Park, C., and LaBarge, M.A. (2015a). Microenvironment rigidity modulates responses to the HER2 receptor tyrosine kinase inhibitor lapatinib via YAP and TAZ transcription factors. *Molecular biology of the cell* *26*, 3946-3953.
- Lin, E.Y., Li, J.F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D.A., Qian, H., Xue, X.N., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer research* *66*, 11238-11246.
- Lin, K.L., Chou, C.H., Hsieh, S.C., Hwa, S.Y., Lee, M.T., and Wang, F.F. (2010). Transcriptional upregulation of DDR2 by ATF4 facilitates osteoblastic differentiation through p38 MAPK-mediated Runx2 activation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *25*, 2489-2503.
- Lin, L., Sabnis, A.J., Chan, E., Olivas, V., Cade, L., Pazarentzos, E., Asthana, S., Neel, D., Yan, J.J., Lu, X., *et al.* (2015b). The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies. *Nature genetics* *47*, 250-256.
- Lin, W.M., and Fisher, D.E. (2017). Signaling and Immune Regulation in Melanoma Development and Responses to Therapy. *Annual review of pathology* *12*, 75-102.
- Lionarons, D.A., Hancock, D.C., Rana, S., East, P., Moore, C., Murillo, M.M., Carvalho, J., Spencer-Dene, B., Herbert, E., Stamp, G., *et al.* (2019). RAC1(P29S) Induces a Mesenchymal Phenotypic Switch via Serum Response Factor to Promote Melanoma Development and Therapy Resistance. *Cancer cell* *36*, 68-83 e69.
- Liu-Chittenden, Y., Huang, B., Shim, J.S., Chen, Q., Lee, S.J., Anders, R.A., Liu, J.O., and Pan, D. (2012). Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes & development* *26*, 1300-1305.
- Liu, C.Y., Zha, Z.Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., Li, T., Chan, S.W., Lim, C.J., Hong, W., *et al.* (2010). The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF^β-TrCP E3 ligase. *The Journal of biological chemistry* *285*, 37159-37169.
- 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., Lagares, D., Choi, K.M., Stopfer, L., Marinkovic, A., Vrbanc, V., Probst, C.K., Hiemer, S.E., Sisson, T.H., Horowitz, J.C., *et al.* (2015). Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* *308*, L344-357.
- Liu, F., Song, S., Yi, Z., Zhang, M., Li, J., Yang, F., Yin, H., Yu, X., Guan, C., Liu, Y., *et al.* (2017). HGF induces EMT in non-small-cell lung cancer through the hBVR pathway. *European journal of pharmacology* *811*, 180-190.
- Liu, J., and Agarwal, S. (2010). Mechanical signals activate vascular endothelial growth factor receptor-2 to upregulate endothelial cell proliferation during inflammation. *Journal of immunology* *185*, 1215-1221.
- Liu, J., Fukunaga-Kalabis, M., Li, L., and Herlyn, M. (2014a). Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. *Archives of biochemistry and biophysics* *563*, 13-21.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., and Zhao, J.J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews Drug discovery* *8*, 627-644.

- Liu, S.M., Lu, J., Lee, H.C., Chung, F.H., and Ma, N. (2014b). miR-524-5p suppresses the growth of oncogenic BRAF melanoma by targeting BRAF and ERK2. *Oncotarget* *5*, 9444-9459.
- Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., and Bissell, M.J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *The Journal of cell biology* *139*, 1861-1872.
- Loeffler, M., Kruger, J.A., Niethammer, A.G., and Reisfeld, R.A. (2006). Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *The Journal of clinical investigation* *116*, 1955-1962.
- Lokeshwar, V.B., Lopez, L.E., Munoz, D., Chi, A., Shirodkar, S.P., Lokeshwar, S.D., Escudero, D.O., Dhir, N., and Altman, N. (2010). Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells. *Cancer research* *70*, 2613-2623.
- Lombardi, M.L., Jaalouk, D.E., Shanahan, C.M., Burke, B., Roux, K.J., and Lammerding, J. (2011). The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* *286*, 26743-26753.
- Long, G.V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., Grob, J.J., *et al.* (2015). Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* *386*, 444-451.
- Long, J.E., Wongchenko, M.J., Nickles, D., Chung, W.J., Wang, B.E., Riegler, J., Li, J., Li, Q., Sandoval, W., Eastham-Anderson, J., *et al.* (2019). Therapeutic resistance and susceptibility is shaped by cooperative multi-compartment tumor adaptation. *Cell death and differentiation* *26*, 2416-2429.
- Lopez-Novoa, J.M., and Nieto, M.A. (2009). Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO molecular medicine* *1*, 303-314.
- Lu, K.K., Trcka, D., and Bendeck, M.P. (2011). Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* *20*, 71-76.
- Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of cell biology* *196*, 395-406.
- Luduena, R.F. (2013). A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *International review of cell and molecular biology* *302*, 41-185.
- Luke, J.J., Flaherty, K.T., Ribas, A., and Long, G.V. (2017). Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nature reviews Clinical oncology* *14*, 463-482.
- Lynch, J.M., Maillet, M., Vanhoutte, D., Schloemer, A., Sargent, M.A., Blair, N.S., Lynch, K.A., Okada, T., Aronow, B.J., Osinska, H., *et al.* (2012). A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response. *Cell* *149*, 1257-1268.
- Ma, Z., Morris, S.W., Valentine, V., Li, M., Herbrick, J.A., Cui, X., Bouman, D., Li, Y., Mehta, P.K., Nizetic, D., *et al.* (2001). Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nature genetics* *28*, 220-221.
- Maccioni, R.B., and Cambiazo, V. (1995). Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiological reviews* *75*, 835-864.
- Madhunapantula, S.V., Mosca, P.J., and Robertson, G.P. (2011). The Akt signaling pathway: an emerging therapeutic target in malignant melanoma. *Cancer biology & therapy* *12*, 1032-1049.
- Madonna, G., Ullman, C.D., Gentilcore, G., Palmieri, G., and Ascierto, P.A. (2012). NF-kappaB as potential target in the treatment of melanoma. *Journal of translational medicine* *10*, 53.
- Madrid, L.V., Mayo, M.W., Reuther, J.Y., and Baldwin, A.S., Jr. (2001). Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B

kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *The Journal of biological chemistry* *276*, 18934-18940.

Magnon, C. (2013). [Autonomic nerves in cancer: a missing piece of the jigsaw puzzle]. *Medecine sciences : M/S* *29*, 699-701.

Magnon, C. (2020). [How tumors partner with the brain ?]. *Medecine sciences : M/S* *36*, 440-442.

Magnon, C., Hall, S.J., Lin, J., Xue, X., Gerber, L., Freedland, S.J., and Frenette, P.S. (2013). Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science* *341*, 1236361.

Maier, S., Lutz, R., Gelman, L., Sarasa-Renedo, A., Schenk, S., Grashoff, C., and Chiquet, M. (2008). Tenascin-C induction by cyclic strain requires integrin-linked kinase. *Biochimica et biophysica acta* *1783*, 1150-1162.

Majeski, H.E., and Yang, J. (2016). The 2016 John J. Abel Award Lecture: Targeting the Mechanical Microenvironment in Cancer. *Molecular pharmacology* *90*, 744-754.

Makita, R., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Amano, T., Chen, Q., Takeuchi, T., Mitani, A., Nagase, T., Yatomi, Y., Aburatani, H., *et al.* (2008). Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *American journal of physiology Renal physiology* *294*, F542-553.

Mammoto, A., Connor, K.M., Mammoto, T., Yung, C.W., Huh, D., Aderman, C.M., Mostoslavsky, G., Smith, L.E., and Ingber, D.E. (2009). A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis. *Nature* *457*, 1103-1108.

Maniotis, A.J., Chen, C.S., and Ingber, D.E. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 849-854.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* *454*, 436-444.

Margadant, C., and Sonnenberg, A. (2010). Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO reports* *11*, 97-105.

Marin-Bejar, O., Rogiers, A., Dewaele, M., Femel, J., Karras, P., Pozniak, J., Bervoets, G., Van Raemdonck, N., Pedri, D., Swings, T., *et al.* (2021). Evolutionary predictability of genetic versus nongenetic resistance to anticancer drugs in melanoma. *Cancer cell* *39*, 1135-1149 e1138.

Marks, J.G., Miller, J.J., Lookingbill, D.P., and Lookingbill, D.P. (2006). *Lookingbill and Marks' principles of dermatology*, 4th edn (Philadelphia, PA: Saunders Elsevier).

Martiel, J.L., Leal, A., Kurzawa, L., Balland, M., Wang, I., Vignaud, T., Tseng, Q., and They, M. (2015). Measurement of cell traction forces with ImageJ. *Methods in cell biology* *125*, 269-287.

Martin, A.C., Gelbart, M., Fernandez-Gonzalez, R., Kaschube, M., and Wieschaus, E.F. (2010). Integration of contractile forces during tissue invagination. *The Journal of cell biology* *188*, 735-749.

Martini, M., De Santis, M.C., Braccini, L., Gulluni, F., and Hirsch, E. (2014). PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Annals of medicine* *46*, 372-383.

Marusak, C., Thakur, V., Li, Y., Freitas, J.T., Zmina, P.M., Thakur, V.S., Chang, M., Gao, M., Tan, J., Xiao, M., *et al.* (2020). Targeting Extracellular Matrix Remodeling Restores BRAF Inhibitor Sensitivity in BRAFi-resistant Melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *26*, 6039-6050.

Massella, D., Argenziano, M., Ferri, A., Guan, J., Giraud, S., Cavalli, R., Barresi, A.A., and Salaun, F. (2019). Bio-Functional Textiles: Combining Pharmaceutical Nanocarriers with Fibrous Materials for Innovative Dermatological Therapies. *Pharmaceutics* *11*.

Matsuyama, W., Faure, M., and Yoshimura, T. (2003). Activation of discoidin domain receptor 1 facilitates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells through the TNF receptor associated factor 6/TGF-beta-activated protein kinase 1 binding protein 1 beta/p38 alpha mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *Journal of immunology* *171*, 3520-3532.

- Maurer, M., and Lammerding, J. (2019). The Driving Force: Nuclear Mechanotransduction in Cellular Function, Fate, and Disease. *Annual review of biomedical engineering* *21*, 443-468.
- Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology* *30*, 221-241.
- Mayer, E.L., Baurain, J.F., Sparano, J., Strauss, L., Campone, M., Fumoleau, P., Rugo, H., Awada, A., Sy, O., and Llombart-Cussac, A. (2011). A phase 2 trial of dasatinib in patients with advanced HER2-positive and/or hormone receptor-positive breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *17*, 6897-6904.
- McArthur, G.A., Chapman, P.B., Robert, C., Larkin, J., Haanen, J.B., Dummer, R., Ribas, A., Hogg, D., Hamid, O., Ascierto, P.A., *et al.* (2014). Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *The Lancet Oncology* *15*, 323-332.
- McCawley, L.J., and Matrisian, L.M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current opinion in cell biology* *13*, 534-540.
- McCormack, P.L. (2015). Nintedanib: first global approval. *Drugs* *75*, 129-139.
- McGrail, D.J., Kieu, Q.M., and Dawson, M.R. (2014). The malignancy of metastatic ovarian cancer cells is increased on soft matrices through a mechanosensitive Rho-ROCK pathway. *Journal of cell science* *127*, 2621-2626.
- McKeon, F. (1991). Nuclear lamin proteins: domains required for nuclear targeting, assembly, and cell-cycle-regulated dynamics. *Current opinion in cell biology* *3*, 82-86.
- McNeel, D.G., Eickhoff, J., Lee, F.T., King, D.M., Alberti, D., Thomas, J.P., Friedl, A., Kolesar, J., Marnocha, R., Volkman, J., *et al.* (2005). Phase I trial of a monoclonal antibody specific for alphavbeta3 integrin (MEDI-522) in patients with advanced malignancies, including an assessment of effect on tumor perfusion. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *11*, 7851-7860.
- Medjkane, S., Perez-Sanchez, C., Gaggioli, C., Sahai, E., and Treisman, R. (2009). Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nature cell biology* *11*, 257-268.
- Meng, Z., Qiu, Y., Lin, K.C., Kumar, A., Placone, J.K., Fang, C., Wang, K.C., Lu, S., Pan, M., Hong, A.W., *et al.* (2018). RAP2 mediates mechanoresponses of the Hippo pathway. *Nature* *560*, 655-660.
- Mennens, S.F.B., Bolomini-Vittori, M., Weiden, J., Joosten, B., Cambi, A., and van den Dries, K. (2017). Substrate stiffness influences phenotype and function of human antigen-presenting dendritic cells. *Scientific reports* *7*, 17511.
- Menon, D.R., Das, S., Krepler, C., Vultur, A., Rinner, B., Schauer, S., Kashofer, K., Wagner, K., Zhang, G., Rad, E.B., *et al.* (2015). A stress-induced early innate response causes multidrug tolerance in melanoma. *Oncogene* *34*, 4545.
- Menon, S., and Beningo, K.A. (2011). Cancer cell invasion is enhanced by applied mechanical stimulation. *PloS one* *6*, e17277.
- Menzies, A.M., Long, G.V., and Murali, R. (2012). Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. *Drug design, development and therapy* *6*, 391-405.
- Messina, J.L., Yu, H., Riker, A.I., Munster, P.N., Jove, R.L., and Daud, A.I. (2008). Activated stat-3 in melanoma. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* *15*, 196-201.
- Meyaard, L. (2008). The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *Journal of leukocyte biology* *83*, 799-803.
- Meyer zum Gottesberge, A.M., Gross, O., Becker-Lendzian, U., Massing, T., and Vogel, W.F. (2008). Inner ear defects and hearing loss in mice lacking the collagen receptor DDR1. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *88*, 27-37.

- Micallef, L., Vedrenne, N., Billet, F., Coulomb, B., Darby, I.A., and Desmouliere, A. (2012). The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis & tissue repair* 5, S5.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724.
- Miller, A.J., and Mihm, M.C., Jr. (2006). Melanoma. *The New England journal of medicine* 355, 51-65.
- Miller, B.W., Morton, J.P., Pinese, M., Saturno, G., Jamieson, N.B., McGhee, E., Timpson, P., Leach, J., McGarry, L., Shanks, E., *et al.* (2015). Targeting the LOX/hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy. *EMBO molecular medicine* 7, 1063-1076.
- Miller, M.A., Oudin, M.J., Sullivan, R.J., Wang, S.J., Meyer, A.S., Im, H., Frederick, D.T., Tadros, J., Griffith, L.G., Lee, H., *et al.* (2016). Reduced Proteolytic Shedding of Receptor Tyrosine Kinases Is a Post-Translational Mechanism of Kinase Inhibitor Resistance. *Cancer discovery* 6, 382-399.
- Milne, K., Kobel, M., Kalloger, S.E., Barnes, R.O., Gao, D., Gilks, C.B., Watson, P.H., and Nelson, B.H. (2009). Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PloS one* 4, e6412.
- Minagawa, A., Omodaka, T., and Okuyama, R. (2016). Melanomas and Mechanical Stress Points on the Plantar Surface of the Foot. *The New England journal of medicine* 374, 2404-2406.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I., and Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329-342.
- Miroshnikova, Y.A., Jorgens, D.M., Spirio, L., Auer, M., Sarang-Sieminski, A.L., and Weaver, V.M. (2011). Engineering strategies to recapitulate epithelial morphogenesis within synthetic three-dimensional extracellular matrix with tunable mechanical properties. *Physical biology* 8, 026013.
- Misek, S.A., Appleton, K.M., Dexheimer, T.S., Lisabeth, E.M., Lo, R.S., Larsen, S.D., Gallo, K.A., and Neubig, R.R. (2020). Rho-mediated signaling promotes BRAF inhibitor resistance in de-differentiated melanoma cells. *Oncogene* 39, 1466-1483.
- Misek, S.A., Newbury, P.A., Chekalin, E., Paithankar, S., Doseff, A.I., Chen, B., Gallo, K.A., and Neubig, R.R. (2021). Ibrutinib blocks YAP1 activation and reverses BRAFi resistance in melanoma cells. *Molecular pharmacology*.
- Miskolczi, Z., Smith, M.P., Rowling, E.J., Ferguson, J., Barriuso, J., and Wellbrock, C. (2018). Collagen abundance controls melanoma phenotypes through lineage-specific microenvironment sensing. *Oncogene* 37, 3166-3182.
- Misra, S., Ghatak, S., Zoltan-Jones, A., and Toole, B.P. (2003). Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. *The Journal of biological chemistry* 278, 25285-25288.
- Mokalled, M.H., Johnson, A., Kim, Y., Oh, J., and Olson, E.N. (2010). Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development. *Development* 137, 2365-2374.
- Morad, G., Helmink, B.A., Sharma, P., and Wargo, J.A. (2021). Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade. *Cell* 184, 5309-5337.
- Moreno-Bueno, G., Salvador, F., Martin, A., Floristan, A., Cuevas, E.P., Santos, V., Montes, A., Morales, S., Castilla, M.A., Rojo-Sebastian, A., *et al.* (2011). Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas. *EMBO molecular medicine* 3, 528-544.
- Moriceau, G., Hugo, W., Hong, A., Shi, H., Kong, X., Yu, C.C., Koya, R.C., Samatar, A.A., Khanlou, N., Braun, J., *et al.* (2015). Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. *Cancer cell* 27, 240-256.

- Morin-Kensicki, E.M., Boone, B.N., Howell, M., Stonebraker, J.R., Teed, J., Alb, J.G., Magnuson, T.R., O'Neal, W., and Milgram, S.L. (2006). Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. *Molecular and cellular biology* *26*, 77-87.
- Morris, J.C., Tan, A.R., Olencki, T.E., Shapiro, G.I., Dezube, B.J., Reiss, M., Hsu, F.J., Berzofsky, J.A., and Lawrence, D.P. (2014). Phase I Study of GC1008 (Fresolimumab): A Human Anti-Transforming Growth Factor-Beta (TGF β) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Malignant Melanoma or Renal Cell Carcinoma. *PloS one* *9*, e90353.
- Moser, M., Legate, K.R., Zent, R., and Fassler, R. (2009). The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* *324*, 895-899.
- Motzer, R.J., Escudier, B., McDermott, D.F., George, S., Hammers, H.J., Srinivas, S., Tykodi, S.S., Sosman, J.A., Procopio, G., Plimack, E.R., *et al.* (2015). Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* *373*, 1803-1813.
- Mouw, J.K., Ou, G., and Weaver, V.M. (2014a). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature reviews Molecular cell biology* *15*, 771-785.
- Mouw, J.K., Yui, Y., Damiano, L., Bainer, R.O., Lakins, J.N., Acerbi, I., Ou, G., Wijekoon, A.C., Levental, K.R., Gilbert, P.M., *et al.* (2014b). Tissue mechanics modulate microRNA-dependent PTEN expression to regulate malignant progression. *Nature medicine* *20*, 360-367.
- Muehlich, S., Wang, R., Lee, S.M., Lewis, T.C., Dai, C., and Prywes, R. (2008). Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Molecular and cellular biology* *28*, 6302-6313.
- 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.
- Mulhaupt, H.A., Leitinger, B., Gullberg, D., and Couchman, J.R. (2016). Extracellular matrix component signaling in cancer. *Advanced drug delivery reviews* *97*, 28-40.
- Muncie, J.M., and Weaver, V.M. (2018). The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate. *Current topics in developmental biology* *130*, 1-37.
- Muppala, S., Raghunathan, V.K., Jalilian, I., Thomasy, S., and Murphy, C.J. (2019). YAP and TAZ are distinct effectors of corneal myofibroblast transformation. *Experimental eye research* *180*, 102-109.
- Murakami, M., Nakagawa, M., Olson, E.N., and Nakagawa, O. (2005). A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 18034-18039.
- Murphy-Ullrich, J.E., and Sage, E.H. (2014). Revisiting the matricellular concept. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* *37*, 1-14.
- Naba, A., Clauser, K.R., Ding, H., Whittaker, C.A., Carr, S.A., and Hynes, R.O. (2016). The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* *49*, 10-24.
- Nallet-Staub, F., Marsaud, V., Li, L., Gilbert, C., Dodier, S., Bataille, V., Sudol, M., Herlyn, M., and Mauviel, A. (2014). Pro-invasive activity of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma. *The Journal of investigative dermatology* *134*, 123-132.
- 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.
- Neglia, J.P., FitzSimmons, S.C., Maisonneuve, P., Schoni, M.H., Schoni-Affolter, F., Corey, M., and Lowenfels, A.B. (1995). The risk of cancer among patients with cystic fibrosis. *Cystic Fibrosis and Cancer Study Group. The New England journal of medicine* *332*, 494-499.

- Nelson, C.M., Jean, R.P., Tan, J.L., Liu, W.F., Sniadecki, N.J., Spector, A.A., and Chen, C.S. (2005). Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 11594-11599.
- Nelson, M.T., Short, A., Cole, S.L., Gross, A.C., Winter, J., Eubank, T.D., and Lannutti, J.J. (2014). Preferential, enhanced breast cancer cell migration on biomimetic electrospun nanofiber 'cell highways'. *BMC cancer* *14*, 825.
- Nemunaitis, J., Vukelja, S.J., Richards, D., Cunningham, C., Senzer, N., Nugent, J., Duncan, H., Jones, B., Haltom, E., and Uprichard, M.J. (2006). Phase I trial of PT-100 (PT-100), a cytokine-inducing small molecule, following chemotherapy for solid tumor malignancy. *Cancer investigation* *24*, 553-561.
- Ngai, D., Lino, M., Rothenberg, K.E., Simmons, C.A., Fernandez-Gonzalez, R., and Bendeck, M.P. (2020). DDR1 (Discoidin Domain Receptor-1)-RhoA (Ras Homolog Family Member A) Axis Senses Matrix Stiffness to Promote Vascular Calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *40*, 1763-1776.
- Nguyen, T.V., Sleiman, M., Moriarty, T., Herrick, W.G., and Peyton, S.R. (2014). Sorafenib resistance and JNK signaling in carcinoma during extracellular matrix stiffening. *Biomaterials* *35*, 5749-5759.
- Ni, X., Tao, J., Barbi, J., Chen, Q., Park, B.V., Li, Z., Zhang, N., Lebid, A., Ramaswamy, A., Wei, P., *et al.* (2018). YAP Is Essential for Treg-Mediated Suppression of Antitumor Immunity. *Cancer discovery* *8*, 1026-1043.
- Nicolas-Boluda, A., Vaquero, J., Vimeux, L., Guilbert, T., Barrin, S., Kantari-Mimoun, C., Ponzio, M., Renault, G., Deptula, P., Pogoda, K., *et al.* (2021). Tumor stiffening reversion through collagen crosslinking inhibition improves T cell migration and anti-PD-1 treatment. *eLife* *10*.
- Noordeen, N.A., Carafoli, F., Hohenester, E., Horton, M.A., and Leitinger, B. (2006). A transmembrane leucine zipper is required for activation of the dimeric receptor tyrosine kinase DDR1. *The Journal of biological chemistry* *281*, 22744-22751.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* *194*, 23-28.
- Nozawa, H., Chiu, C., and Hanahan, D. (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 12493-12498.
- O'Connor, J.W., Riley, P.N., Nalluri, S.M., Ashar, P.K., and Gomez, E.W. (2015). Matrix Rigidity Mediates TGFbeta1-Induced Epithelial-Myofibroblast Transition by Controlling Cytoskeletal Organization and MRTF-A Localization. *Journal of cellular physiology* *230*, 1829-1839.
- O'Connor, R.S., Hao, X., Shen, K., Bashour, K., Akimova, T., Hancock, W.W., Kam, L.C., and Milone, M.C. (2012). Substrate rigidity regulates human T cell activation and proliferation. *Journal of immunology* *189*, 1330-1339.
- O'Keeffe, M.B., Devlin, A.H., Burns, A.J., Gardiner, T.A., Logan, I.D., Hirst, D.G., and McKeown, S.R. (2008). Investigation of pericytes, hypoxia, and vascularity in bladder tumors: association with clinical outcomes. *Oncology research* *17*, 93-101.
- O'Reilly, S. (2016). MicroRNAs in fibrosis: opportunities and challenges. *Arthritis research & therapy* *18*, 11.
- Obenauf, A.C., Zou, Y., Ji, A.L., Vanharanta, S., Shu, W., Shi, H., Kong, X., Bosenberg, M.C., Wiesner, T., Rosen, N., *et al.* (2015). Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* *520*, 368-372.
- Oh, H., and Irvine, K.D. (2008). In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization. *Development* *135*, 1081-1088.
- Ohlund, D., Handly-Santana, A., Biffi, G., Elyada, E., Almeida, A.S., Ponz-Sarvisé, M., Corbo, V., Oni, T.E., Hearn, S.A., Lee, E.J., *et al.* (2017). Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *The Journal of experimental medicine* *214*, 579-596.

- Olaso, E., Labrador, J.P., Wang, L., Ikeda, K., Eng, F.J., Klein, R., Lovett, D.H., Lin, H.C., and Friedman, S.L. (2002). Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2. *The Journal of biological chemistry* *277*, 3606-3613.
- Olkhanud, P.B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R.E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R.P., and Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells. *Cancer research* *71*, 3505-3515.
- Omholt, K., Krockel, D., Ringborg, U., and Hansson, J. (2006). Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma research* *16*, 197-200.
- Ongusaha, P.P., Kim, J.I., Fang, L., Wong, T.W., Yancopoulos, G.D., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2003). p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop. *The EMBO journal* *22*, 1289-1301.
- Orgaz, J.L., Crosas-Molist, E., Sadok, A., Perdrix-Rosell, A., Maiques, O., Rodriguez-Hernandez, I., Monger, J., Mele, S., Georgouli, M., Bridgeman, V., *et al.* (2020). Myosin II Reactivation and Cytoskeletal Remodeling as a Hallmark and a Vulnerability in Melanoma Therapy Resistance. *Cancer cell* *37*, 85-103 e109.
- Orgaz, J.L., Herraiz, C., and Sanz-Moreno, V. (2014). Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases* *5*, e29019.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* *121*, 335-348.
- Orimo, A., and Weinberg, R.A. (2007). Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. *Cancer biology & therapy* *6*, 618-619.
- Osterreicher, C.H., Penz-Osterreicher, M., Grivennikov, S.I., Guma, M., Koltsova, E.K., Datz, C., Sasik, R., Hardiman, G., Karin, M., and Brenner, D.A. (2011). Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 308-313.
- Overholtzer, M., Zhang, J., Smolen, G.A., Muir, B., Li, W., Sgroi, D.C., Deng, C.X., Brugge, J.S., and Haber, D.A. (2006). Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 12405-12410.
- Owens, L.V., Xu, L., Craven, R.J., Dent, G.A., Weiner, T.M., Kornberg, L., Liu, E.T., and Cance, W.G. (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer research* *55*, 2752-2755.
- Paluncic, J., Kovacevic, Z., Jansson, P.J., Kalinowski, D., Merlot, A.M., Huang, M.L., Lok, H.C., Sahni, S., Lane, D.J., and Richardson, D.R. (2016). Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *Biochimica et biophysica acta* *1863*, 770-784.
- Pan, Z., Tian, Y., Cao, C., and Niu, G. (2019). The Emerging Role of YAP/TAZ in Tumor Immunity. *Molecular cancer research : MCR* *17*, 1777-1786.
- Pancier, T., Azzolin, L., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2017). Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* *18*, 758-770.
- Pancier, T., Citron, A., Di Biagio, D., Battilana, G., Gandin, A., Giulitti, S., Forcato, M., Biciato, S., Panzetta, V., Fusco, S., *et al.* (2020). Reprogramming normal cells into tumour precursors requires ECM stiffness and oncogene-mediated changes of cell mechanical properties. *Nature materials* *19*, 797-806.
- Pandol, S., Edderkaoui, M., Gukovsky, I., Lugea, A., and Gukovskaya, A. (2009). Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* *7*, S44-47.

- Pankov, R., and Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of cell science* *115*, 3861-3863.
- Paraiso, K.H., Xiang, Y., Rebecca, V.W., Abel, E.V., Chen, Y.A., Munko, A.C., Wood, E., Fedorenko, I.V., Sondak, V.K., Anderson, A.R., *et al.* (2011). PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer research* *71*, 2750-2760.
- Parekh, A., Ruppender, N.S., Branch, K.M., Sewell-Loftin, M.K., Lin, J., Boyer, P.D., Candiello, J.E., Merryman, W.D., Guelcher, S.A., and Weaver, A.M. (2011). Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophysical journal* *100*, 573-582.
- Park, D., Sahai, E., and Rullan, A. (2020). SnapShot: Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell* *181*, 486-486 e481.
- Park, S.J., Nakagawa, T., Kitamura, H., Atsumi, T., Kamon, H., Sawa, S., Kamimura, D., Ueda, N., Iwakura, Y., Ishihara, K., *et al.* (2004). IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *Journal of immunology* *173*, 3844-3854.
- Passaniti, A., Brusgard, J.L., Qiao, Y., Sudol, M., and Finch-Edmondson, M. (2017). Roles of RUNX in Hippo Pathway Signaling. *Advances in experimental medicine and biology* *962*, 435-448.
- Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., *et al.* (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer cell* *8*, 241-254.
- Patarroyo, M., Tryggvason, K., and Virtanen, I. (2002). Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Seminars in cancer biology* *12*, 197-207.
- Patel, H., Nilendu, P., Jahagirdar, D., Pal, J.K., and Sharma, N.K. (2018). Modulating secreted components of tumor microenvironment: A masterstroke in tumor therapeutics. *Cancer biology & therapy* *19*, 3-12.
- Patel, N.R., Bole, M., Chen, C., Hardin, C.C., Kho, A.T., Mih, J., Deng, L., Butler, J., Tschumperlin, D., Fredberg, J.J., *et al.* (2012). Cell elasticity determines macrophage function. *PloS one* *7*, e41024.
- Pawlowski, R., Rajakyla, E.K., Vartiainen, M.K., and Treisman, R. (2010). An actin-regulated importin alpha/beta-dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *The EMBO journal* *29*, 3448-3458.
- Pedri, D., Karras, P., Landeloos, E., Marine, J.C., and Rambow, F. (2021). Epithelial-to-mesenchymal-like transition events in melanoma. *The FEBS journal*.
- Pelham, R.J., Jr., and Wang, Y. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 13661-13665.
- Pelon, F., Bourachot, B., Kieffer, Y., Magagna, I., Mermet-Meillon, F., Bonnet, I., Costa, A., Givel, A.M., Attieh, Y., Barbazan, J., *et al.* (2020). Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms. *Nature communications* *11*, 404.
- Peng, L., Ran, Y.L., Hu, H., Yu, L., Liu, Q., Zhou, Z., Sun, Y.M., Sun, L.C., Pan, J., Sun, L.X., *et al.* (2009). Secreted LOXL2 is a novel therapeutic target that promotes gastric cancer metastasis via the Src/FAK pathway. *Carcinogenesis* *30*, 1660-1669.
- Peng, W., Chen, J.Q., Liu, C., Malu, S., Creasy, C., Tetzlaff, M.T., Xu, C., McKenzie, J.A., Zhang, C., Liang, X., *et al.* (2016). Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. *Cancer discovery* *6*, 202-216.
- Peranzoni, E., Rivas-Caicedo, A., Bougherara, H., Salmon, H., and Donnadieu, E. (2013). Positive and negative influence of the matrix architecture on antitumor immune surveillance. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *70*, 4431-4448.
- Perri, R.T., Kay, N.E., McCarthy, J., Vessella, R.L., Jacob, H.S., and Furcht, L.T. (1982). Fibronectin enhances in vitro monocyte-macrophage-mediated tumoricidal activity. *Blood* *60*, 430-435.

- Petersen, O.W., Nielsen, H.L., Gudjonsson, T., Villadsen, R., Rank, F., Niebuhr, E., Bissell, M.J., and Ronnov-Jessen, L. (2003). Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *The American journal of pathology* *162*, 391-402.
- Peterson, S.C., Eberl, M., Vagnozzi, A.N., Belkadi, A., Veniaminova, N.A., Verhaegen, M.E., Bichakjian, C.K., Ward, N.L., Dlugosz, A.A., and Wong, S.Y. (2015). Basal cell carcinoma preferentially arises from stem cells within hair follicle and mechanosensory niches. *Cell stem cell* *16*, 400-412.
- Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological reviews* *94*, 1287-1312.
- Pickup, M.W., Mouw, J.K., and Weaver, V.M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO reports* *15*, 1243-1253.
- Pisanti, S., Picardi, P., Ciaglia, E., D'Alessandro, A., and Bifulco, M. (2014). Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer. *Pharmacological research* *88*, 84-98.
- Pobbati, A.V., and Hong, W. (2020). A combat with the YAP/TAZ-TEAD oncoproteins for cancer therapy. *Theranostics* *10*, 3622-3635.
- Poenitzsch Strong, A.M., Setaluri, V., and Spiegelman, V.S. (2014). MicroRNA-340 as a modulator of RAS-RAF-MAPK signaling in melanoma. *Archives of biochemistry and biophysics* *563*, 118-124.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453-465.
- Popovic A. (2021). *Étude de la conversion des fibroblastes en fibroblastes associés au cancer au sein du microenvironnement tumoral des mélanomes cutanés*. [Thèse de Doctorat, Université Côte d'Azur, Nice, France]
- Poudel, B., Ki, H.H., Lee, Y.M., and Kim, D.K. (2013). Induction of IL-12 production by the activation of discoidin domain receptor 2 via NF-kappaB and JNK pathway. *Biochemical and biophysical research communications* *434*, 584-588.
- Poudel, B., Lee, Y.M., and Kim, D.K. (2015). DDR2 inhibition reduces migration and invasion of murine metastatic melanoma cells by suppressing MMP2/9 expression through ERK/NF-kappaB pathway. *Acta biochimica et biophysica Sinica* *47*, 292-298.
- Poulikakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., *et al.* (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* *480*, 387-390.
- Provenzano, P.P., Cuevas, C., Chang, A.E., Goel, V.K., Von Hoff, D.D., and Hingorani, S.R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell* *21*, 418-429.
- Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Knittel, J.G., Yan, L., Rueden, C.T., White, J.G., and Keely, P.J. (2008). Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC medicine* *6*, 11.
- Provenzano, P.P., and Keely, P.J. (2011). Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. *Journal of cell science* *124*, 1195-1205.
- Pullikuth, A.K., and Catling, A.D. (2007). Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. *Cellular signalling* *19*, 1621-1632.
- Pundavela, J., Roselli, S., Faulkner, S., Attia, J., Scott, R.J., Thorne, R.F., Forbes, J.F., Bradshaw, R.A., Walker, M.M., Jobling, P., *et al.* (2015). Nerve fibers infiltrate the tumor microenvironment and are associated with nerve growth factor production and lymph node invasion in breast cancer. *Molecular oncology* *9*, 1626-1635.
- Pylayeva, Y., Gillen, K.M., Gerald, W., Beggs, H.E., Reichardt, L.F., and Giancotti, F.G. (2009). Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *The Journal of clinical investigation* *119*, 252-266.

- Qin, X., Lv, X., Li, P., Yang, R., Xia, Q., Chen, Y., Peng, Y., Li, L., Li, S., Li, T., *et al.* (2020). Matrix stiffness modulates ILK-mediated YAP activation to control the drug resistance of breast cancer cells. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease* *1866*, 165625.
- Qin, Z., Richter, G., Schuler, T., Ibe, S., Cao, X., and Blankenstein, T. (1998). B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nature medicine* *4*, 627-630.
- Quante, M., Tu, S.P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S.S., Takashi, S., Baik, G.H., Shibata, W., Diprete, B., Betz, K.S., *et al.* (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer cell* *19*, 257-272.
- Raghu, G., Scholand, M.B., de Andrade, J., Lancaster, L., Mageto, Y., Goldin, J., Brown, K.K., Flaherty, K.R., Wencel, M., Wanger, J., *et al.* (2016). FG-3019 anti-connective tissue growth factor monoclonal antibody: results of an open-label clinical trial in idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal* *47*, 1481-1491.
- Rambow, F., Marine, J.C., and Goding, C.R. (2019). Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes & development* *33*, 1295-1318.
- Rambow, F., Rogiers, A., Marin-Bejar, O., Aibar, S., Femel, J., Dewaele, M., Karras, P., Brown, D., Chang, Y.H., Debiec-Rychter, M., *et al.* (2018). Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* *174*, 843-855 e819.
- Ramos-e-Silva, M., and da Silva Carneiro, S.C. (2007). Elderly skin and its rejuvenation: products and procedures for the aging skin. *Journal of cosmetic dermatology* *6*, 40-50.
- Ramovs, V., Te Molder, L., and Sonnenberg, A. (2017). The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* *57-58*, 213-243.
- Ramsdale, R., Jorissen, R.N., Li, F.Z., Al-Obaidi, S., Ward, T., Sheppard, K.E., Bukczynska, P.E., Young, R.J., Boyle, S.E., Shackleton, M., *et al.* (2015). The transcription cofactor c-JUN mediates phenotype switching and BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Science signaling* *8*, ra82.
- Rane, S.G., Cosenza, S.C., Mettus, R.V., and Reddy, E.P. (2002). Germ line transmission of the Cdk4(R24C) mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. *Molecular and cellular biology* *22*, 644-656.
- Rao, G., Kim, I.K., Conforti, F., Liu, J., Zhang, Y.W., and Giaccone, G. (2018). Dasatinib sensitises KRAS-mutant cancer cells to mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor via inhibition of TAZ activity. *European journal of cancer* *99*, 37-48.
- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C.R., and Alaibac, M. (2014). Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In vivo* *28*, 1005-1011.
- Rathore, M., Girard, C., Ohanna, M., Tichet, M., Ben Jouira, R., Garcia, E., Larbret, F., Gesson, M., Audebert, S., Lacour, J.P., *et al.* (2019). Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* *38*, 5873-5889.
- Reardon, D.A., Fink, K.L., Mikkelsen, T., Cloughesy, T.F., O'Neill, A., Plotkin, S., Glantz, M., Ravin, P., Raizer, J.J., Rich, K.M., *et al.* (2008). Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *26*, 5610-5617.
- Record, J., Malinova, D., Zenner, H.L., Plagnol, V., Nowak, K., Syed, F., Bouma, G., Curtis, J., Gilmour, K., Cale, C., *et al.* (2015). Immunodeficiency and severe susceptibility to bacterial infection associated with a loss-of-function homozygous mutation of MKL1. *Blood* *126*, 1527-1535.
- Reger de Moura, C., Battistella, M., Sohail, A., Caudron, A., Feugeas, J.P., Podgorniak, M.P., Pages, C., Mazouz Dorval, S., Marco, O., Menashi, S., *et al.* (2019). Discoidin domain receptors: A promising target in melanoma. *Pigment cell & melanoma research* *32*, 697-707.
- Reger de Moura, C., Prunotto, M., Sohail, A., Battistella, M., Jouenne, F., Marbach, D., Lebbe, C., Fridman, R., and Mourah, S. (2020). Discoidin Domain Receptors in Melanoma: Potential Therapeutic Targets to Overcome MAPK Inhibitor Resistance. *Frontiers in oncology* *10*, 1748.

- Ren, F., Zhang, L., and Jiang, J. (2010). Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. *Developmental biology* *337*, 303-312.
- Ren, J., Xin, F., Liu, P., Zhao, H.Y., Zhang, S.T., Han, P., Huang, H.X., and Wang, W. (2016). Role of BKCa in Stretch-Induced Relaxation of Colonic Smooth Muscle. *BioMed research international* *2016*, 9497041.
- Restivo, G., Diener, J., Cheng, P.F., Kiowski, G., Bonalli, M., Biedermann, T., Reichmann, E., Levesque, M.P., Dummer, R., and Sommer, L. (2018). Publisher Correction: The low affinity neurotrophin receptor CD271 regulates phenotype switching in melanoma. *Nature communications* *9*, 314.
- Ribas, A. (2012). Tumor immunotherapy directed at PD-1. *The New England journal of medicine* *366*, 2517-2519.
- Rice, A.J., Cortes, E., Lachowski, D., Cheung, B.C.H., Karim, S.A., Morton, J.P., and Del Rio Hernandez, A. (2017). Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* *6*, e352.
- Rick, J.W., Chandra, A., Dalle Ore, C., Nguyen, A.T., Yagnik, G., and Aghi, M.K. (2019). Fibronectin in malignancy: Cancer-specific alterations, protumoral effects, and therapeutic implications. *Seminars in oncology* *46*, 284-290.
- Riedel, A., Shorthouse, D., Haas, L., Hall, B.A., and Shields, J. (2016). Tumor-induced stromal reprogramming drives lymph node transformation. *Nature immunology* *17*, 1118-1127.
- 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.
- Rizzuti, I.F., Mascheroni, P., Arcucci, S., Ben-Meriem, Z., Prunet, A., Barentin, C., Riviere, C., Delanoe-Ayari, H., Hatzikirou, H., Guillermet-Guibert, J., *et al.* (2020). Mechanical Control of Cell Proliferation Increases Resistance to Chemotherapeutic Agents. *Physical review letters* *125*, 128103.
- Robert, C., Ribas, A., Wolchok, J.D., Hodi, F.S., Hamid, O., Kefford, R., Weber, J.S., Joshua, A.M., Hwu, W.J., Gangadhar, T.C., *et al.* (2014). Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* *384*, 1109-1117.
- Robert, C., Schachter, J., Long, G.V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., *et al.* (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England journal of medicine* *372*, 2521-2532.
- Robert, G., Gaggioli, C., Bailet, O., Chavey, C., Abbe, P., Aberdam, E., Sabatie, E., Cano, A., Garcia de Herreros, A., Ballotti, R., *et al.* (2006). SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer research* *66*, 7516-7523.
- Roberts, P.J., and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* *26*, 3291-3310.
- Rodriguez-Hernandez, I., Cantelli, G., Bruce, F., and Sanz-Moreno, V. (2016). Rho, ROCK and actomyosin contractility in metastasis as drug targets. *F1000Research* *5*.
- Roscoe, J.P., and Owsianka, A.M. (1982). Alginate: a reversible semi-solid medium for investigating cell transformation. *British journal of cancer* *46*, 965-969.
- Rosenbloom, J., Macarak, E., Piera-Velazquez, S., and Jimenez, S.A. (2017). Human Fibrotic Diseases: Current Challenges in Fibrosis Research. *Methods in molecular biology* *1627*, 1-23.
- Rovera, C., Berestjuk, I., Lecacheur, M., Diazzi, S., Mallavialle, A., Albregues, J., Gaggioli, C., Girard, C.C., Passeron, T., Deckert, M., *et al.* (2021). Invasive dedifferentiated melanoma cells inhibit JAK1-STAT3-driven actomyosin contractility of human fibroblastic reticular cells of the lymph node. *bioRxiv*, 2021.2003.2025.436913.

- Rowling, E.J., Miskolczi, Z., Nagaraju, R., Wilcock, D.J., Wang, P., Telfer, B., Li, Y., Lasheras-Otero, I., Redondo-Munoz, M., Sharrocks, A.D., *et al.* (2020). Cooperative behaviour and phenotype plasticity evolve during melanoma progression. *Pigment cell & melanoma research* *33*, 695-708.
- Ruiter, D., Bogenrieder, T., Elder, D., and Herlyn, M. (2002). Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *The Lancet Oncology* *3*, 35-43.
- Rybak, J.N., Roesli, C., Kaspar, M., Villa, A., and Neri, D. (2007). The extra-domain A of fibronectin is a vascular marker of solid tumors and metastases. *Cancer research* *67*, 10948-10957.
- Ryniers, F., Stove, C., Goethals, M., Brackenier, L., Noe, V., Bracke, M., Vandekerckhove, J., Mareel, M., and Bruyneel, E. (2002). Plasmin produces an E-cadherin fragment that stimulates cancer cell invasion. *Biological chemistry* *383*, 159-165.
- Saby, C., Buache, E., Brassart-Pasco, S., El Btaouri, H., Courageot, M.P., Van Gulick, L., Garnotel, R., Jeannesson, P., and Morjani, H. (2016). Type I collagen aging impairs discoidin domain receptor 2-mediated tumor cell growth suppression. *Oncotarget* *7*, 24908-24927.
- Sachs, F. (2010). Stretch-activated ion channels: what are they? *Physiology* *25*, 50-56.
- Sage, E.H., and Bornstein, P. (1991). Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *The Journal of biological chemistry* *266*, 14831-14834.
- Saha, K., Keung, A.J., Irwin, E.F., Li, Y., Little, L., Schaffer, D.V., and Healy, K.E. (2008). Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophysical journal* *95*, 4426-4438.
- Sala, M., Allain, N., Jabouille, A., Henriët, E., Abou-Ammoud, A., Uguen, A., Di-Tommaso, S., Dhourte, C., Raymond, A.-A., Dupuy, J.-W., *et al.* (2021). Discoidin domain receptor 2 drives melanoma drug resistance through AXL-dependent phenotype switching. *bioRxiv*, 857904.
- Salmon, E.D., and Wolniak, S.M. (1990). Role of microtubules in stimulating cytokinesis in animal cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* *582*, 88-98.
- Sandri, S., Faiao-Flores, F., Tiago, M., Pennacchi, P.C., Massaro, R.R., Alves-Fernandes, D.K., Berardinelli, G.N., Evangelista, A.F., de Lima Vazquez, V., Reis, R.M., *et al.* (2016). Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. *Pharmacological research* *111*, 523-533.
- Sanghvi-Shah, R., and Weber, G.F. (2017). Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Frontiers in cell and developmental biology* *5*, 81.
- Sanz-Moreno, V., Gaggioli, C., Yeo, M., Albregues, J., Wallberg, F., Viros, A., Hooper, S., Mitter, R., Feral, C.C., Cook, M., *et al.* (2011). ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer cell* *20*, 229-245.
- Satelli, A., and Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *68*, 3033-3046.
- Schadendorf, D., Amonkar, M.M., Stroyakovskiy, D., Levchenko, E., Gogas, H., de Braud, F., Grob, J.J., Bondarenko, I., Garbe, C., Lebbe, C., *et al.* (2015). Health-related quality of life impact in a randomised phase III study of the combination of dabrafenib and trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with BRAF V600 metastatic melanoma. *European journal of cancer* *51*, 833-840.
- Schauer, I.G., Sood, A.K., Mok, S., and Liu, J. (2011). Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* *13*, 393-405.
- Schlegel, N.C., von Planta, A., Widmer, D.S., Dummer, R., and Christofori, G. (2015). PI3K signalling is required for a TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal-like transition (EMT-like) in human melanoma cells. *Experimental dermatology* *24*, 22-28.
- Schrader, J., Gordon-Walker, T.T., Aucott, R.L., van Deemter, M., Quaas, A., Walsh, S., Benten, D., Forbes, S.J., Wells, R.G., and Iredale, J.P. (2011). Matrix stiffness modulates proliferation,

chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* *53*, 1192-1205.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* *331*, 1565-1570.

Schultz, J., Koczan, D., Schmitz, U., Ibrahim, S.M., Pilch, D., Landsberg, J., and Kunz, M. (2010). Tumor-promoting role of signal transducer and activator of transcription (Stat)1 in late-stage melanoma growth. *Clinical & experimental metastasis* *27*, 133-140.

Schultze, A., and Fiedler, W. (2010). Therapeutic potential and limitations of new FAK inhibitors in the treatment of cancer. *Expert opinion on investigational drugs* *19*, 777-788.

Schwartz, M.A. (2010). Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *2*, a005066.

Schwartz, M.A., and Assoian, R.K. (2001). Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *Journal of cell science* *114*, 2553-2560.

Schworer, S., Vardhana, S.A., and Thompson, C.B. (2019). Cancer Metabolism Drives a Stromal Regenerative Response. *Cell metabolism* *29*, 576-591.

Seifert, H., Hirata, E., Gore, M., Khabra, K., Messiou, C., Larkin, J., and Sahai, E. (2016). Extrinsic factors can mediate resistance to BRAF inhibition in central nervous system melanoma metastases. *Pigment cell & melanoma research* *29*, 92-100.

Seip, K., Fleten, K.G., Barkovskaya, A., Nygaard, V., Haugen, M.H., Engesaeter, B.O., Maeldandsmo, G.M., and Prasmickaite, L. (2016). Fibroblast-induced switching to the mesenchymal-like phenotype and PI3K/mTOR signaling protects melanoma cells from BRAF inhibitors. *Oncotarget* *7*, 19997-20015.

Selitsky, S.R., Mose, L.E., Smith, C.C., Chai, S., Hoadley, K.A., Dittmer, D.P., Moschos, S.J., Parker, J.S., and Vincent, B.G. (2019). Prognostic value of B cells in cutaneous melanoma. *Genome medicine* *11*, 36.

Selvaggio, A.S., and Noble, P.W. (2016). Pirfenidone Initiates a New Era in the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annual review of medicine* *67*, 487-495.

Seth, R., Messersmith, H., Kaur, V., Kirkwood, J.M., Kudchadkar, R., McQuade, J.L., Provenzano, A., Swami, U., Weber, J., Alluri, K.C., *et al.* (2020). Systemic Therapy for Melanoma: ASCO Guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, JCO2000198.

Shaffer, S.M., Dunagin, M.C., Torborg, S.R., Torre, E.A., Emert, B., Krepler, C., Beqiri, M., Sproesser, K., Brafford, P.A., Xiao, M., *et al.* (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* *546*, 431-435.

Shain, A.H., and Bastian, B.C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nature reviews Cancer* *16*, 345-358.

Shain, K.H., and Dalton, W.S. (2009). Environmental-mediated drug resistance: a target for multiple myeloma therapy. *Expert review of hematology* *2*, 649-662.

Shain, K.H., Yarde, D.N., Meads, M.B., Huang, M., Jove, R., Hazlehurst, L.A., and Dalton, W.S. (2009). Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer research* *69*, 1009-1015.

Sharma, S.V., Lee, D.Y., Li, B., Quinlan, M.P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M.A., *et al.* (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* *141*, 69-80.

Shaul, Y.D., and Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et biophysica acta* *1773*, 1213-1226.

- Sherman-Baust, C.A., Weeraratna, A.T., Rangel, L.B., Pizer, E.S., Cho, K.R., Schwartz, D.R., Shock, T., and Morin, P.J. (2003). Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer cell* *3*, 377-386.
- 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.
- Shiwen, X., Stratton, R., Nikitorowicz-Buniak, J., Ahmed-Abdi, B., Ponticos, M., Denton, C., Abraham, D., Takahashi, A., Suki, B., Layne, M.D., *et al.* (2015). A Role of Myocardin Related Transcription Factor-A (MRTF-A) in Scleroderma Related Fibrosis. *PloS one* *10*, e0126015.
- Shreberk-Shaked, M., Dassa, B., Sinha, S., Di Agostino, S., Azuri, I., Mukherjee, S., Aylon, Y., Blandino, G., Ruppin, E., and Oren, M. (2020). A Division of Labor between YAP and TAZ in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer research* *80*, 4145-4157.
- Shrivastava, A., Radziejewski, C., Campbell, E., Kovac, L., McGlynn, M., Ryan, T.E., Davis, S., Goldfarb, M.P., Glass, D.J., Lemke, G., *et al.* (1997). An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Molecular cell* *1*, 25-34.
- Sica, A., and Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of clinical investigation* *117*, 1155-1166.
- Sidorenko, E., and Vartiainen, M.K. (2019). Nucleoskeletal regulation of transcription: Actin on MRTF. *Experimental biology and medicine* *244*, 1372-1381.
- Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., Albelda, S.M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *Journal of immunology* *179*, 977-983.
- Sisson, T.H., Ajayi, I.O., Subbotina, N., Dodi, A.E., Rodansky, E.S., Chibucos, L.N., Kim, K.K., Keshamouni, V.G., White, E.S., Zhou, Y., *et al.* (2015). Inhibition of myocardin-related transcription factor/serum response factor signaling decreases lung fibrosis and promotes mesenchymal cell apoptosis. *The American journal of pathology* *185*, 969-986.
- Skobe, M., Hamberg, L.M., Hawighorst, T., Schirner, M., Wolf, G.L., Alitalo, K., and Detmar, M. (2001). Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *The American journal of pathology* *159*, 893-903.
- Slattery, M.L., John, E., Torres-Mejia, G., Stern, M., Lundgreen, A., Hines, L., Giuliano, A., Baumgartner, K., Herrick, J., and Wolff, R.K. (2013). Matrix metalloproteinase genes are associated with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study. *PloS one* *8*, e63165.
- Slemmons, K.K., Crose, L.E., Rudzinski, E., Bentley, R.C., and Linardic, C.M. (2015). Role of the YAP Oncoprotein in Priming Ras-Driven Rhabdomyosarcoma. *PloS one* *10*, e0140781.
- Smalley, K.S. (2003). A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *International journal of cancer* *104*, 527-532.
- Smith, E.C., Thon, J.N., Devine, M.T., Lin, S., Schulz, V.P., Guo, Y., Massaro, S.A., Halene, S., Gallagher, P., Italiano, J.E., Jr., *et al.* (2012). MKL1 and MKL2 play redundant and crucial roles in megakaryocyte maturation and platelet formation. *Blood* *120*, 2317-2329.
- Smith, M.P., Brunton, H., Rowling, E.J., Ferguson, J., Arozarena, I., Miskolczi, Z., Lee, J.L., Girotti, M.R., Marais, R., Levesque, M.P., *et al.* (2016). Inhibiting Drivers of Non-mutational Drug Tolerance Is a Salvage Strategy for Targeted Melanoma Therapy. *Cancer cell* *29*, 270-284.
- Smith, M.P., Rowling, E.J., Miskolczi, Z., Ferguson, J., Spoerri, L., Haass, N.K., Sloss, O., McEntegart, S., Arozarena, I., von Kriegsheim, A., *et al.* (2017). Targeting endothelin receptor signalling overcomes heterogeneity driven therapy failure. *EMBO molecular medicine* *9*, 1011-1029.
- 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.

- Smith, M.P., and Wellbrock, C. (2016). Molecular Pathways: Maintaining MAPK Inhibitor Sensitivity by Targeting Nonmutational Tolerance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22, 5966-5970.
- Soler-Cardona, A., Forsthuber, A., Lipp, K., Ebersberger, S., Heinz, M., Schossleitner, K., Buchberger, E., Groger, M., Petzelbauer, P., Hoeller, C., *et al.* (2018). CXCL5 Facilitates Melanoma Cell-Neutrophil Interaction and Lymph Node Metastasis. *The Journal of investigative dermatology* 138, 1627-1635.
- Solit, D.B., Garraway, L.A., Pratilas, C.A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J.M., She, Y., Osman, I., *et al.* (2006). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 439, 358-362.
- Somasundaram, R., Zhang, G., Fukunaga-Kalabis, M., Perego, M., Krepler, C., Xu, X., Wagner, C., Hristova, D., Zhang, J., Tian, T., *et al.* (2017). Tumor-associated B-cells induce tumor heterogeneity and therapy resistance. *Nature communications* 8, 607.
- Somogyi, K., and Rorth, P. (2004). Evidence for tension-based regulation of Drosophila MAL and SRF during invasive cell migration. *Developmental cell* 7, 85-93.
- Sorensen, H.T., Friis, S., Olsen, J.H., Thulstrup, A.M., Mellekjaer, L., Linet, M., Trichopoulos, D., Vilstrup, H., and Olsen, J. (1998). Risk of liver and other types of cancer in patients with cirrhosis: a nationwide cohort study in Denmark. *Hepatology* 28, 921-925.
- Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature reviews Immunology* 10, 712-723.
- Sottile, J., and Hocking, D.C. (2002). Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Molecular biology of the cell* 13, 3546-3559.
- Spiera, R.F., Gordon, J.K., Mersten, J.N., Magro, C.M., Mehta, M., Wildman, H.F., Kloiber, S., Kirou, K.A., Lyman, S., and Crow, M.K. (2011). Imatinib mesylate (Gleevec) in the treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis: results of a 1-year, phase IIa, single-arm, open-label clinical trial. *Annals of the rheumatic diseases* 70, 1003-1009.
- Spinelli, F.M., Vitale, D.L., Sevic, I., and Alaniz, L. (2020). Hyaluronan in the Tumor Microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology* 1245, 67-83.
- Spranger, S., Bao, R., and Gajewski, T.F. (2015). Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 523, 231-235.
- Spudich, J.A. (2001). The myosin swinging cross-bridge model. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 387-392.
- Stahtea, X.N., Roussidis, A.E., Kanakis, I., Tzanakakis, G.N., Chalkiadakis, G., Mavroudis, D., Kletsas, D., and Karamanos, N.K. (2007). Imatinib inhibits colorectal cancer cell growth and suppresses stromal-induced growth stimulation, MT1-MMP expression and pro-MMP2 activation. *International journal of cancer* 121, 2808-2814.
- Staudinger, L.A., Spano, S.J., Lee, W., Coelho, N., Rajshankar, D., Bendeck, M.P., Moriarty, T., and McCulloch, C.A. (2013). Interactions between the discoidin domain receptor 1 and beta1 integrin regulate attachment to collagen. *Biology open* 2, 1148-1159.
- Stokes, J.B., Adair, S.J., Slack-Davis, J.K., Walters, D.M., Tilghman, R.W., Hershey, E.D., Lowrey, B., Thomas, K.S., Bouton, A.H., Hwang, R.F., *et al.* (2011). Inhibition of focal adhesion kinase by PF-562,271 inhibits the growth and metastasis of pancreatic cancer concomitant with altering the tumor microenvironment. *Molecular cancer therapeutics* 10, 2135-2145.
- Stopczynski, R.E., Normolle, D.P., Hartman, D.J., Ying, H., DeBerry, J.J., Bielefeldt, K., Rhim, A.D., DePinho, R.A., Albers, K.M., and Davis, B.M. (2014). Neuroplastic changes occur early in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer research* 74, 1718-1727.
- Stramer, B.M., Mori, R., and Martin, P. (2007). The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *The Journal of investigative dermatology* 127, 1009-1017.

- Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Castagnoli, L., Shaul, Y., Sacchi, A., Oren, M., Sudol, M., Cesareni, G., and Blandino, G. (2001). Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry* *276*, 15164-15173.
- 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.
- Su, F., Viros, A., Milagre, C., Trunzer, K., Bollag, G., Spleiss, O., Reis-Filho, J.S., Kong, X., Koya, R.C., Flaherty, K.T., *et al.* (2012). RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *The New England journal of medicine* *366*, 207-215.
- Su, S., Chen, J., Yao, H., Liu, J., Yu, S., Lao, L., Wang, M., Luo, M., Xing, Y., Chen, F., *et al.* (2018). CD10(+)GPR77(+) Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell* *172*, 841-856 e816.
- Su, Y., Wei, W., Robert, L., Xue, M., Tsoi, J., Garcia-Diaz, A., Homet Moreno, B., Kim, J., Ng, R.H., Lee, J.W., *et al.* (2017). Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *114*, 13679-13684.
- Sucker, A., Zhao, F., Pieper, N., Heeke, C., Maltaner, R., Stadtler, N., Real, B., Bielefeld, N., Howe, S., Weide, B., *et al.* (2017). Acquired IFN γ resistance impairs anti-tumor immunity and gives rise to T-cell-resistant melanoma lesions. *Nature communications* *8*, 15440.
- Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K., and Lehman, D. (1995). Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *The Journal of biological chemistry* *270*, 14733-14741.
- Suh, H.N., and Han, H.J. (2011). Collagen I regulates the self-renewal of mouse embryonic stem cells through α 2 β 1 integrin- and DDR1-dependent Bmi-1. *Journal of cellular physiology* *226*, 3422-3432.
- Sullivan, R.J., Hamid, O., Gonzalez, R., Infante, J.R., Patel, M.R., Hodi, F.S., Lewis, K.D., Tawbi, H.A., Hernandez, G., Wongchenko, M.J., *et al.* (2019). Atezolizumab plus cobimetinib and vemurafenib in BRAF-mutated melanoma patients. *Nature medicine* *25*, 929-935.
- Sulzmaier, F.J., Jean, C., and Schlaepfer, D.D. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature reviews Cancer* *14*, 598-610.
- Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G.J., Prahallad, A., Robert, C., Haanen, J., Blank, C., Wesseling, J., Willems, S.M., *et al.* (2014). Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* *508*, 118-122.
- Sun, M., Chi, G., Li, P., Lv, S., Xu, J., Xu, Z., Xia, Y., Tan, Y., Xu, J., Li, L., *et al.* (2018). Effects of Matrix Stiffness on the Morphology, Adhesion, Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *International journal of medical sciences* *15*, 257-268.
- Swartz, M.A., and Lund, A.W. (2012). Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. *Nature reviews Cancer* *12*, 210-219.
- Swift, J., Ivanovska, I.L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P.C., Pinter, J., Pajerowski, J.D., Spinler, K.R., Shin, J.W., Tewari, M., *et al.* (2013). Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* *341*, 1240104.
- Tachibana, T., Onodera, H., Tsuruyama, T., Mori, A., Nagayama, S., Hiai, H., and Imamura, M. (2005). Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *11*, 7322-7327.
- Tajik, A., Zhang, Y., Wei, F., Sun, J., Jia, Q., Zhou, W., Singh, R., Khanna, N., Belmont, A.S., and Wang, N. (2016). Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nature materials* *15*, 1287-1296.
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C., and Karamanos, N.K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews* *97*, 4-27.

- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Tzanakakis, G.N., and Karamanos, N.K. (2010). Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *The FEBS journal* *277*, 3904-3923.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* *139*, 871-890.
- Thomas, G., Burnham, N.A., Camesano, T.A., and Wen, Q. (2013). Measuring the mechanical properties of living cells using atomic force microscopy. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Thyberg, J., and Moskalewski, S. (1999). Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Experimental cell research* *246*, 263-279.
- Tichet, M., Prod'Homme, V., Fenouille, N., Ambrosetti, D., Mallavialle, A., Cerezo, M., Ohanna, M., Audebert, S., Rocchi, S., Giacchero, D., *et al.* (2015). Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nature communications* *6*, 6993.
- Tilghman, R.W., Cowan, C.R., Mih, J.D., Koryakina, Y., Gioeli, D., Slack-Davis, J.K., Blackman, B.R., Tschumperlin, D.J., and Parsons, J.T. (2010). Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype. *PloS one* *5*, e12905.
- Tinevez, J.Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G.M., Reynolds, G.D., Laplantine, E., Bednarek, S.Y., Shorte, S.L., and Eliceiri, K.W. (2017). TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* *115*, 80-90.
- 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.
- Titus-Ernstoff, L., Perry, A.E., Spencer, S.K., Gibson, J.J., Cole, B.F., and Ernstoff, M.S. (2005). Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *International journal of cancer* *116*, 144-149.
- Titz, B., Lomova, A., Le, A., Hugo, W., Kong, X., Ten Hoeve, J., Friedman, M., Shi, H., Moriceau, G., Song, C., *et al.* (2016). JUN dependency in distinct early and late BRAF inhibition adaptation states of melanoma. *Cell discovery* *2*, 16028.
- Tobin, D.J. (2006). Biochemistry of human skin--our brain on the outside. *Chemical Society reviews* *35*, 52-67.
- Tokuda, E.Y., Leight, J.L., and Anseth, K.S. (2014). Modulation of matrix elasticity with PEG hydrogels to study melanoma drug responsiveness. *Biomaterials* *35*, 4310-4318.
- Topalian, S.L., Sznol, M., McDermott, D.F., Kluger, H.M., Carvajal, R.D., Sharfman, W.H., Brahmer, J.R., Lawrence, D.P., Atkins, M.B., Powderly, J.D., *et al.* (2014). Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *32*, 1020-1030.
- Tortora, G.J., and Derrickson, B. (2012). *Principles of anatomy & physiology*, 13th edn (Hoboken, NJ: Wiley).
- Totaro, A., Panciera, T., and Piccolo, S. (2018). YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. *Nature cell biology* *20*, 888-899.
- Toth, B.I., Olah, A., Szollosi, A.G., and Biro, T. (2014). TRP channels in the skin. *British journal of pharmacology* *171*, 2568-2581.
- Treilleux, I., Blay, J.Y., Bendriss-Vermare, N., Ray-Coquard, I., Bachelot, T., Guastalla, J.P., Bremond, A., Goddard, S., Pin, J.J., Barthelemy-Dubois, C., *et al.* (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *10*, 7466-7474.
- 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.

- Tsao, H., and Niendorf, K. (2004). Genetic testing in hereditary melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* *51*, 803-808.
- Tsao, H., Zhang, X., Fowlkes, K., and Haluska, F.G. (2000). Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer research* *60*, 1800-1804.
- Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K.M., Lay, J., Wong, D.J.L., Atefi, M., Shirazi, R., Wang, X., *et al.* (2018). Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer cell* *33*, 890-904 e895.
- Tu, M.M., Lee, F.Y.F., Jones, R.T., Kimball, A.K., Saravia, E., Graziano, R.F., Coleman, B., Menard, K., Yan, J., Michaud, E., *et al.* (2019). Targeting DDR2 enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy. *Science advances* *5*, eaav2437.
- Tuncer, E., Calçada, R.R., Zingg, D., Varum, S., Cheng, P., Freiberger, S.N., Deng, C.X., Kleiter, I., Levesque, M.P., Dummer, R., *et al.* (2019). SMAD signaling promotes melanoma metastasis independently of phenotype switching. *The Journal of clinical investigation* *129*, 2702-2716.
- Tzima, E., del Pozo, M.A., Shattil, S.J., Chien, S., and Schwartz, M.A. (2001). Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *The EMBO journal* *20*, 4639-4647.
- Udan, R.S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., and Halder, G. (2003). Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nature cell biology* *5*, 914-920.
- Ugurel, S., Rohmel, J., Ascierto, P.A., Becker, J.C., Flaherty, K.T., Grob, J.J., Hauschild, A., Larkin, J., Livingstone, E., Long, G.V., *et al.* (2020). Survival of patients with advanced metastatic melanoma: The impact of MAP kinase pathway inhibition and immune checkpoint inhibition - Update 2019. *European journal of cancer* *130*, 126-138.
- Urakawa, H., Nishida, Y., Knudson, W., Knudson, C.B., Arai, E., Kozawa, E., Futamura, N., Wasa, J., and Ishiguro, N. (2012a). Therapeutic potential of hyaluronan oligosaccharides for bone metastasis of breast cancer. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* *30*, 662-672.
- Urakawa, H., Nishida, Y., Wasa, J., Arai, E., Zhuo, L., Kimata, K., Kozawa, E., Futamura, N., and Ishiguro, N. (2012b). Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo. *International journal of cancer* *130*, 454-466.
- Urtasun, R., Latasa, M.U., Demartis, M.I., Balzani, S., Goni, S., Garcia-Irigoyen, O., Elizalde, M., Azcona, M., Pascale, R.M., Feo, F., *et al.* (2011). Connective tissue growth factor autocriny in human hepatocellular carcinoma: oncogenic role and regulation by epidermal growth factor receptor/yes-associated protein-mediated activation. *Hepatology* *54*, 2149-2158.
- Valiathan, R.R., Marco, M., Leitinger, B., Kleer, C.G., and Fridman, R. (2012). Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer metastasis reviews* *31*, 295-321.
- Van Allen, E.M., Wagle, N., Sucker, A., Treacy, D.J., Johannessen, C.M., Goetz, E.M., Place, C.S., Taylor-Weiner, A., Whittaker, S., Kryukov, G.V., *et al.* (2014). The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer discovery* *4*, 94-109.
- Van Belle, P., Rodeck, U., Nuamah, I., Halpern, A.C., and Elder, D.E. (1996). Melanoma-associated expression of transforming growth factor-beta isoforms. *The American journal of pathology* *148*, 1887-1894.
- Vandamme, N., Denecker, G., Bruneel, K., Blancke, G., Akay, O., Taminau, J., De Coninck, J., De Smedt, E., Skrypek, N., Van Looke, W., *et al.* (2020). The EMT Transcription Factor ZEB2 Promotes Proliferation of Primary and Metastatic Melanoma While Suppressing an Invasive, Mesenchymal-Like Phenotype. *Cancer research* *80*, 2983-2995.
- Varelas, X., Sakuma, R., Samavarchi-Tehrani, P., Peerani, R., Rao, B.M., Dembowy, J., Yaffe, M.B., Zandstra, P.W., and Wrana, J.L. (2008). TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nature cell biology* *10*, 837-848.

- Vazquez, F., Lim, J.H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C.B., Granter, S.R., Widlund, H.R., Spiegelman, B.M., *et al.* (2013). PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer cell* *23*, 287-301.
- Velasquez, L.S., Sutherland, L.B., Liu, Z., Grinnell, F., Kamm, K.E., Schneider, J.W., Olson, E.N., and Small, E.M. (2013). Activation of MRTF-A-dependent gene expression with a small molecule promotes myofibroblast differentiation and wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 16850-16855.
- Verfaillie, A., Imrichova, H., Atak, Z.K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., Christiaens, V., Svetlichnyy, D., Luciani, F., Van den Mooter, L., *et al.* (2015). Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nature communications* *6*, 6683.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., and Horwitz, A.R. (2005). Cell migration at a glance. *Journal of cell science* *118*, 4917-4919.
- Vihinen, P., and Kahari, V.M. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *International journal of cancer* *99*, 157-166.
- Villanueva, J., and Herlyn, M. (2008). Melanoma and the tumor microenvironment. *Current oncology reports* *10*, 439-446.
- Villanueva, J., Infante, J.R., Krepler, C., Reyes-Uribe, P., Samanta, M., Chen, H.Y., Li, B., Swoboda, R.K., Wilson, M., Vultur, A., *et al.* (2013). Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. *Cell reports* *4*, 1090-1099.
- 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.
- Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* *92*, 827-839.
- Vogel, V., and Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews Molecular cell biology* *7*, 265-275.
- Vogel, W., Brakebusch, C., Fassler, R., Alves, F., Ruggiero, F., and Pawson, T. (2000). Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta(1) integrin. *The Journal of biological chemistry* *275*, 5779-5784.
- Vogel, W., Gish, G.D., Alves, F., and Pawson, T. (1997). The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Molecular cell* *1*, 13-23.
- Vogel, W.F., Abdulhusein, R., and Ford, C.E. (2006). Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cellular signalling* *18*, 1108-1116.
- Vogel, W.F., Aszodi, A., Alves, F., and Pawson, T. (2001). Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development. *Molecular and cellular biology* *21*, 2906-2917.
- Vollrath, M.A., Kwan, K.Y., and Corey, D.P. (2007). The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annual review of neuroscience* *30*, 339-365.
- von Gise, A., Lin, Z., Schlegelmilch, K., Honor, L.B., Pan, G.M., Buck, J.N., Ma, Q., Ishiwata, T., Zhou, B., Camargo, F.D., *et al.* (2012). YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 2394-2399.
- Wagenaar, T.R., Ma, L., Roscoe, B., Park, S.M., Bolon, D.N., and Green, M.R. (2014). Resistance to vemurafenib resulting from a novel mutation in the BRAFV600E kinase domain. *Pigment cell & melanoma research* *27*, 124-133.
- Waizenegger, I.C., Baum, A., Steurer, S., Stadtmuller, H., Bader, G., Schaaf, O., Garin-Chesa, P., Schlattl, A., Schweifer, N., Haslinger, C., *et al.* (2016). A Novel RAF Kinase Inhibitor with DFG-Out-

Binding Mode: High Efficacy in BRAF-Mutant Tumor Xenograft Models in the Absence of Normal Tissue Hyperproliferation. *Molecular cancer therapeutics* 15, 354-365.

Wang, C.Z., Su, H.W., Hsu, Y.C., Shen, M.R., and Tang, M.J. (2006). A discoidin domain receptor 1/SHP-2 signaling complex inhibits alpha2beta1-integrin-mediated signal transducers and activators of transcription 1/3 activation and cell migration. *Molecular biology of the cell* 17, 2839-2852.

Wang, D., Dou, K., Xiang, H., Song, Z., Zhao, Q., Chen, Y., and Li, Y. (2007). Involvement of RhoA in progression of human hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology* 22, 1916-1920.

Wang, D.Z., Li, S., Hockemeyer, D., Sutherland, L., Wang, Z., Schratt, G., Richardson, J.A., Nordheim, A., and Olson, E.N. (2002). Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14855-14860.

Wang, H.M., Hung, C.H., Lu, S.N., Chen, C.H., Lee, C.M., Hu, T.H., and Wang, J.H. (2013). Liver stiffness measurement as an alternative to fibrotic stage in risk assessment of hepatocellular carcinoma incidence for chronic hepatitis C patients. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 33, 756-761.

Wang, J.H., and Lin, J.S. (2007). Cell traction force and measurement methods. *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 6, 361-371.

Wang, L., Wu, S., Cao, G., Fan, Y., Dunne, N., and Li, X. (2019). Biomechanical studies on biomaterial degradation and co-cultured cells: mechanisms, potential applications, challenges and prospects. *Journal of materials chemistry B* 7, 7439-7459.

Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., *et al.* (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer* 8, 761-773.

Wang, N., Tytell, J.D., and Ingber, D.E. (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 75-82.

Wang, S., Bager, C.L., Karsdal, M.A., Chondros, D., Taverna, D., and Willumsen, N. (2021). Blood-based extracellular matrix biomarkers as predictors of survival in patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma receiving pegvorhialuronidase alfa. *Journal of translational medicine* 19, 39.

Wang, T., Xiao, M., Ge, Y., Krepler, C., Belser, E., Lopez-Coral, A., Xu, X., Zhang, G., Azuma, R., Liu, Q., *et al.* (2015a). BRAF Inhibition Stimulates Melanoma-Associated Macrophages to Drive Tumor Growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 1652-1664.

Wang, W., Li, N., Li, X., Tran, M.K., Han, X., and Chen, J. (2015b). Tankyrase Inhibitors Target YAP by Stabilizing Angiomotin Family Proteins. *Cell reports* 13, 524-532.

Wang, Y., Lin, Z., Sun, L., Fan, S., Huang, Z., Zhang, D., Yang, Z., Li, J., and Chen, W. (2014). Akt/Ezrin Tyr353/NF-kappaB pathway regulates EGF-induced EMT and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 110, 695-705.

Weaver, V.M., Howlett, A.R., Langton-Webster, B., Petersen, O.W., and Bissell, M.J. (1995). The development of a functionally relevant cell culture model of progressive human breast cancer. *Seminars in cancer biology* 6, 175-184.

Weaver, V.M., Lelievre, S., Lakins, J.N., Chrenek, M.A., Jones, J.C., Giancotti, F., Werb, Z., and Bissell, M.J. (2002). beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer cell* 2, 205-216.

Weeds, A.G., Gooch, J., Hawkins, M., Pope, B., and Way, M. (1991). Role of actin-binding proteins in cytoskeletal dynamics. *Biochemical Society transactions* 19, 1016-1020.

Wegener, K.L., Partridge, A.W., Han, J., Pickford, A.R., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H., and Campbell, I.D. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 128, 171-182.

- Wei, H.T., Guo, E.N., Dong, B.G., and Chen, L.S. (2015a). Prognostic and clinical significance of syndecan-1 in colorectal cancer: a meta-analysis. *BMC gastroenterology* *15*, 152.
- Wei, S.C., Fattet, L., Tsai, J.H., Guo, Y., Pai, V.H., Majeski, H.E., Chen, A.C., Sah, R.L., Taylor, S.S., Engler, A.J., *et al.* (2015b). Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nature cell biology* *17*, 678-688.
- 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 Arozarena, I. (2016). The Complexity of the ERK/MAP-Kinase Pathway and the Treatment of Melanoma Skin Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology* *4*, 33.
- Wellbrock, C., Weisser, C., Geissinger, E., Troppmair, J., and Scharl, M. (2002). Activation of p59(Fyn) leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of biological chemistry* *277*, 6443-6454.
- Wells, J.M., Gaggari, A., and Blalock, J.E. (2015). MMP generated matrikines. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* *44-46*, 122-129.
- Wells, R.G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* *47*, 1394-1400.
- Wesley, R.B., 2nd, Meng, X., Godin, D., and Galis, Z.S. (1998). Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *18*, 432-440.
- White, E. (2011). Mechanical modulation of cardiac microtubules. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* *462*, 177-184.
- Whittaker, S.R., Theurillat, J.P., Van Allen, E., Wagle, N., Hsiao, J., Cowley, G.S., Schadendorf, D., Root, D.E., and Garraway, L.A. (2013). A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer discovery* *3*, 350-362.
- Widlund, H.R., and Fisher, D.E. (2003). Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* *22*, 3035-3041.
- 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.
- Winograd-Katz, S.E., Fassler, R., Geiger, B., and Legate, K.R. (2014). The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nature reviews Molecular cell biology* *15*, 273-288.
- Wirtz, H.R., and Dobbs, L.G. (2000). The effects of mechanical forces on lung functions. *Respiration physiology* *119*, 1-17.
- Wouters, J., Kalender-Atak, Z., Minnoye, L., Spanier, K.I., De Waegeneer, M., Bravo Gonzalez-Blas, C., Mauduit, D., Davie, K., Hulselmans, G., Najem, A., *et al.* (2020). Robust gene expression programs underlie recurrent cell states and phenotype switching in melanoma. *Nature cell biology* *22*, 986-998.
- Wu, H., Goel, V., and Haluska, F.G. (2003). PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* *22*, 3113-3122.
- Wu, J., Minikes, A.M., Gao, M., Bian, H., Li, Y., Stockwell, B.R., Chen, Z.N., and Jiang, X. (2019). Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via NF2-YAP signalling. *Nature* *572*, 402-406.
- Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J., and Pan, D. (2008). The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Developmental cell* *14*, 388-398.
- Wu, X., Chen, X., Zhou, Q., Li, P., Yu, B., Li, J., Qu, Y., Yan, J., Yu, Y., Yan, M., *et al.* (2013). Hepatocyte growth factor activates tumor stromal fibroblasts to promote tumorigenesis in gastric cancer. *Cancer letters* *335*, 128-135.

- Xiong, G., Deng, L., Zhu, J., Rychahou, P.G., and Xu, R. (2014). Prolyl-4-hydroxylase alpha subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition. *BMC cancer* *14*, 1.
- Xouri, G., and Christian, S. (2010). Origin and function of tumor stroma fibroblasts. *Seminars in cell & developmental biology* *21*, 40-46.
- Yan, H., Qiu, C., Sun, W., Gu, M., Xiao, F., Zou, J., and Zhang, L. (2018). Yap regulates gastric cancer survival and migration via SIRT1/Mfn2/mitophagy. *Oncology reports* *39*, 1671-1681.
- Yang, C., Tibbitt, M.W., Basta, L., and Anseth, K.S. (2014). Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nature materials* *13*, 645-652.
- Yang, L., Pang, Y., and Moses, H.L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in immunology* *31*, 220-227.
- Yang, W., Sherman, V.R., Gludovatz, B., Schaible, E., Stewart, P., Ritchie, R.O., and Meyers, M.A. (2015). On the tear resistance of skin. *Nature communications* *6*, 6649.
- Yang, W.H., Ding, C.C., Sun, T., Rupprecht, G., Lin, C.C., Hsu, D., and Chi, J.T. (2019). The Hippo Pathway Effector TAZ Regulates Ferroptosis in Renal Cell Carcinoma. *Cell reports* *28*, 2501-2508 e2504.
- Yang, X., Di, J., Zhang, Y., Zhang, S., Lu, J., Liu, J., and Shi, W. (2012). The Rho-kinase inhibitor inhibits proliferation and metastasis of small cell lung cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* *66*, 221-227.
- Yang, Y., Andersson, P., Hosaka, K., Zhang, Y., Cao, R., Iwamoto, H., Yang, X., Nakamura, M., Wang, J., Zhuang, R., *et al.* (2016). The PDGF-BB-SOX7 axis-modulated IL-33 in pericytes and stromal cells promotes metastasis through tumour-associated macrophages. *Nature communications* *7*, 11385.
- Yeung, T., Georges, P.C., Flanagan, L.A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., and Janmey, P.A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton* *60*, 24-34.
- Ying, H., Biroc, S.L., Li, W.W., Alicke, B., Xuan, J.A., Pagila, R., Ohashi, Y., Okada, T., Kamata, Y., and Dinter, H. (2006). The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Molecular cancer therapeutics* *5*, 2158-2164.
- Yonenaga, Y., Mori, A., Onodera, H., Yasuda, S., Oe, H., Fujimoto, A., Tachibana, T., and Imamura, M. (2005). Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology* *69*, 159-166.
- Youn, J.I., and Gabrilovich, D.I. (2010). The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *European journal of immunology* *40*, 2969-2975.
- Young, H.L., Rowling, E.J., Bugatti, M., Giurisato, E., Luheshi, N., Arozarena, I., Acosta, J.C., Kamarashev, J., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., *et al.* (2017). An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *The Journal of experimental medicine* *214*, 1691-1710.
- Young, K., Minchom, A., and Larkin, J. (2012). BRIM-1, -2 and -3 trials: improved survival with vemurafenib in metastatic melanoma patients with a BRAF(V600E) mutation. *Future oncology* *8*, 499-507.
- Yu, M., Peng, Z., Qin, M., Liu, Y., Wang, J., Zhang, C., Lin, J., Dong, T., Wang, L., Li, S., *et al.* (2021). Interferon-gamma induces tumor resistance to anti-PD-1 immunotherapy by promoting YAP phase separation. *Molecular cell* *81*, 1216-1230 e1219.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & development* *14*, 163-176.

- Yu, W., Yang, L., Li, T., and Zhang, Y. (2019). Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Frontiers in oncology* *9*, 989.
- Yurchenco, P.D., Amenta, P.S., and Patton, B.L. (2004). Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* *22*, 521-538.
- Yutao, X., Geru, W., Xiaojun, B., Tao, G., and Aiqun, M. (2006). Mechanical stretch-induced hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes is mediated by beta(1)-integrin-microtubule signaling pathways. *European journal of heart failure* *8*, 16-22.
- Zanotelli, M.R., and Reinhart-King, C.A. (2018). Mechanical Forces in Tumor Angiogenesis. *Advances in experimental medicine and biology* *1092*, 91-112.
- Zaretsky, J.M., Garcia-Diaz, A., Shin, D.S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., Torrejon, D.Y., Abril-Rodriguez, G., Sandoval, S., Barthly, L., *et al.* (2016). Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *The New England journal of medicine* *375*, 819-829.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer research* *67*, 10123-10128.
- Zhang, J., and Liu, J. (2013). Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics* *137*, 200-215.
- Zhang, K., Corsa, C.A., Ponik, S.M., Prior, J.L., Piwnica-Worms, D., Eliceiri, K.W., Keely, P.J., and Longmore, G.D. (2013). The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nature cell biology* *15*, 677-687.
- Zhang, K., Grither, W.R., Van Hove, S., Biswas, H., Ponik, S.M., Eliceiri, K.W., Keely, P.J., and Longmore, G.D. (2016). Mechanical signals regulate and activate SNAIL1 protein to control the fibrogenic response of cancer-associated fibroblasts. *Journal of cell science* *129*, 1989-2002.
- Zhang, W., Gao, Y., Li, P., Shi, Z., Guo, T., Li, F., Han, X., Feng, Y., Zheng, C., Wang, Z., *et al.* (2014). VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *Cell research* *24*, 331-343.
- Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research* *12*, 9-18.
- Zhang, X., Gaspard, J.P., and Chung, D.C. (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer research* *61*, 6050-6054.
- Zhang, X., Yang, L., Szeto, P., Abali, G.K., Zhang, Y., Kulkarni, A., Amarasinghe, K., Li, J., Vergara, I.A., Molania, R., *et al.* (2020). The Hippo pathway oncoprotein YAP promotes melanoma cell invasion and spontaneous metastasis. *Oncogene* *39*, 5267-5281.
- Zhang, Y., Daquinag, A.C., Amaya-Manzanares, F., Sirin, O., Tseng, C., and Kolonin, M.G. (2012). Stromal progenitor cells from endogenous adipose tissue contribute to pericytes and adipocytes that populate the tumor microenvironment. *Cancer research* *72*, 5198-5208.
- Zhang, Y., Su, J., Yu, J., Bu, X., Ren, T., Liu, X., and Yao, L. (2011). An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *26*, 604-617.
- Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.Y., and Guan, K.L. (2010a). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes & development* *24*, 72-85.
- Zhao, C.M., Hayakawa, Y., Kodama, Y., Muthupalani, S., Westphalen, C.B., Andersen, G.T., Flatberg, A., Johannessen, H., Friedman, R.A., Renz, B.W., *et al.* (2014). Denervation suppresses gastric tumorigenesis. *Science translational medicine* *6*, 250ra115.

- Zhao, X., Peng, X., Sun, S., Park, A.Y., and Guan, J.L. (2010b). Role of kinase-independent and -dependent functions of FAK in endothelial cell survival and barrier function during embryonic development. *The Journal of cell biology* *189*, 955-965.
- Zhou, D., Conrad, C., Xia, F., Park, J.S., Payer, B., Yin, Y., Lauwers, G.Y., Thasler, W., Lee, J.T., Avruch, J., *et al.* (2009). Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer cell* *16*, 425-438.
- Zhou, D., Zhang, Y., Wu, H., Barry, E., Yin, Y., Lawrence, E., Dawson, D., Willis, J.E., Markowitz, S.D., Camargo, F.D., *et al.* (2011). Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, E1312-1320.
- Zhou, J., and Giannakakou, P. (2005). Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Current medicinal chemistry Anti-cancer agents* *5*, 65-71.
- Zhou, L., Yang, K., Andl, T., Wickett, R.R., and Zhang, Y. (2015). Perspective of Targeting Cancer-Associated Fibroblasts in Melanoma. *Journal of Cancer* *6*, 717-726.
- Zhou, L., Yang, K., Randall Wickett, R., and Zhang, Y. (2016). Dermal fibroblasts induce cell cycle arrest and block epithelial-mesenchymal transition to inhibit the early stage melanoma development. *Cancer medicine* *5*, 1566-1579.
- Zhou, Q., Bauden, M., Andersson, R., Hu, D., Marko-Varga, G., Xu, J., Sasor, A., Dai, H., Pawlowski, K., Said Hilmersson, K., *et al.* (2020). YAP1 is an independent prognostic marker in pancreatic cancer and associated with extracellular matrix remodeling. *Journal of translational medicine* *18*, 77.
- Zhou, X., Liu, Y., You, J., Zhang, H., Zhang, X., and Ye, L. (2008). Myosin light-chain kinase contributes to the proliferation and migration of breast cancer cells through cross-talk with activated ERK1/2. *Cancer letters* *270*, 312-327.
- Zollinger, A.J., and Smith, M.L. (2017). Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* *60-61*, 27-37.
- Zou, J.M., Qin, J., Li, Y.C., Wang, Y., Li, D., Shu, Y., Luo, C., Wang, S.S., Chi, G., Guo, F., *et al.* (2017). IL-35 induces N2 phenotype of neutrophils to promote tumor growth. *Oncotarget* *8*, 33501-33514.
- Zuo, Q., Liu, J., Huang, L., Qin, Y., Hawley, T., Seo, C., Merlino, G., and Yu, Y. (2018). AXL/AKT axis mediated-resistance to BRAF inhibitor depends on PTEN status in melanoma. *Oncogene* *37*, 3275-3289.

ANNEXES

Annexe I :

Matrix Stiffening and EGFR Cooperate to Promote the Collective Invasion of Cancer Cells

- Résumé :

Les carcinomes épidermoïdes spinocellulaire est le 2^{ème} cancer cutané le plus fréquent et est responsable de 80% des décès parmi les cancers cutanés excluant le mélanome. A cause de l'augmentation de leur incidence, il est essentiel de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la progression. La majorité des patients atteints de carcinome spinocellulaire surexprime le récepteur EGFR, qui mène à l'activation constitutive de la voie des MAPK. Des thérapies ciblant EGFR existent mais des mécanismes de résistance se développent rapidement. Cette étude s'est intéressée aux mécanismes d'invasion collective des cellules tumorales afin d'identifier une nouvelle cible thérapeutique efficace contre ce type de cancer. Nous avons d'abord montré que la rigidité matricielle et la voie de l'EGF induisent la migration collective dans un modèle *in vitro* de culture organotypique en 3D. Un criblage d'inhibiteurs a ensuite été réalisé et a permis d'identifier la voie de signalisation calcique comme acteur principal de l'invasion des cellules tumorales, plus particulièrement le canal Ca_v1.1. L'utilisation d'inhibiteurs du canal, le verapamil et le diltiazem, diminue l'invasion collective des cellules à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ce travail montre que les canaux Ca_v1.1 peuvent être des cibles thérapeutiques pour les patients atteints de carcinomes agressifs.

Matrix Stiffening and EGFR Cooperate to Promote the Collective Invasion of Cancer Cells

Eloise M. Grasset¹, Thomas Bertero¹, Alexandre Bozec^{2,3}, Jonas Friard⁴, Isabelle Bourget¹, Sabrina Pisano¹, Margaux Lecacheur¹, Majdi Maiei¹, Caroline Bailleux³, Alexander Emelyanov³, Marius Ilie³, Paul Hofman³, Guerrino Meneguzzi¹, Christophe Duranton⁴, Dmitry V. Bulavin³, and Cedric Gaggioli¹

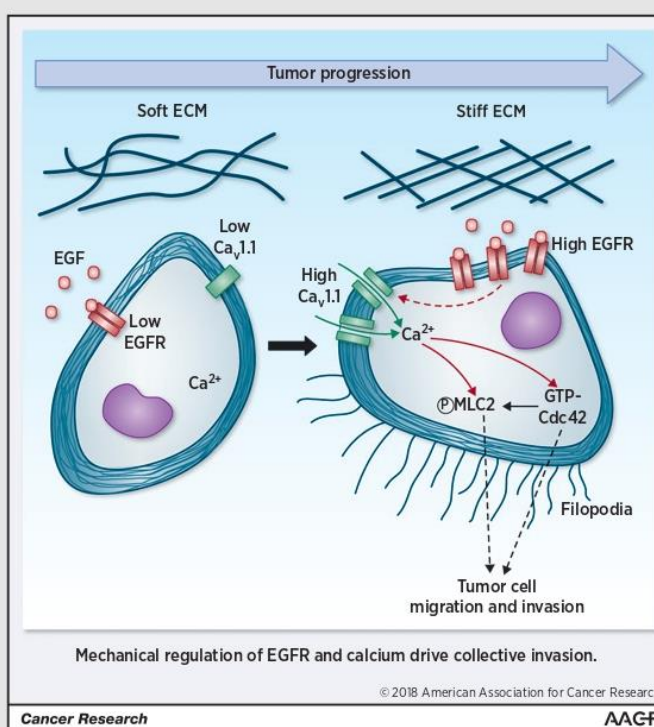


Abstract

In squamous cell carcinoma (SCC), tissue invasion by collectively invading cells requires physical forces applied by tumor cells on their surrounding extracellular matrix (ECM). Cancer-related ECM is composed of thick collagen bundles organized by carcinoma-associated fibroblasts (CAF) within the tumor stroma. Here, we show that SCC cell collective invasion is driven by the matrix-dependent mechano-sensitization of EGF signaling in cancer cells. Calcium (Ca^{2+}) was a potent intracellular second messenger that drove actomyosin contractility. Tumor-derived matrix stiffness and EGFR signaling triggered increased intracellular Ca^{2+} through $\text{Ca}_v1.1$ expression in SCC cells. Blocking L-type calcium channel expression or activity using Ca^{2+} channel blockers verapamil and diltiazem reduced SCC cell collective invasion both *in vitro* and *in vivo*. These results identify verapamil and diltiazem, two drugs long used in medical care, as novel therapeutic strategies to block the tumor-promoting activity of the tumor niche.

Significance: This work demonstrates that calcium channels blockers verapamil and diltiazem inhibit mechano-sensitization of EGFR-dependent cancer cell collective invasion, introducing potential clinical strategies against stromal-dependent collective invasion.

Graphical Abstract: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/78/18/5229/F1.large.jpg>. *Cancer Res*; 78(18); 5229–42. ©2018 AACR.



¹University Cote d'Azur, INSERM U1081, CNRS UMR7284, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), Medical School, Nice, France. ²Face and Neck University Institute, Nice, France. ³University Cote d'Azur, CAL, INSERM U1081, CNRS UMR7284, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), FHU OncoAge, CAL, Nice, France. ⁴University Cote d'Azur, CNRS-UMR7370, LP2M, LABEX ICST, Medical School, Nice, France.

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

Corresponding Author: Cedric Gaggioli, INSERM, 28 Avenue de Valombrose, Nice 06107, France. Phone: 3304-9337-7753; Fax: 3304-9337-7676; E-mail: gaggioli@unice.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0601

©2018 American Association for Cancer Research.

Introduction

Collective cancer cell invasion of the surrounding tumor micro-environment is recurrent in solid cancers, including carcinomas (1) and it occurs independently of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). In fact, collectively invading carcinoma cells retain epithelial characters (2). Recent evidences demonstrate a partial EMT reprogramming of a subset of cancer cells at the leading edge of the tumor bulk in head and neck squamous carcinomas (HNSCC; ref. 3). Indeed, collective invasion is a tissue-driven process dictated by extracellular matrix (ECM) remodeling (4, 5), which is orchestrated by carcinoma-associated fibroblasts (CAF). CAFs lead the way to cancer cells by digging tracks within the ECM that SCC cells use to invade (6). Interestingly, CAFs are crucial for

Grasset et al.

track generation, but not necessary for collective invasion once the tracks are created (6).

Track generation by CAFs requires JAK-dependent actomyosin-driven force generation on collagen fibers (7), which results in thick bundle formation (6), fiber alignment (8), and increased matrix stiffening (9). Accordingly, ECM stiffening is a characteristic of neoplastic lesions (10). ECM rigidity results from increased secretion and assembly of matrix proteins, and collagen cross-linking essentially mediated by lysyl oxidases (LOX) expression by both CAF and tumor cells (11). Consequently, ECM stiffening has been associated with increased metastases and poor clinical outcome in several epithelial cancers due to activation of mechanotransduction-dependent signaling pathways (12). CAF-driven collective invasion also relies on cytokines and growth factor signaling activation in cancer cells (13). From these observations, increasing evidences suggest a connection of mechanotransduction with receptor tyrosine kinase (RTK) signaling pathways. Upon dimerization, RTKs become activated and are involved in integrin-mediated mechanotransduction signaling, which promotes tumor progression (14). Indeed, cell-to-ECM adhesion favors EGFR (also known as ErbB-1/HER1)-dependent tumor growth, and it sensitizes EGFR intracellular signaling in cancer cells (15, 16). EGFR has been reported to be overexpressed, amplified, or mutated in SCC lesions including HNSCC and cutaneous SCC (17). In most cases, EGFR expression is positively correlated with poor patient survival, independent of therapeutic treatments (18, 19).

Ca²⁺ is one of the most important chemical elements for living organisms and Ca²⁺ signaling has been linked to a wide variety of physiologic processes. Intracellular calcium entry is tightly regulated in cells by a plethora of Ca²⁺ channels at the plasma membrane. The L-type calcium channel family is part of the high-voltage activated family of voltage-gated Ca²⁺ channel (20). They are known to be expressed in excitable cells such as in heart, muscle, and brain organs; however, they have recently been described to be overexpressed in epithelial cancer cells (21). L-type Ca²⁺ channels, also known as Ca_v1, are composed of 4 subunits (α 1, α 2 δ , β , and γ), of which α 1 is the pore-forming unit and the others are regulatory subunits. The Ca_v1 α 1 subunits (Ca_v1.1, Ca_v1.2, Ca_v1.3, and Ca_v1.4) are encoded by 4 different genes (CACNA1C, CACNA1D, CACNA1S, and CACNA1F, respectively).

In this study, we used an *in vitro* model of 3D organotypic coculture and *in vivo* model to demonstrate the interconnection between EGFR activity and ECM stiffening during collective invasion. We established L-type Ca²⁺ signaling as a mechanotransducer intracellular second messenger that drives the EGFR and matrix stiffening interplay during cancer cell collective invasion.

Materials and Methods

Cell culture

Primary human fibroblasts were isolated from foreskin of child and were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS and 2 mmol/L glutamine. Human CAFs (gift from E. Sahai, The Francis Crick Institute, London, United Kingdom) isolated from patients with head and neck carcinoma were cultured in DMEM (21969, Gibco) supplemented with 10% FCS, 2 mmol/L glutamine, and insulin-transferrin-selenium (41400-045; Invitrogen). SCC12 cells (gift from E. Sahai, The Francis Crick Institute) were cultured in FAD media (21765, Gibco), supplemented with

10% FCS, 2 mmol/L glutamine, insulin-transferrin-selenium (41400-045, Gibco) and 0.5 μ g/mL, hydrocortisone (H-0135; Sigma), hereafter referred to complete media. All cells were grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Experiments were performed at passages 3 to 10. Human cell line has been profiled using short tandem repeat and tested for *Mycoplasma* by PCR (3' YGC CTG VGT AGT AYR YWC GC and 5' GCG GTG TGT ACA ARM CCC GA) every 4 months. Hydrogels were purchased from Matrigel and coated with collagen (40 μ g/mL, 354249, Corning). Soft condition referred to cells plated on surface of 100 μ L of matrix gel for 6-well plates. Matrix gel is composed of 4 mg/mL collagen (354249, Corning), 2 mg/mL Matrigel (354234, Corning), 5x DMEM, HEPES (15630-056, Gibco), and 0.5% FCS DMEM. Stiff conditions correspond to cells cultivated on collagen (40 μ g/mL)/Matrigel (20 μ g/mL)-coated plates.

Matrix remodeling assay

CAFs (25×10^3) were embedded in 100 μ L of matrix gel (22) and seeded in triplicate into 96-well plate. After 1 hour at 37°C, vehicle or inhibitors were added in 100 μ L of 0.5% FCS media and changed every 2 days. At day 6, the relative diameter of the well and the gel were measured using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The percentage of gel contraction was calculated using the following formula: $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter})/\text{well diameter}$.

Traction force microscopy

Contractile forces exerted by clusters of 5 to 10 SCC12 cells on different stiffness gels were assessed by traction force microscopy essentially as described previously (23). Briefly, polyacrylamide substrates with shear moduli of 1 and 50 kPa (PS35-EC-1/PS35-EC-50; Matrigel) were coated with collagen (50 μ g/mL) containing fluorescent latex microspheres (18859; Polysciences). SCC12 were plated on fluorescent bead-conjugated discrete stiffness gels and grown for 24 hours. At this time, they were treated with the indicated molecules for 1 hour before traction force measurements. Images of gel surface-conjugated fluorescent beads were acquired for each cluster before and after cell removal using an Axiovert 200M motorized microscope stand (Zeiss) and a $\times 32$ magnification objective. Traction forces exerted by clusters of 5 to 10 SCC12 cells were estimated by measuring bead displacement fields, computing corresponding traction fields using Fourier transform traction microscopy, and calculating root-mean-square traction using the PIV (particle image velocity) and TFM (traction force microscopy) package on ImageJ. To measure baseline noise, the same procedure was performed on a cell-free region.

Organotypic invasion assay

CAFs (5×10^5) were embedded in 1 mL of matrix gel (6) composed of 4 mg/mL collagen and 2 mg/mL Matrigel for stiff condition, and 1 mg/mL collagen and 0.5 mg/mL Matrigel for soft condition. After 1 hour at 37°C, 5×10^5 SCC12 were plated on the top of the gel and incubated overnight. The gel was mounted on a metal bridge and fed from underneath with changes of complete media every 2 days. After 6 days, cultures were fixed (4% paraformaldehyde + 0.25% glutaraldehyde in PBS) embedded in paraffin blocks, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin. The invasion index was calculated from ImageJ measurement of the total area of SCC cells and the area of noninvading

SCC cells, index = average of $1 - (\text{noninvading area}) / \text{total area}$ of at least four fields separated minimum by 100 μm .

Patient-derived spheroids

Following excision, biopsy samples were directly transferred to freshly prepared 10% FCS, 2 mmol/L glutamine culture medium containing a mixture of antibiotic/antifungal compounds (0.26 $\mu\text{mol/L}$ amphotericin B, ampicillin 0.14 mmol/L, ciprofloxacin 7.54 $\mu\text{mol/L}$). Fresh tumor tissue samples were mechanically and enzymatically (collagenase 200 $\mu\text{g/mL}$ in PBS; Roche) digested to generate a single-cell suspension. After determination of cell viability using the trypan blue exclusion test, the single-cell suspension was directly processed into spheroids. Briefly, 50 μL droplets containing 25 to 50×10^3 cells were plated onto the underside of a 10-cm culture dish and allowed to form spheroids during 48 hours in a 37°C incubator 48 hours. The spheroids were then embedded in a collagen I/Matrigel gel mix at a concentration of approximately 4 mg/mL collagen and 2 mg/mL Matrigel for stiff condition and 1 mg/mL collagen and 0.5 mg/mL Matrigel for soft condition in 35-mm glass-bottomed cell culture plates (MatTek). The gel was incubated for at least 45 minutes at 37°C with 5% CO_2 . Then, the gel was covered with complete media. Forty-eight hours later, the spheroids were imaged with an inverted microscope at a magnification of $\times 4$ and $\times 10$. Invasion was quantified using ImageJ.

Generation of patient-derived xenografts

Tumor specimens were obtained at initial surgery (Face and Neck University Institute, Nice, France) from primary diagnosed HNSCC. None of the patients received neoadjuvant chemotherapy and/or radiotherapy. Written informed consent was obtained from each patient and the study was approved by the hospital ethics committee. Patient tumor material was collected in culture medium and partially digested during 1 hour at room temperature in RPMI 1640 with 1 mg/mL collagenase IV, 1 mg/mL dispase, and 1 mg/mL hyaluronidase. Approximately 20 to 30 mg tissue fragments in 50% Matrigel were implanted subcutaneously into the flank region of NMRI-nu (RjOrl:NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}) mice. The first passage patient-derived xenografts (PDX) were dissociated in a collagenase/dispase mixture and cells were cultured in low serum conditions (2% FBS/F12/DMEM/1 \times B27) in the presence of 5 ng/mL EGF. Subsequently, 75×10^4 cells in 50% Matrigel were implanted subcutaneously into the flank region of NMRI-nu (RjOrl:NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu) mice. One week after tumor engraftment, to avoid any interference with tumor uptake, mice were treated with the corresponding inhibitors. Gefitinib (50 mg/kg/day) was injected with PBS intraperitoneally every 2 days. BAPN (100 mg/kg/day) was dissolved in drinking water. For verapamil and diltiazem treatment (drinking water), low-dose treatment (20 mg/kg/day) started at 4 days postinjection and the final dose (50 mg/kg/day) started at 7 days postinjections. Drug containing drinking water was prepared fresh and changed 3 times a week. The dose in drinking water was determined using average daily water intake (5 mL) and mouse weight. Tumor volume was measured every day from the beginning of the treatment with the following formula: $4/3 \times \pi \times (\text{length}/2) \times [(\text{width}/2) \times 2]$.

Study approval

All animal experiments were approved by the local committee of the host institute and by the Institutional Animal Care and Use Committee (CIEPAL AZUR committee, MESR number

2016090714331137) at the University Cote d'Azur, Nice, France. All experimental procedures involving the use of human tissue included the relevant receipt of written informed consent and were approved by Institutional Review Boards. Ethical approval for this study and informed consent conformed to the standards of the Declaration of Helsinki.

Statistical analysis

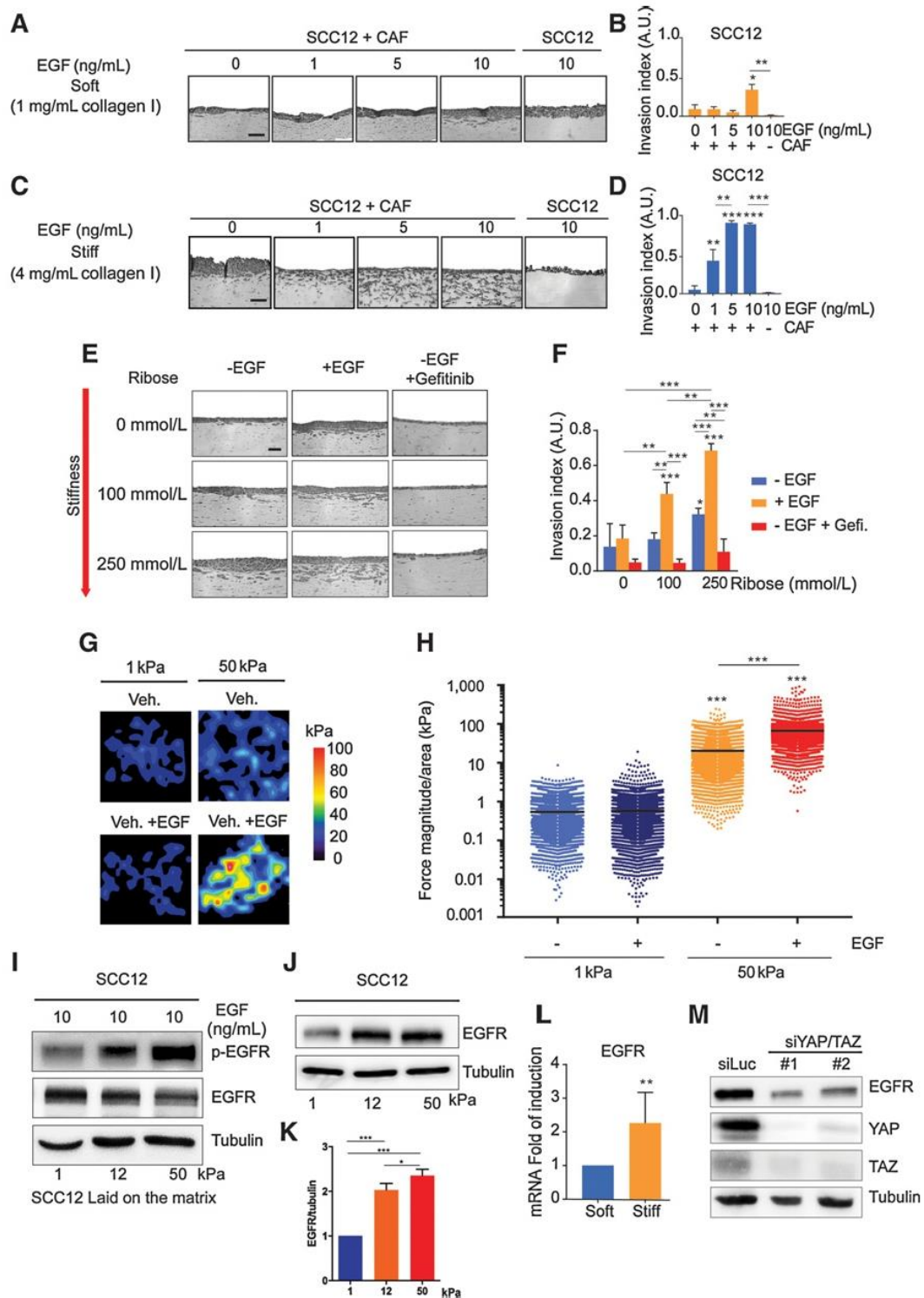
Cell culture experiments were performed at least three times independently. The number of animals in each group was calculated to measure at least a 20% difference between the means of experimental and control groups with a power of 80% and SD of 10%. The number of patient samples was determined primarily by clinical availability. Histologic analyses of both mouse and human tissue were performed in a blinded fashion. Numerical quantifications for *in vitro* experiments using cultured cells represent mean \pm SD. Numerical quantifications for physiologic experiments using mouse or human sample represent mean \pm SEM. Immunoblot images are representative of experiments that have been repeated at least three times. Quantification of immunoblot corresponds to the mean \pm SD of the different replicate. Micrographs are representative of experiments in each relevant cohort. Paired samples were compared by a two-tailed Student *t* test for normally distributed data, whereas Mann-Whitney *U* nonparametric testing was used for nonnormally distributed data. For comparisons among groups, one-way ANOVA and *post hoc* Tukey testing was performed. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant. Correlation analyses were performed by Pearson correlation coefficient calculation. The Mantel-Cox log-rank test was used for statistical comparisons in survival analyses. All statistical analyses have been performed with GraphPad Prism software.

Results

Matrix stiffness sensitizes SCC cells to EGF-dependent collective invasion

Organotypic cell invasion assays were performed using CAFs isolated from human HNSCC biopsies and an SCC cell line (SCC12) that invades collectively (24). We tuned matrix stiffness *in vitro*, either by modulating collagen concentration (Fig. 1A–D; ref. 10) or by adding ribose to the collagen gels (Fig. 1E and F; ref. 25). On soft collagen gel, collective invasion of SCC12 cells was induced at 10 ng/mL of EGF (Fig. 1A and B), whereas on stiff matrix, 1 ng/mL of EGF was sufficient to promote SCC12 cell collective invasion, but only in the presence of CAFs (Fig. 1C and D). Moreover, although increasing matrix stiffness correlated with increase of the collective invasion index at fixed EGF concentration, the basal level of collective invasion induced by stiff matrices was inhibited by the addition of gefitinib, an FDA-approved EGFR receptor tyrosine kinase inhibitor (RTKI; Fig. 1E and F). Importantly, we demonstrate that EGF does not support the ability of CAFs to physically remodel the collagen gels (Supplementary Fig. S1A). Such remodeling allows creation of proinvasive tracks in the ECM (6) and contributes to increase matrix stiffening (9). Also, the use of CAF-remodeled matrices (24) and addition to SCC12 cells, after CAF removal, demonstrated that SCC12 cells are able to collectively invade within the pre-remodeled matrix only in the presence of EGF (Supplementary Fig. S1B and S1C). Altogether, our results reveal the interplay between CAF-dependent physical remodeling of collagen fibers

Grasset et al.



and EGF-dependent SCC12 cell stimulation during collective invasion.

The Cdc42 small GTPase activity has been mechanistically implicated in the onset of the locomotory forces provided by tumor cells against the tumor microenvironment (26) and in collective SCC cell invasion (6) promoting actomyosin cytoskeletal contractility. Thus, we investigated whether in SCC12 cells Cdc42 activity might be regulated by the matrix stiffness and EGFR interplay. Accordingly, EGF stimulation prompted Cdc42 activity and myosin light chain 2 (MLC2) phosphorylation exclusively when cells were plated on stiff matrix (Supplementary Fig. S1D and S1E). Abrogation of Cdc42 expression in SCC12 cells triggered inhibition of collective cells' invasion in the presence of both EGF and CAFs (Supplementary Fig. S1F–S1H). Locomotory forces applied by SCC12 cells were measured by traction forces microscopy (27), which revealed that EGF triggers increased forces application by SCC12 on the surrounding stiff matrix only (Fig. 1G and H). We thus examined whether matrix stiffness could prime SCC12 cells to EGFR phosphorylation. SCC12 cells were either plated on collagen I-coated hydrogel with controlled stiffness (Fig. 1I) or embedded within a soft and stiff matrix (Supplementary Fig. S1I). In both conditions, a strong enhancement of EGFR phosphorylation depending on the substrate stiffness was detected in the presence of EGF (Fig. 1I; Supplementary Fig. S1I). Interestingly, increased EGFR expression at protein and mRNA levels was noted on stiff substrates in the absence of EGF (Fig. 1J–L). Moreover, inhibition of the mechano-responsive transcription factors YAP and TAZ abrogated the stiffness-dependent EGFR regulation (Fig. 1M). Together, these results support the notion that collective cancer cell invasion is triggered by mechanotransduction-dependent EGFR signaling, which leads to locomotory forces' traction onto the surrounding substrate.

Interplay between matrix stiffness and EGFR activity promotes collective invasion *in vivo*

We next investigated whether ECM stiffness and EGFR signaling also cooperate to promote SCC collective invasion *in vivo*. We subcutaneously engrafted HNSCC tumor cells isolated from patients into the flanks of nude mice. One week later, to avoid any interference with tumor uptake, mice were treated with either gefitinib or BAPN, a LOX inhibitor, or both in combination. Such *in vivo* analyses revealed that both gefitinib and BAPN treatments alone or in combination block

tumor cell collective invasion (Fig. 2A and B). AFM quantification of tumor rigidity confirmed the inhibitory effect of BAPN on ECM stiffening *in vivo* (Fig. 2C). IHC analyses by Picrosirius Red coloration and polarized light visualization of the tumors confirmed ECM remodeling and collagen bundle formation in the tumor stroma that both were inhibited in BAPN-treated mice (Fig. 2D–F). In these tumors, EGFR expression was significantly reduced, which indicated that tumor cells increased EGFR expression in response to ECM stiffening (Fig. 2D–F). A strong reduction of the tumor volume was also noticed in the treated mice compared with control (Supplementary Fig. S2A).

The crucial role of matrix stiffening and EGF cooperation in tumor invasion was further assessed using a patient-derived multicellular spheroid model of HNSCC cells invasion *in vitro*. Spheroids composed of cells isolated from fresh human HNSCC tumor biopsies were embedded in either soft or stiff collagen-rich matrices. Assessment of tumor cell invasion demonstrated that stiff matrix promotes cancer cell invasion dependent on EGFR activity in all the tested patient biopsies (Fig. 2G and H). These experimental data were finally corroborated by IHC analyses of 48 human HNSCC biopsies. EGFR was overexpressed in tumor cells specifically at the tumor–stroma interface, and a positive correlation between cross-linked collagen bundles and EGFR expression was established by Picrosirius Red coloration visualized under polarized light (Fig. 2I and J). Together, these results support the notion that tumor stiff extracellular matrix mechanosensitizes SCC cells to the EGFR-dependent collective invasion both *in vitro* and *in vivo*.

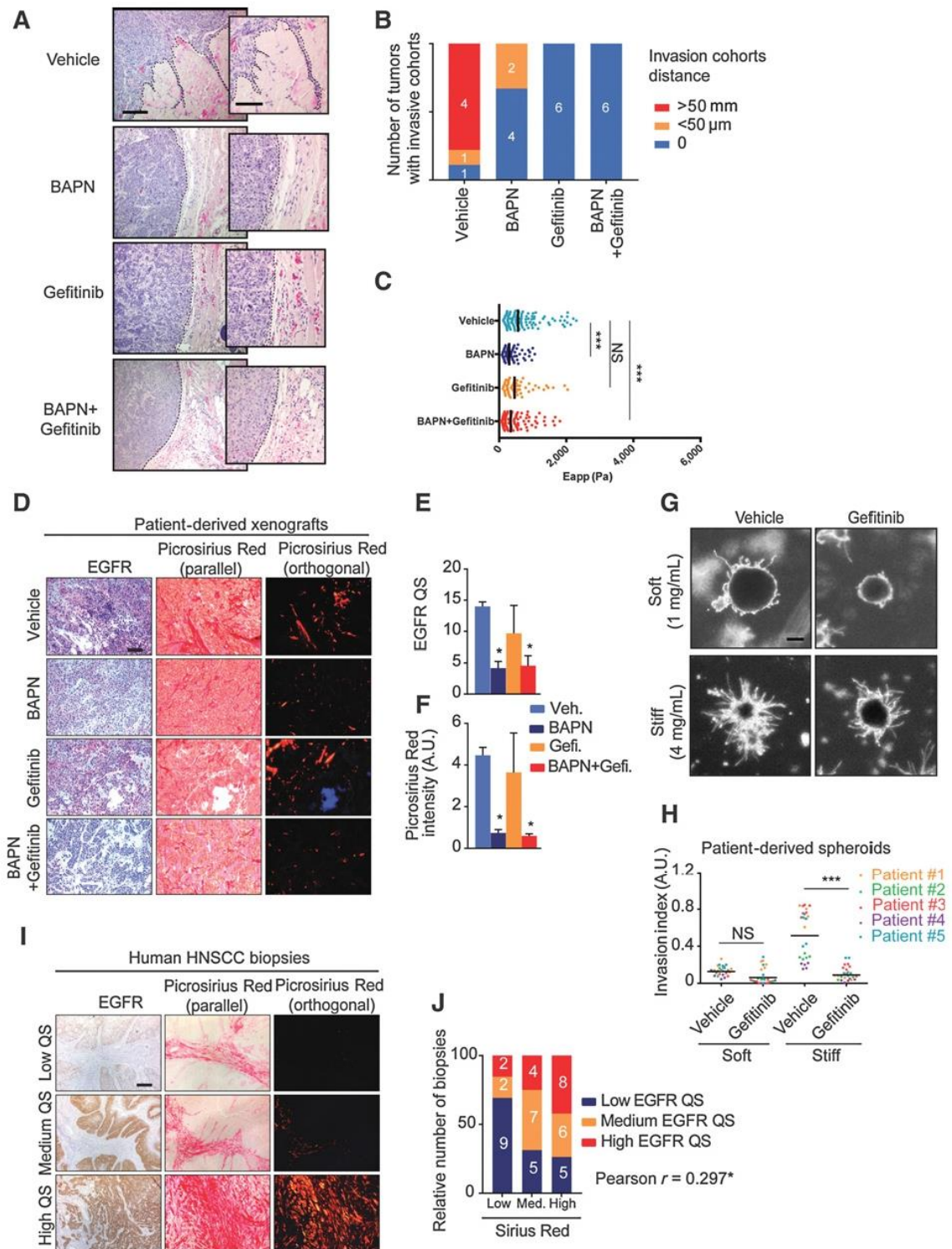
L-type calcium channel $Ca_v1.1$ triggers matrix stiffness and EGFR interplay for collective invasion

Identification of the molecular mechanisms driving tumor cell collective invasion downstream of ECM stiffness and EGFR signaling would provide valuable insight in tumor cell biology. In addition, it might lead to the discovery of novel molecular targets for therapeutic approaches in patients with SCC. Invasion assays on stiff matrices in the presence of CAFs and EGF were thus performed to screen for FDA-approved pharmacologic compounds able to inhibit SCC12 cell collective invasion. The cell toxicity of 380 chemical compounds was evaluated on SCC12 cells and CAFs after 4-day exposure to 10 $\mu\text{mol/L}$ final concentration of each single drug. Sixty-seven molecules that inhibited at least 40% of the cell mitochondrial activity were discarded (Supplementary Fig. S3A; Supplementary Table S1). The remaining

Figure 1.

Matrix stiffness and EGFR cooperate to promote collective invasion. **A**, Hematoxylin and eosin coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 organotypic culture in response to EGF in presence or absence of CAF in soft matrices. Median rigidity of soft gel measured by AFM is 0.2345 kPa. Scale bar, 100 μm . **B**, Quantification of SCC12 cells invasion index shown in **A** ($n = 3$; mean \pm SD). **C**, Hematoxylin and eosin coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 organotypic culture in response to EGF in the presence or absence of CAF in stiff matrices. Median rigidity of stiff gel measured by AFM is 14.70 kPa. Scale bar, 100 μm . **D**, Quantification of SCC12 cells invasion index shown in **B** ($n = 3$; mean \pm SD). **E**, Hematoxylin and eosin coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 organotypic culture in response to different ribose concentration, in the presence or not of EGF and gefitinib. Median rigidity of gels measured by AFM is 0.2345, 1.06, and 1.26 kPa for gels containing 0, 100, and 250 mmol/L ribose, respectively. Scale bar, 100 μm . **F**, Quantification of SCC12 cells invasion index shown in **E** ($n = 3$; mean \pm SD). **G**, Heatmap of SCC12 cells traction forces applied on 1 or 50 kPa hydrogels in the presence or absence of EGF (5 ng/mL). **H**, Quantification of SCC12 cells' traction forces shown in **G**. Bars correspond to the medians (representative of three independent experiments). **I**, Immunoblot of p-EGFR and total EGFR in SCC12 cells plated on 1, 12, or 50 kPa hydrogels stimulated EGF for 1 hour. Immunoblot of tubulin shown as control. **J**, Immunoblot of total EGFR in SCC12 cells plated on 1, 12, or 50 kPa hydrogels for 48 hours. Immunoblot of tubulin shown as control. **K**, Quantification of EGFR expression in response to substratum rigidity shown in **J** (fold of induction relative to 1 kPa). **L**, Histogram of qRT-PCR quantification of EGFR mRNA in SCC12 cells plated on soft and stiff matrices after 48 hours ($n = 3$; mean \pm SD). **M**, Immunoblot of total EGFR, YAP, and TAZ in SCC12 cells plated on stiff matrices following RNAi targeting YAP and TAZ transfection. Immunoblot of tubulin shown as control. For all data, paired samples were compared by two-tailed Student *t* test, whereas one-way ANOVA and *post hoc* Tukey tests were used for group comparisons (NS, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). A.U., arbitrary unit.

Grasset et al.



313 compounds targeting kinases, phosphatases, ion channels, nuclear receptors, epigenetic, and the Wnt signaling were further screened to assess their capacity to block SCC12 cell collective invasion *in vitro*. A total of 48 small molecules, which inhibited SCC12 cell collective invasion by at least 50% compared with control DMSO, were identified (Fig. 3A; Supplementary Table S2). To distinguish between molecules that specifically block SCC cell invasion but not the CAF proinvasive activity, ECM remodeling assays based on matrix contraction were performed using CAF cells alone (6). Thirty-four of the 48 selected small molecules displayed no significant blocking activity of CAF proinvasive ECM remodeling (Supplementary Fig. S3B; Supplementary Table S3). A Metascape analysis of all the known molecular target genes for the remaining 34 compounds revealed that 14 of them are calcium (Ca^{2+}) channel inhibitors (Supplementary Table S4). Accordingly, Ca^{2+} channel signaling was the best candidate pathway to be targeted to inhibit SCC12 cell collective invasion *in vitro* (Fig. 3B). Because 9 of them are inhibitors of L-type Ca^{2+} channels, the role of this family of Ca^{2+} channel in SCC invasion was further investigated.

To validate the possible role of L-type Ca^{2+} channels in SCC12 cell collective invasion, two Ca_v1 calcium channel blockers (CCB) were selected: the phenylalkylamine verapamil and the nondihydropyridine diltiazem. Both drugs are administered to patients as cardiac antiarrhythmic or antihypertensive therapeutic agents. At experimental level, these two compounds efficiently inhibit SCC12 cell collective invasion in a dose-dependent manner (Fig. 3C and D; Supplementary Fig. S3C), without affecting CAF-dependent proinvasive ECM remodeling (Supplementary Fig. S3D). To identify the specific isoform of the L-type Ca^{2+} channels mediating SCC12 cell collective invasion, expression of each $\alpha 1$ subunit was depleted in SCC12 cells by a SMARTpool RNAi approach. $\text{Ca}_v1.1$ was specifically identified (Supplementary Fig. S3E and S3F) and validated using two independent RNAi sequences (Fig. 3E–G). Collectively, these results reveal the L-type Ca^{2+} channel $\text{Ca}_v1.1$ as a critical regulatory element of SCC12 cell collective invasion downstream of ECM stiffness and EGFR signaling *in vitro*.

Interplay between matrix stiffness and EGFR signaling regulates $\text{Ca}_v1.1$ expression and induces calcium entry in epithelial cancer cells

So far, the molecular mechanisms leading to L-type Ca^{2+} channel expression in epithelial cancer cells are unknown. We hypothesized that $\text{Ca}_v1.1$ expression is regulated by the interplay between matrix stiffness and EGFR signaling. Accordingly, expression of $\text{Ca}_v1.1$ protein was induced only when SCC12 cells were

plated on stiff matrix in the presence of EGF. In contrast, $\text{Ca}_v1.1$ expression was undetectable even at high EGF concentration when cells were plated on soft matrix (Fig. 4A–D). Moreover, upregulation of $\text{Ca}_v1.1$ occurred at the mRNA level in tumor cells plated on stiff matrix in the presence of EGF (Fig. 4E). These observations suggest a complex mechanism of regulation governing $\text{Ca}_v1.1$ expression in epithelial cancer cells. We next explored whether $\text{Ca}_v1.1$ calcium channel in SCC12 is functional. The Ca^{2+} flux in SCC12 was thus quantified by conducting Fura 2 (fluorescent Ca^{2+} probe) experiments in response to matrix stiffness. Ca^{2+} entry was significantly increased in SCC12 cells grown on stiff matrix compared with those seeded on soft counterparts upon EGF stimulation. Moreover, the steady state of intracellular Ca^{2+} concentration resulted independent from ECM stiffness, but it reached maximal responses when EGF was applied to the cells grown on stiff matrix (Fig. 4F and G; Supplementary Fig. S4A and S4B). In addition, blocking of $\text{Ca}_v1.1$ activity using both verapamil and diltiazem reduced Ca^{2+} entry to rates comparable with those observed in cells plated on soft matrix (Fig. 4F and G). Specifically, the role of $\text{Ca}_v1.1$ was confirmed by RNAi-mediated knockdown. Indeed, loss of $\text{Ca}_v1.1$ expression recovered a Ca^{2+} entry in the cytoplasm at levels similar to those induced by EGF in cells grown on soft matrix (Supplementary Fig. S4C and S4D). These results demonstrated the presence of a functional $\text{Ca}_v1.1$ L-type calcium channel, whose expression is upregulated by EGFR signaling in SCC12 plated on stiff matrix, resulting in increased Ca^{2+} entry in the cytosol.

$\text{Ca}_v1.1$ expression was then evaluated in tumor biopsies of the engrafted HNSCC tumor mice by immunostaining. We disclosed the presence of $\text{Ca}_v1.1$ in the tissue area positive for EGFR staining. Interestingly, in mice treated with BAPN and gefitinib, either alone or in combination, $\text{Ca}_v1.1$ staining in the tumor tissue was significantly reduced (Supplementary Fig. S4E and S4F). Finally, $\text{Ca}_v1.1$ expression in sections from the 48 human HNSCC tumors was found to correlate with EGFR expression and collagen cross-linking (Fig. 4H–J). These results show that in human tumor tissue sections, expression of the $\text{Ca}_v1.1$ L-type Ca^{2+} channel is essentially located in the cells at the interface with the tumor ECM.

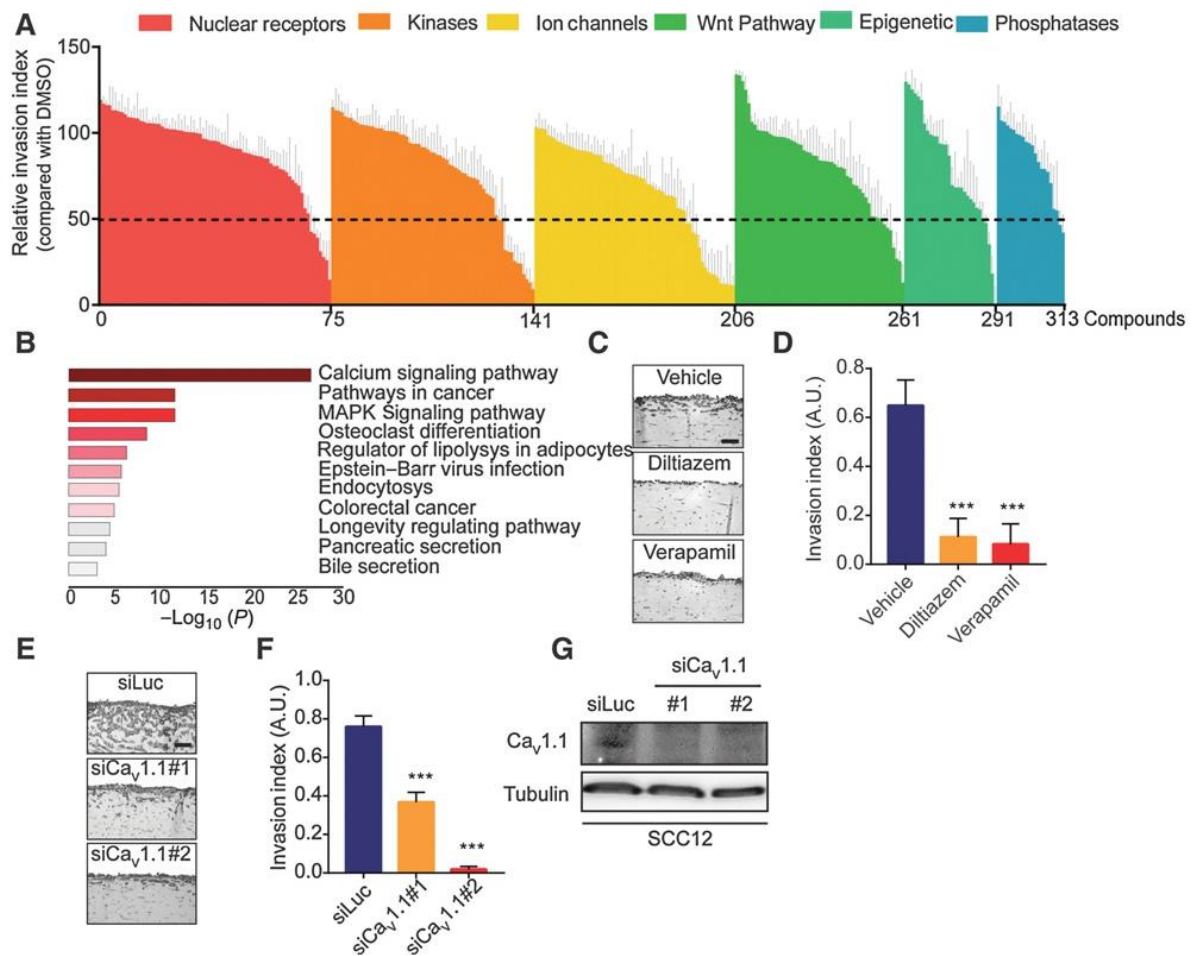
Ca_v1 -dependent calcium signaling mediates actomyosin contractility in response to ECM stiffening

We found that inhibition of $\text{Ca}_v1.1$ expression suppresses SCC12 cell collective invasion promoted by the cooperation between EGFR and ECM stiffness (Fig. 3). We thus investigated the role of $\text{Ca}_v1.1$ in the actomyosin contractility. The role of $\text{Ca}_v1.1$ and Ca^{2+} in actin cytoskeleton organization of SCC12

Figure 2.

Matrix stiffness and EGFR cooperate to promote collective invasion *in vivo*. **A**, Representative hematoxylin and eosin pictures of human patient-derived HNSCC tumors showing collective invasion in control, BAPN, gefitinib or BAPN, and gefitinib-treated group mice. Scale bar, 200 μm . **B**, Quantification of tumors presenting invading cell cohorts shown in **A** ($n = 6$ tumors/group). **C**, Atomic force microscopy quantification of tissue rigidity (in Pascal) from tumor shown in **A**. Median quantification was performed on 3 to 5 anatomic regions from frozen sections of three independent tumors for each group. Outliers data points above 2,500 Pa were removed for quantification. **D**, Representative picture of EGFR immunostaining and Sirius Red-stained collagen bundles observed under polarized light of PDX. Scale bar, 200 μm . **E**, Quantification of EGFR expression shown in **D** [Quick Score (QS) method, $n = 2$ for 3 individual PDXs; mean \pm SEM]. **F**, Quantification of fibrillar collagen shown in **D**. ($n = 2$ for 3 individual PDXs; mean \pm SEM). **G**, Representative pictures of human patient-derived HNSCC multicellular spheroids embedded in soft or stiff matrices in the presence or absence of gefitinib (5 $\mu\text{mol/L}$). Scale bar, 200 μm . **H**, Quantification of HNSCC multicellular spheroid invasion shown in **G** ($n = 5$ for 5 individual patients; bars correspond to mean). **I**, Representative picture of EGFR expression (measured by the Quick Score method) and collagen fibrillar deposition in a cohort of 48 patients with HNSCC (scale bar, 200 μm), classify between low ($\text{QS} \leq 8$), medium ($8 < \text{QS} \leq 12$), and high ($12 < \text{QS}$) EGFR expression. **J**, Relative number of patient biopsies (shown in **I**) classified between EGFR QS and Sirius Red intensity. White numbers represent the real number of biopsies per conditions. A Pearson correlation was performed. For all data, paired samples were compared by two-tailed Student *t* test, whereas one-way ANOVA and *post hoc* Tukey tests were used for group comparisons (NS, not significant; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$). A.U., arbitrary unit.

Grasset et al.

**Figure 3.**

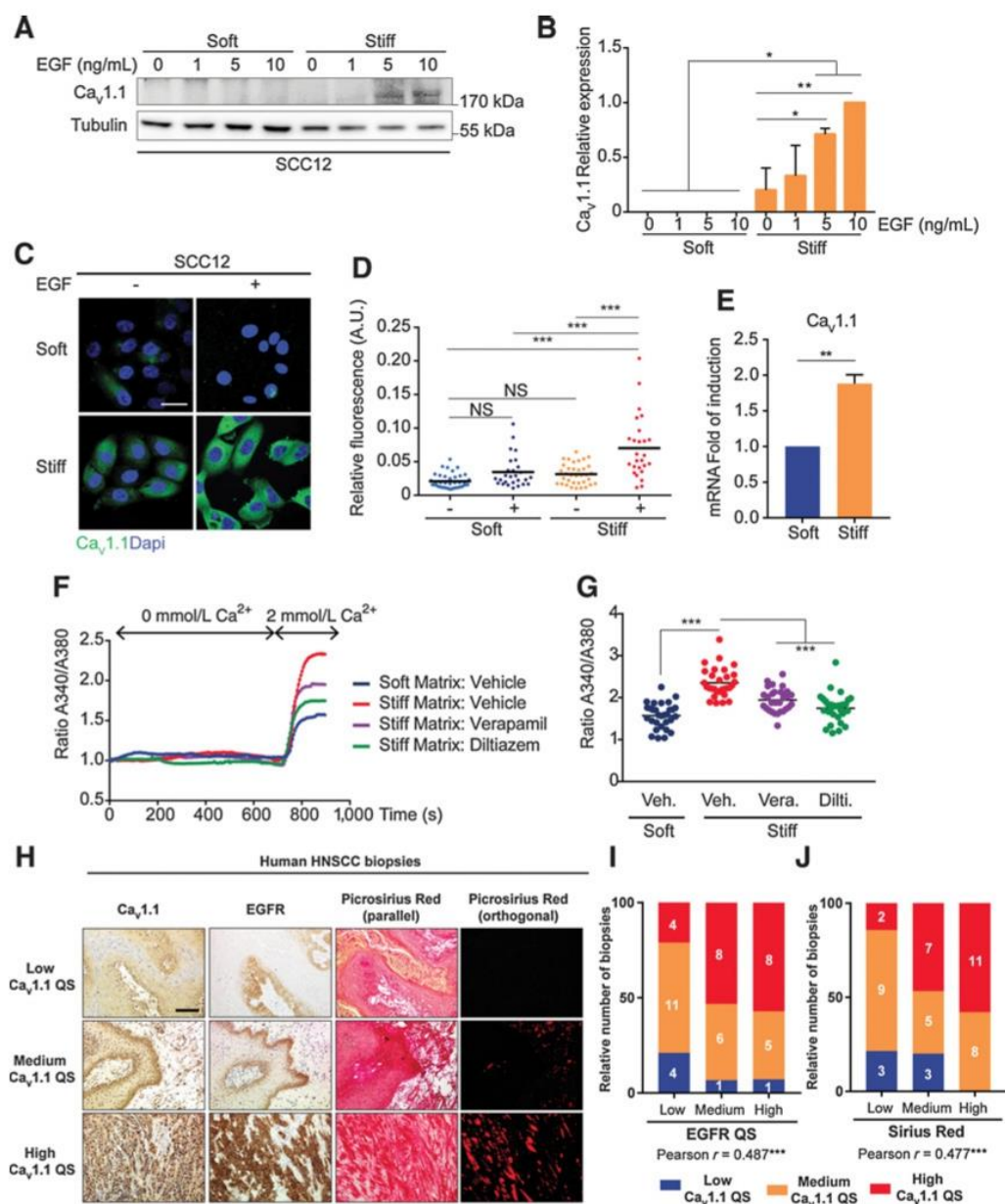
The L-type calcium channel $Ca_v1.1$ triggers EGF-dependent SCC cell collective invasion. **A**, Quantification of organotypic invasion assay screening, performed with SCC12 cells in the presence of HNFCA, EGF (10 ng/mL), and stiff matrix, with all nontoxic selected molecules (10 μ mol/L final concentration) classified by libraries ($n = 1$; mean + SD of 4 pictures). Dotted bar represents the threshold used to select molecules that efficiently blocked SCC12 invasion (50% of inhibition). **B**, Metascape analysis (using Kegg pathways enrichment) of the targeted genes triggered by the 34 inhibitors identified for blocking SCC12 invasion but not CAF matrix remodeling. **C**, Hematoxylin and eosin coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 invasion assays in the presence or not of diltiazem (30 μ mol/L) and verapamil (15 μ mol/L). Scale bar, 100 μ m ($n = 3$; mean + SD). **D**, Quantification of SCC12 cells' organotypic invasion index shown in **C**. **E**, Hematoxylin and eosin coloration of paraffin-embedded sections of organotypic culture of SCC12 cells transfected with two different siRNA against $Ca_v1.1$ or siRNA against luciferase for control. Scale bar, 100 μ m. **F**, Quantification of the invasion index of SCC12 cells shown in **E** ($n = 3$; mean + SD). **G**, Immunoblot of $Ca_v1.1$ in SCC12 cells corresponding to the assay presented in **G**. Tubulin was used as control. For all data, paired samples were compared by two-tailed Student *t* test, whereas one-way ANOVA and *post hoc* Tukey tests were used for group comparisons (NS, not significant; ***, $P < 0.001$). A.U., arbitrary unit.

cells was first explored. A cortical actin organization was correlated with increased actin-rich microspikes formation in response to EGF and matrix stiffness cooperation (Fig. 5A and B), which was abolished by the addition of verapamil and diltiazem (Fig. 5A and B). We next determined whether Ca^{2+} prompted locomotory forces induced by EGF in SCC12 cells on stiff matrix. The increased forces applied by SCC12 cells stimulated with EGF that were observed in the control were reduced by the addition of diltiazem or verapamil (Fig. 5C and D) concomitantly with the abrogation of both Cdc42-GTP loading and MLC2 phosphorylation induced by EGF (Fig. 5E–H). Overall, these data show that intracellular Ca^{2+} entry through L-type calcium channels in SCC12 cells

mediates actomyosin contractility and Cdc42 activity in epithelial cancer cells, leading to increased locomotory forces and collective invasion.

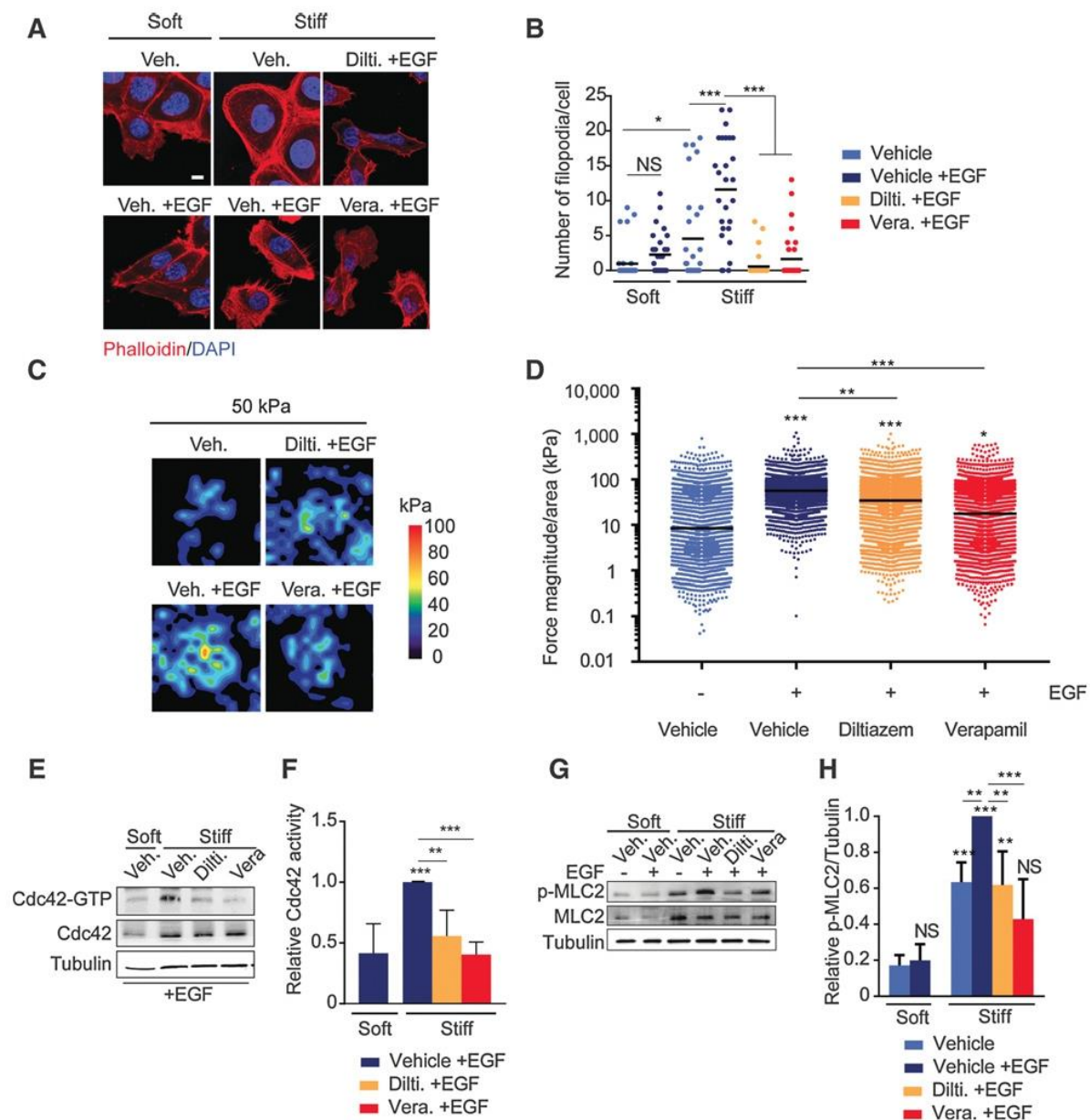
Diltiazem and verapamil prevent SCC collective invasion *in vivo*

Inhibition of Ca^{2+} signaling prevents SCC cell invasion *in vitro*, which implies that counteracting Ca^{2+} influx in cancer cells may lead to inhibition of tumor cell invasion *in vivo*. To verify this possibility, we determined whether inhibition of the L-type-dependent Ca^{2+} influx influenced human HNSCC tumor cell invasion both *in vitro* and *in vivo*. HNSCC multicellular spheroids were embedded in stiff matrix gel in culture media supplemented

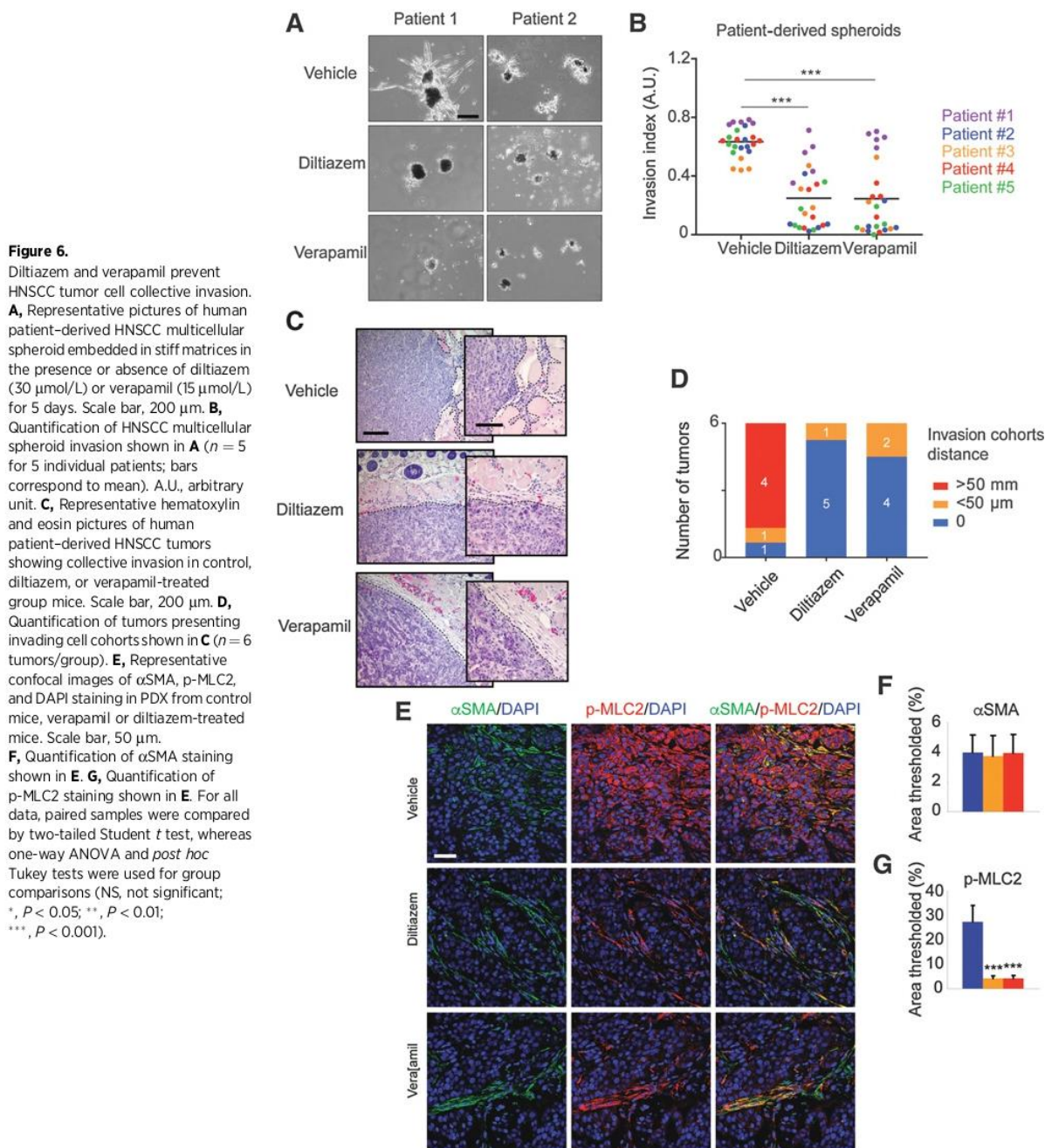
**Figure 4.**

EGFR signaling and matrix stiffness regulate Ca_v1.1 expression and activity. **A**, Representative immunoblot of Ca_v1.1 in SCC12 cells plated 3 days on soft or stiff matrices in the presence or absence of EGF. Tubulin was used as control. **B**, Quantification of Ca_v1.1 relative to tubulin in three immunoblots performed in the same conditions as in **A** ($n = 3$; mean \pm SD). **C**, Representative confocal merged images of Ca_v1.1 and DAPI staining in SCC12 plated for 3 days on soft or stiff matrices in the presence or absence of EGF (5 ng/mL). Scale bar, 40 μ m. **D**, Quantification of Ca_v1.1 staining from experiment shown in **C**. Bars represent the mean and each dot the relative fluorescence of Ca_v1.1 in a SCC12 cell ($n = 30$ cells at least). A.U., arbitrary unit. **E**, mRNA fold of induction measured by qPCR of Ca_v1.1 (CACNA1S) in SCC12 cells cultivated on soft matrix for 3 days and then plated on stiff matrix for 3 hours ($n = 3$; mean \pm SD). **F**, Ca²⁺ entry in SCC12 cells plated for 3 days on soft or stiff matrices, stimulated by 5 ng/mL of EGF during the experiment, in the presence or absence of verapamil (15 μ mol/L) or diltiazem (30 μ mol/L) for 30 minutes before the experiment. Representative data of three independent experiments. **G**, Representation of Ca²⁺ level measured at the end of the experiment shown in **C**. Bars correspond to the mean and each dot represents Ca²⁺ measurement in a cell ($n = 30$ cells at least). **H**, Pictures of Ca_v1.1 and EGFR immunostaining [measured by the Quick Score (QS) method] and collagen fibrillar deposition in a cohort of 48 patients with HNSCC (scale bar, 200 μ m) classify between low (QS ≤ 8), medium ($8 < \text{QS} \leq 12$), and high ($12 < \text{QS}$) Ca_v1.1 expression. **I**, Relative number of patient biopsies (shown in **H**) classified between Ca_v1.1 and EGFR QS. **J**, Relative number of patient biopsies (shown in **H**) classified between Ca_v1.1 and Sirius Red intensity. White numbers represent the real number of biopsies per conditions. A Pearson correlation was performed. For all data, paired samples were compared by two-tailed Student *t* test, whereas one-way ANOVA and *post hoc* Tukey tests were used for group comparisons (NS, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Grasset et al.

**Figure 5.**

L-type-dependent Ca^{2+} entry regulates actomyosin contractility in SCC cells. **A**, Representative confocal merged images of phalloidin and DAPI staining in SCC12 cells plated 3 days on soft or stiff condition, with or without EGF (5 ng/mL), diltiazem (30 $\mu\text{mol/L}$), or verapamil (15 $\mu\text{mol/L}$). Scale bar, 20 μm . **B**, Quantification of the number of filopodia per cells represented in **A**. Bars correspond to the mean and each dot represents the number of filopodia in one cell ($n = 30$ cells at least; representative experiment of three independent experiments). **C**, Heatmap of SCC12 cells' traction forces applied on 50 kPa hydrogels in the presence or absence of EGF (5 ng/mL), diltiazem (30 $\mu\text{mol/L}$), or verapamil (15 $\mu\text{mol/L}$). **D**, Quantification of SCC12 cells' traction forces corresponding to **C**. Bars correspond to the medians (representative data of three independent experiments). **E**, Immunoblot of Cdc42-GTP pull-down assay in SCC12 cells plated 3 days on soft or stiff matrices and stimulated 5 minutes with 5 ng/mL EGF in presence or absence of diltiazem or verapamil. Cdc42 total and tubulin were used as control. **F**, Quantification of Cdc42-GTP/Cdc42 from three independent experiments performed in the same conditions as in **E**. **G**, Immunoblot of p-MLC2 in SCC12 cells plated in the same conditions as in **E**. MLC2 and tubulin were used as control. **H**, Quantification of p-MLC2/tubulin of three independent experiments performed as in **G**. For all data, paired samples were compared by two-tailed Student t test, whereas one-way ANOVA and *post hoc* Tukey tests were used for group comparisons (NS, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).



with EGF to assess their invasion capacity. Addition of verapamil or diltiazem to the patient-derived spheroid cultures drastically reduced the invasiveness of the tumor cells (Fig. 6A and B). Then, the anti-invasive potential of both diltiazem and verapamil was tested *in vivo* using human HNSCC patient cells subcutaneously engrafted on nude mice. Four days after injection, the mice were pretreated with verapamil and diltiazem in drinking water at low doses (20 mg/kg/day). Administration of full inhibitory doses

started 3 days later (7 days postinjection). Tumor growth was significantly reduced in the treated mice compared with the controls (Supplementary Fig. S5A). Immunohistologic analyses of the tumors demonstrated that both verapamil- and diltiazem-treated mice presented less collectively invading tumor cells compared with the untreated control mice (Fig. 6C and D). In control tumors, presence of stromal αSMA -positive cells correlated with robust MLC2 phosphorylation staining. In contrast,

Grasset et al.

tumors developed in verapamil- or diltiazem-treated mice presented reduced levels of pMLC2 (Fig. 6E–G). Both verapamil and diltiazem, therefore, display a strong antitumor activity toward the development of invasive human tumors *in vivo*.

Discussion

Fibroblast activation in cancer leads to the emergence of carcinoma-associated fibroblasts that produce a variety of different procarcinogenic components, which results in pleiotropic actions on the tumor cells (28). CAFs support each step of the neoplastic development from tumor initiation to metastatic spreading (29, 30). CAFs lead the way of collectively invading epithelial carcinoma cells by digging tracks within the ECM that tumor cells use to invade (6). Thus, cancer cell invasion and tumor progression rely on complex communication networks that involve a variety of noncancerous cells and noncellular components found within the tumor microenvironment. Most studies agree that CAF-enriched tumor stroma supports tumor progression and invasion, either through secretion of carcinogenic molecules (28) or physical matrix organization and stiffening (8, 10). Here, we uncover a novel cross-talk mechanism by which matrix stiffening mechano-sensitizes human SCC cells to EGFR-driven invasiveness. We show that SCC cells, in response to matrix stiffening, increase EGFR expression, thus sensitizing carcinoma cells to EGFR phosphorylation, which results in actomyosin contractility and collective invasion. Modulation of matrix stiffening was obtained by increasing collagen I concentration (Fig. 1A–D), which also results in microscale matrix parameter modification that critically regulates cell invasion, such as pore size, fiber architecture, local material deformability, and out-side-in signaling pathways in cancer cells (31). Thus, to confirm the critical role of matrix rigidity specifically, we conducted key experiments in collagen I matrices of different rigidity using both ribose-dependent collagen glycation and hydrogels (25), which confirmed that collective invasion is driven by the mechanical regulation of EGFR activity (Fig. 1E–J). Altogether, this work provides evidence that mechanical matrix property regulates EGFR signaling and collective invasion of squamous cell carcinoma.

Blocking EGFR activity, using the FDA-approved RTKi gefitinib, results in inhibition of both SCC12 cell collective invasion and tumor development *in vivo*. However, it is admitted that EGFR-targeting therapies fail to improve the patients' survival (32). It has been noted that more than 40% of HNSCC lesions present SNP in *EGFR* gene, which leads to EGFR-targeted therapy resistance (33). Moreover, blocking EGFR induces EMT and CAF activation in HNSCC tumors (34). Nevertheless, the EGFR signaling pathways remain interesting pharmaceutical targets because of the high level of *EGFR* amplification and genetic mutations found in patients with cancer (35).

Our work aimed to target the molecular mechanisms downstream the EGFR signaling in cancer cell collective invasion. Screening for small molecules in organotypic culture assays identified the L-type CCBs verapamil and diltiazem as potent cancer invasion inhibitors. Further experiments highlighted the role of Ca_v1.1 L-type channel isoform downstream of the cooperation between EGFR and stiff ECM in SCC cells. Overall, our screening approach led to the identification of 48 inhibitors that block SCC12 cell collective invasion that represented 16% of the total library. Among the 48 identified compounds that actively

inhibit SCC12 cell invasion, 14 of them (29.2%) target the CAF proinvasive activity, and 34 (70.8%) the SCC12 cells. Among these latter, 14 (41.2%) were calcium channel inhibitors, and 9 (26.5%) of them specifically target L-types Ca²⁺ channels. Undoubtedly, deregulated Ca²⁺ homeostasis is observed in various disorders, including cancers (20, 36). In solid cancers, Ca²⁺ signaling has been linked to metastasis formation by controlling several fundamental aspects of cancer cell behavior, such as EMT (37, 38), migration (39), angiogenesis, and intravasation (40). Alterations in the expression of specific Ca²⁺ channels have been reported in several cancer types (41, 42), including HNSCC and colon (39, 43, 44), where it sustains Ca²⁺-sensitive oncogenic pathways. We identified the Ca_v1.1 Ca²⁺ channel as a downstream signaling molecule of the EGFR-dependent tumor cell collective invasion in HNSCC carcinomas. We also show a preferential Ca_v1.1 expression in cells at the edge with the matrix in human tumor samples biopsies. Because other L-type Ca²⁺ channels are expressed in epithelial cancer cells (39, 44), the broad spectrum of action of verapamil and diltiazem reinforces their potential therapeutic use in epithelial cancers.

This work reinforces the crucial role of the Cdc42 small GTPase activity in SCC12 cell collective invasion. We have previously shown that a Cdc42/MRCK signaling pathway, and not the RhoA/ROCK signaling pathway, drives actomyosin contractility in SCC12 cells (6). Here, we propose that increased substratum rigidity in tumor tissue favors EGFR tyrosine kinase activity and leads to a Ca²⁺-dependent regulation of the Cdc42 small GTPase activity in cancer cells. Such a signaling route seems crucial for the capacity of the cells to generate and apply forces to the substrata, which allows tumor cell collective strands to invade. Interestingly, the myosin light chain kinase (MLCK), a fundamental regulator of actomyosin contractility in cells (45), does not play a role in SCC12 cell collective invasion; however, it regulates actomyosin-dependent ECM remodeling in CAF cells (Supplementary Tables S2 and S3). Such a differential regulation observed in tumor and stromal cells demonstrates that additional comprehensive work must be addressed to identify a single molecular target for therapeutic purpose that could block actomyosin activity in both cell types.

The major ligands of EGFR are EGF, heparin binding-EGF, TGF α , amphiregulin, epiregulin, epigen, and betacellulin (46). Tumor-associated macrophages are a prominent source of EGF in the tumor microenvironment, and their presence is associated with poor prognosis in multiple cancers (47). Although our work specifically focuses on the downstream activation of the EGFR in SCC, we can speculate that other EGFR ligands may be implicated in this process. Also, it has been reported that adhesion to ECM could lead to activation of several growth factors, including EGFR, in the absence of ligand (48, 49), which might explain that addition of gefitinib inhibits the basal level of collective invasion we observed in response to stiffness alone.

Verapamil and diltiazem are known to inhibit multidrug resistance pumps, implicated in chemoresistance (50). We provide evidence that treatment with either verapamil or diltiazem reduces SCC tumor invasion *in vitro*, *in vivo*, and in patient primary cells. These properties of the two drugs are novel, despite the fact that verapamil and diltiazem have been used in medical care for decades. Indeed, the clinical relationship between carcinoma progression and nondihydropyridine CCBs in patients was never reported so far. However, verapamil was tested in patients in combination with traditional chemotherapy by intra-arterial

infusion at high concentrations. This protocol improved the treatment efficacy without any side effects with positive effects on the patients' survival and quality of life (51–53), whereas the EGFR-targeted therapies induced severe side effects, including cutaneous (54) or pulmonary toxicity (55).

In conclusion, our work demonstrates that targeting the main downstream second messenger of EGFR signaling in cancer results in inhibition of tumor cell collective invasion both *in vitro* and *in vivo*. In particular, targeting L-type Ca^{2+} channels in SCC lesions could open novel therapeutic strategies to block the tumor-promoting activity of the tumor niche with reduced risks of resistance to treatments.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: E.M. Grasset, T. Bertero, I. Bourget, M. Lecacheur, C. Gaggioli

Development of methodology: E.M. Grasset, I. Bourget, P. Hofman, C. Duranton, C. Gaggioli

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): E.M. Grasset, T. Bertero, A. Bozec, J. Friard, I. Bourget, S. Pisano, M. Lecacheur, C. Bailleux, A. Emelyanov, M. Ilie, P. Hofman, G. Meneguzzi, C. Duranton, D.V. Bulavin, C. Gaggioli

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): E.M. Grasset, T. Bertero, S. Pisano, M. Lecacheur, C. Duranton, C. Gaggioli

Writing, review, and/or revision of the manuscript: E.M. Grasset, P. Hofman, G. Meneguzzi, C. Duranton, C. Gaggioli

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): E.M. Grasset, I. Bourget, M. Maieil, D.V. Bulavin, C. Gaggioli

Study supervision: C. Gaggioli

Acknowledgments

The authors acknowledge the IRCAN's Molecular and Cellular Core Imaging Facility (PICMI), the Histology core facility, the IRCAN Animal core facility, and the Genomic core facility. The IRCAN facilities were supported financially by the Région PACA, Cancerpole PACA, the EEC ERC program, and the "Conseil Général 06." We thank E. Selva (Hospital-Integrated Tumor Biobank, Pasteur Hospital, Nice, France) for providing the tumor samples. We thank Dr. E. Boulter for his help on the locomotory forces quantification. This work was supported by the French Government (National Research Agency, ANR) through the « Investments for the Future » LABEX SIGNALIFE: the Program reference # ANR-11-LABX-0028-01 (to G. Meneguzzi). This work was supported by grants obtained by C. Gaggioli from ARC "PJA20171206434," FRM "DEQ20180339183," ANR "ANR-14-RARE-0004-02," Foundation Silab Jean Paulique, and the Debra UK foundation. E.M. Grasset is the recipient of an LNCC and ARC fellowships.

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 February 23, 2018; revised May 23, 2018; accepted July 10, 2018; published first July 19, 2018.

References

- Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2012;14:777–83.
- Macpherson IR, Hooper S, Serrels A, McGarry L, Ozanne BW, Harrington K, et al. p120-catenin is required for the collective invasion of squamous cell carcinoma cells via a phosphorylation-independent mechanism. *Oncogene* 2007;26:5214–28.
- Puram SV, Tirosch I, Parikh AS, Patel AP, Yizhak K, Gillespie S, et al. Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell* 2017;171:1611–24.
- Haeger A, Wolf K, Zegers MM, Friedl P. Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends Cell Biol* 2015;25:556–66.
- Wu JS, Sheng SR, Liang XH, Tang YL. The role of tumor microenvironment in collective tumor cell invasion. *Future Oncol* 2017;13:991–1002.
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JE, Harrington K, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:1392–400.
- Sanz-Moreno V, Gaggioli C, Yeo M, Albregues J, Wallberg F, Viros A, et al. ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell* 2011;20:229–45.
- Goetz JG, Minguet S, Navarro-Lerida I, Lazzano JJ, Samaniego R, Calvo E, et al. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* 2011;146:148–63.
- Calvo F, Ege N, Grande-García A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodeling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2013;15:637–46.
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 2005;8:241–54.
- Barker HE, Cox TR, Erler JT. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;12:540–52.
- Colpaert C, Vermeulen P, Van Marck E, Dirix L. The presence of a fibrotic focus is an independent predictor of early metastasis in lymph node-negative breast cancer patients. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1557–8.
- Del Pozo Martin Y, Park D, Ramachandran A, Ombrato L, Calvo F, Chakravarty P, et al. Mesenchymal cancer cell-stroma crosstalk promotes niche activation, epithelial reversion, and metastatic colonization. *Cell Rep* 2015;13:2456–69.
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009;139:891–906.
- Umesh V, Rape AD, Ulrich TA, Kumar S. Microenvironmental stiffness enhances glioma cell proliferation by stimulating epidermal growth factor receptor signaling. *PLoS One* 2014;9:e101771.
- Yarwood SJ, Woodgett JR. Extracellular matrix composition determines the transcriptional response to epidermal growth factor receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4472–7.
- Gullick WJ. Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Br Med Bull* 1991;47:87–98.
- Ciardello F, Tortora G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur J Cancer* 2003;39:1348–54.
- Hansen AR, Siu LL. Epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer: have we been just skimming the surface? *J Clin Oncol* 2013;31:1381–3.
- Monteith GR, Prevorskaya N, Roberts-Thomson SJ. The calcium-cancer signalling nexus. *Nat Rev Cancer* 2017;17:367–80.
- Wang CY, Lai MD, Phan NN, Sun Z, Lin YC. Meta-analysis of public microarray datasets reveals voltage-gated calcium gene signatures in clinical cancer patients. *PLoS One* 2015;10:e0125766.
- Hooper S, Gaggioli C, Sahai E. A chemical biology screen reveals a role for Rab21-mediated control of actomyosin contractility in fibroblast-driven cancer invasion. *Br J Cancer* 2010;102:392–402.
- Martiel JL, Leal A, Kurzawa L, Balland M, Wang I, Vignaud T, et al. Measurement of cell traction forces with ImageJ. *Methods Cell Biol* 2015;125:269–87.
- Albregues J, Meneguzzi G, Gaggioli C. Analysis of collective invasion of carcinoma cells in a 3D organotypic model. *Methods Mol Biol* 2013;961:243–52.

Grasset et al.

25. Mason BN, Reinhart-King CA. Controlling the mechanical properties of three-dimensional matrices via non-enzymatic collagen glycation. *Organogenesis* 2013;9:70–5.
26. Wilkinson S, Paterson HF, Marshall CJ. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol* 2005;7:255–61.
27. Angelini TE, Hannezo E, Trepast X, Fredberg JJ, Weitz DA. Cell migration driven by cooperative substrate deformation patterns. *Phys Rev Lett* 2010;104:168104.
28. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;16:582–98.
29. Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, et al. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 2004;303:848–51.
30. Trimboli AJ, Cantemir-Stone CZ, Li F, Wallace JA, Merchant A, Creasap N, et al. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature* 2009;461:1084–91.
31. Pathak A, Kumar S. Biophysical regulation of tumor cell invasion: moving beyond matrix stiffness. *Integr Biol* 2011;3:267–78.
32. Lee CK, Davies L, Wu YL, Mitsudomi T, Inoue A, Rosell R, et al. Gefitinib or erlotinib vs chemotherapy for EGFR mutation-positive lung cancer: individual patient data meta-analysis of overall survival. *J Natl Cancer Inst* 2017;109. doi: 10.1093/jnci/djw279.
33. Braig F, Kriegs M, Voigtlaender M, Habel B, Grob T, Biskup K, et al. Cetuximab resistance in head and neck cancer is mediated by EGFR-K521 polymorphism. *Cancer Res* 2017;77:1188–99.
34. Schmitz S, Bindea G, Albu RI, Mlecnik B, Machiels JP. Cetuximab promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer associated fibroblasts in patients with head and neck cancer. *Oncotarget* 2015;6:34288–99.
35. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 2003;10:1–21.
36. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer* 2011;11:609–18.
37. Casas-Rua V, Tomas-Martin P, Lopez-Guerrero AM, Alvarez IS, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. STIM1 phosphorylation triggered by epidermal growth factor mediates cell migration. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853:233–43.
38. Davis FM, Azimi I, Faville RA, Peters AA, Jalink K, Putney JW Jr, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* 2014;33:2307–16.
39. Jacquemet G, Baghirovi H, Georgiadou M, Sihto H, Peuhu E, Cettour-Janet P, et al. L-type calcium channels regulate filopodia stability and cancer cell invasion downstream of integrin signalling. *Nat Commun* 2016;7:13297.
40. Chen YT, Chen YF, Chiu WT, Liu KY, Liu YL, Chang JY, et al. Microtubule-associated histone deacetylase 6 supports the calcium store sensor STIM1 in mediating malignant cell behaviors. *Cancer Res* 2013;73:4500–9.
41. Brouland JP, Gelebart P, Kovacs T, Enouf J, Grossmann J, Papp B. The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *Am J Pathol* 2005;167:233–42.
42. Tsavaler L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 2001;61:3760–9.
43. Zhu H, Zhang H, Jin F, Fang M, Huang M, Yang CS, et al. Elevated Orai1 expression mediates tumor-promoting intracellular Ca²⁺ oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2014;5:3455–71.
44. Fourbon Y, Gueguinou M, Felix R, Constantin B, Uguen A, Fromont G, et al. Ca²⁺ protein alpha 1D of CaV1.3 regulates intracellular calcium concentration and migration of colon cancer cells through a non-canonical activity. *Sci Rep* 2017;7:14199.
45. Kassianidou E, Hughes JH, Kumar S. Activation of ROCK and MLCK tunes regional stress fiber formation and mechanics via preferential myosin light chain phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2017;28:3832–43.
46. Singh B, Carpenter G, Coffey RJ. EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Res* 2016;5. doi: 10.12688/f1000research.9025.1.
47. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley E, Stanley ER, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 2004;64:7022–9.
48. Moro L, Venturino M, Bozzo C, Silengo L, Altruda F, Beguinot L, et al. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J* 1998;17:6622–32.
49. Saxena M, Liu S, Yang B, Hajal C, Changede R, Hu J, et al. EGFR and HER2 activate rigidity sensing only on rigid matrices. *Nat Mater* 2017;16:775–81.
50. Cornwell MM, Pastan I, Gottesman MM. Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1987;262:2166–70.
51. Liu Y, Lu Z, Fan P, Duan Q, Li Y, Tong S, et al. Clinical efficacy of chemotherapy combined with verapamil in metastatic colorectal patients. *Cell Biochem Biophys* 2011;61:393–8.
52. Naito S, Kotoh S, Omoto T, Osada Y, Sagiya K, Iguchi A, et al. Prophylactic intravesical instillation chemotherapy against recurrence after a transurethral resection of superficial bladder cancer: a randomized controlled trial of doxorubicin plus verapamil versus doxorubicin alone. The Kyushu University Urological Oncology Group. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;42:367–72.
53. Ning Z, Chen D, Liu A, Fan P, Duan Q, Zhang T, et al. Efficacy of chemotherapy combined with targeted arterial infusion of verapamil in patients with advanced gastric cancer. *Cell Biochem Biophys* 2014;68:195–200.
54. Tomkova H, Kohoutek M, Zabojsnikova M, Pospiskova M, Ostrizkova L, Gharibiyar M. Cetuximab-induced cutaneous toxicity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24:692–6.
55. Achemann Y, Frauenfelder T, Obrist S, Zaugg K, Corti N, Gunthard HF. A rare but severe pulmonary side effect of cetuximab in two patients. *BMJ Case Rep* 2012;2012:pii:bcr0320125973.

Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916-1930) | The American Journal of Cancer (1931-1940)

Matrix Stiffening and EGFR Cooperate to Promote the Collective Invasion of Cancer Cells

Eloise M. Grasset, Thomas Bertero, Alexandre Bozec, et al.

Cancer Res 2018;78:5229-5242. Published OnlineFirst July 19, 2018.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0601
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2018/07/19/0008-5472.CAN-18-0601.DC1

Visual Overview	A diagrammatic summary of the major findings and biological implications: http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/18/5229/F1.large.jpg
------------------------	---

Cited articles	This article cites 53 articles, 12 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/18/5229.full#ref-list-1
Citing articles	This article has been cited by 1 HighWire-hosted articles. Access the articles at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/18/5229.full#related-urls

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, use this link http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/18/5229 . Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

Annexe II :

Targeting DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated melanoma cell adaptation to BRAF-targeted therapy

- Résumé :

De nouvelles options thérapeutiques comme les thérapies ciblées ou les immunothérapies sont actuellement utilisé pour le traitement du mélanome mais ces traitements ne bénéficient qu'à certains patients et beaucoup vont rechuter à cause des mécanismes de résistance. Il est donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes d'échappement aux thérapies ciblées pour améliorer leur efficacité. Dans une tumeur, les cellules cancéreuses interagissent avec un écosystème complexe composé de cellules stromales dont des fibroblastes activés enchâssé dans de la matrice extracellulaire (MEC). La MEC, produite en majorité par les fibroblastes mais aussi les cellules tumorales, constitue un réseau dynamique avec des propriétés biochimiques et biomécaniques qui participent à la progression tumorale. L'interaction des cellules de mélanome avec la MEC peut jouer un rôle dans la résistance aux thérapies ciblées. Cette étude montre que la MEC produite par les MAF (melanoma associated fibroblasts) ou les fibroblastes résidents du ganglion est plus riche en fibres de collagènes et fibronectine, organisées de façon anisotropique comparé aux fibroblastes sains de dermes. Ces MEC organisées protègent les cellules de mélanome des thérapies ciblées en activant les récepteurs au collagène DDR1 et DDR2 et la voie NF κ B non-canonique. *In vivo*, le ciblage des DDR par l'Imatinib synergise avec les thérapies ciblées pour diminuer la progression tumorale et empêcher les rechutes. Ces résultats permettent ainsi d'identifier les DDR comme nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans la résistance du mélanome aux thérapies ciblées.

Sous presse à Embo Molecular Medicine, publié sur BioRxiv : DOI : [10.1101/857896](https://doi.org/10.1101/857896)

Targeting Discoidin Domain Receptors DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated tumor cell adaptation and tolerance to BRAF-targeted therapy in melanoma

Ilona Berestjuk^{1,2}, Margaux Lecacheur^{1,2}, Alexandrine Carminati^{1,2}, Serena Diazi^{1,2}, Christopher Rovera^{1,2}, Virginie Prod'homme^{1,2}, Mickael Ohanna^{1,2}, Ana Popovic^{1,2}, Aude Mallavialle^{1,2}, Frédéric Larbret^{1,2}, Sabrina Pisano³, Stéphane Audebert⁴, Thierry Passeron^{1,5}, Cédric Gaggioli³, Christophe A. Girard^{1,2}, Marcel Deckert^{1,2*} and Sophie Tartare-Deckert^{1,2*}

¹Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, 06204 Nice, France

²Team 11, Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer 2016, 06204 Nice, France

³Université Côte d'Azur, IRCAN, 06107 Nice, France

⁴Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, 13273 Marseille, France

⁵Université Côte d'Azur, Department of Dermatology, 06204 Nice, France.

*Co-last authors

Running title: Collagen receptors DDR mediate therapy resistance

Keywords: melanoma, extracellular matrix, DDR, NF- κ B2, targeted therapies, resistance

Corresponding Authors: Sophie Tartare-Deckert tartare@unice.fr and Marcel Deckert deckert@unice.fr, Inserm UMR1065/C3M, 151 Route de Ginestière BP2 3194, F-06204 Nice cedex 3.

ABSTRACT

Resistance to BRAF/MEK inhibitor therapy in BRAFV600-mutated advanced melanoma remains a major obstacle that limits patient benefit. Microenvironment components including the extracellular matrix (ECM) can support tumor cell adaptation and tolerance to targeted therapy, however the underlying mechanisms remain poorly understood. Here, we investigated the process of matrix-mediated drug resistance (MMDR) in response to BRAFV600 pathway inhibition in melanoma. We demonstrate that physical and structural cues from fibroblast derived ECM abrogate anti-proliferative responses to BRAF/MEK inhibition. MMDR is mediated by drug-induced linear clustering of phosphorylated DDR1 and DDR2, two tyrosine kinase collagen receptors. Depletion and pharmacological targeting of DDR1 and DDR2 overcome ECM-mediated resistance to BRAF-targeted therapy. In xenografts, targeting DDR with Imatinib enhances BRAF inhibitor efficacy, counteracts drug-induced collagen remodeling and delays tumor relapse. Mechanistically, DDR-dependent MMDR fosters a targetable pro-survival NIK/IKK/NF- κ B2 pathway. These findings reveal a novel role for a collagen-rich matrix and DDR in tumor cell adaptation and resistance. They also provide important insights into environment-mediated drug resistance and a pre-clinical rationale for targeting DDR signaling in combination with targeted therapy in melanoma.

INTRODUCTION

One of the hallmarks of cancer cells is their remarkable ability to adapt to microenvironmental influences, such as the nature of the stroma including the extracellular matrix (ECM) and therapeutic stress (Pickup et al, 2014). This is particularly true for malignant cutaneous melanoma, which is one of the most aggressive and refractory human cancers (Shain & Bastian, 2016). Approximately 50% of melanoma carries activating mutations in the BRAF oncogene, leading to the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK pathway. Inhibition of the BRAF^{V600E/K} oncoprotein by BRAF inhibitors (BRAFi) such as Vemurafenib or Dabrafenib has markedly improved clinical outcome of patients (Flaherty et al, 2012). Despite this, durable responses are rare as most patients relapse within a year of beginning the treatment. Significant prolonged benefit can be achieved by combining BRAFi and MEK (MAPK/ERK kinase) inhibitors (MEKi) such as Cobimetinib or Trametinib, yet the development of drug resistance remains the most common clinical outcome (Robert et al, 2019). Acquired resistance to targeted therapies involves genetic alterations of key intracellular regulators of the MAPK signaling pathway. This leads to the restoration of the pathway and non-genetic alterations that are commonly associated with transcriptional reprogramming and phenotype switching from a melanocytic to an invasive undifferentiated mesenchymal-like cell state, which is characterized by lower expression levels of MITF and SOX10 and higher levels of AXL (Muller et al, 2014; Rambow et al, 2019). Such adaptive responses to BRAF oncogenic pathway inhibition are thought to precede mutation-driven acquired resistance (Smith et al, 2016). However, in addition to mechanisms of resistance intrinsic to cancer cells, dynamic, de novo mechanisms exist, which are orchestrated by the tumor microenvironment and occur during the cancer cell's adaptation to therapy. Environment-mediated drug resistance (EMDR) thus appears as an important contributor of how cancer cells escape therapies (Meads et al, 2009). This process has initially been described in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies and was shown related to minimal residual disease. This phenomenon is gaining importance in the field of melanoma with several studies reporting the involvement of stroma derived factors in adaptive response and resistance to targeted therapies (Fedorenko et al, 2015; Hirata et al, 2015; Kaur et al, 2016; Straussman et al, 2012; Young et al, 2017). Given the key role of EMDR enabling the emergence of genetic resistance, an understanding and further identification of EMDR mechanisms in melanoma may assist with the development of more effective therapeutic strategies, thereby increasing the efficacy of targeted therapies. Tumors are complex and adaptive ecosystems that are affected by numerous stromal components, which enhance tumor phenotypes and therapy resistance. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are activated fibroblasts and the primary producers of ECM. The ECM is a highly dynamic structural framework of macromolecules, providing both biochemical and

biomechanical cues, which are required for tumor progression (Kalluri, 2016). The ECM is primarily composed of fibrillar and non-fibrillar collagens, hyaluronic acid, proteoglycans, and adhesive glycoproteins such as fibronectin, thrombospondins and SPARC. It also contains matrix-remodeling enzymes and other ECM-associated proteins and acts as a reservoir for cytokines and growth factors (Hynes & Naba, 2012; Mouw et al, 2014). ECM composition, fiber orientation and physical characteristics are profoundly altered in the vast majority of solid tumors (Pickup et al., 2014). Interactions between cells and the ECM elicit intracellular signaling pathways and regulate gene transcription, mainly through cell-surface adhesion receptors including integrins and discoidin domain receptors (DDR). DDR1 and DDR2 belong to a unique subfamily of receptor tyrosine kinases and have been identified as non-integrin collagen receptors (Leitinger, 2014; Shrivastava et al, 1997; Vogel et al, 1997). They are distinguished from each other by their relative affinity for different types of collagens, as DDR1 is activated by both fibrillar and non-fibrillar collagens, whereas DDR2 is only activated by fibrillar collagens. Furthermore, their expression and function are associated with fibrotic disease and cancer (Leitinger, 2014; Valiathan et al, 2012). DDR1 or DDR2 are known to control tumor cell proliferation and invasion, depending on the tumor type and the nature of the microenvironment (Valiathan et al., 2012). However, the functional role of DDR activity in mediating sensitivity to anti-cancer therapies and tumor resistance is poorly documented. Adhesion of tumor cells to the ECM is a key component of EMDR. However, the influence of matrix-mediated drug resistance (MMDR) in response to targeted therapies and the nature of ECM receptors driving the MMDR phenotype in melanoma have not yet been addressed in detail. To model the contribution of the ECM in melanoma cell responses to BRAF and MEK inhibition, we generated fibroblast-derived 3D ECM from melanoma-associated fibroblasts (MAF), which were isolated from patient-derived biopsies and analyzed the MMDR mechanism with the aim to identify novel opportunities for microenvironment-targeted therapies. Here, we show that DDR1 and DDR2 are key mediators of MMDR in melanoma, through the pro-survival non-canonical NF- κ B2 pathway. Our findings reveal a novel role for these collagen-activated tyrosine kinase receptors, in mediating BRAF inhibitor tolerance. These data therefore support the rationale to inhibit DDR1 and DDR2 signaling, to disrupt the therapy-resisting properties conferred by the ECM in the microenvironment. We propose that the use of DDR inhibitors as a novel combinatorial therapeutic strategy may be beneficial for melanoma patients in overcoming resistance to MAPK-targeted therapy.

RESULTS

Fibroblast-derived 3D ECM confers drug-protective action to melanoma cells against antiBRAF^{V600E} therapies

To investigate the potential contribution of MMDR to targeted therapy in BRAF-mutated melanoma cells, we employed an in vitro model based on live cell-derived 3D ECMs. These matrices mimic many structural and biomolecular features, which are typically found in vivo (Cukierman et al, 2001). We selected human primary fibroblasts obtained from healthy individuals or MAFs isolated from patient metastatic melanoma biopsies (MAFs) in either the skin or lymph nodes (LN). The different fibroblast cultures were functionally tested in a 3D collagen matrix contraction assay, which showed that unlike human dermal fibroblasts (HDF), skin and LN MAF displayed actomyosin contractile activity. Similarly to MAFs, LN normal fibroblasts known as fibroblastic reticular cells (FRC) are myofibroblast-like cells (Fletcher et al, 2015), which also showed a high propensity to contract collagen (Fig 1A). Cell-derived matrices were then generated, de-cellularized and their composition, architecture and rigidity were analyzed using proteomic and microscopic approaches. In our experimental conditions, compared to HDF, skin and LN MAF as well as FRC produced and assembled a dense 3D ECM composed of oriented collagen and fibronectin fibers, as shown by picrosirius red and immunofluorescence staining of the ECMs (Fig 1B). Proteomic analysis of the different fibroblast-derived ECMs further documented the molecular composition of these matrices, showing enrichment for several types of collagens and core matrisome components including glycoproteins, proteoglycans as well as ECM regulators and ECM-associated proteins (Appendix Fig S1). Atomic force microscopy (AFM) analysis of ECM stiffness revealed values for MAF and HDF matrices that were within the range of previous observations (Kaukonen et al, 2016) (Fig 1C). We noticed that matrices generated from FRC and MAF were stiffer than HDF-derived ECM. Collectively, these observations validate the use of our experimentally derived matrices for functional studies. Next, we tested the effectiveness of the fibroblast-derived ECMs generated from HDF, FRC or MAF to protect BRAFV600E-mutated melanoma cells against the anti-proliferative effect of MAPK pathway inhibition. We therefore developed a drug protection assay based on the culture of melanoma cells that stably expressed a fluorescent nuclear label, cultured on top of fibroblast-derived ECMs (Fig 2A). Tumor cells were then treated with drugs targeting the mutant BRAF/MAPK pathway using BRAFi alone or in combination with MEKi (Fig 2B). Cell proliferation was monitored using live cell time-lapse imaging and quantified by counting the number of fluorescent nuclei. Cell growth inhibition induced by BRAFi alone (Vemurafenib) or in combination with MEKi (Trametinib) was abrogated when 1205Lu melanoma cells were cultured on top of fibroblast-derived ECMs, in sharp contrast to standard cell culture conditions where cells were plated either on plastic or on purified collagen 1 (Coll-1) (Fig 2C-D and Fig EV1A). In line with the organization of the 3D matrices depicted in Fig 1, drug protection assays against BRAFi or BRAFi/MEKi combo-therapy revealed that MAF- and FRC derived matrices display higher protective abilities compared to HDF-derived ECMs and conferred increased protection (Fig 2D and Fig EV1A). Similar protective effects were observed with the SKMEL5 cell line and the MM099 patient-derived short-term melanoma culture when these cells were plated on the different experimental ECM settings (Fig 2E and Fig EV1B). These data suggest that MMDR relies on the topological and molecular features of the ECM. Cell cycle analysis in SKMEL5 and MM099 cells further showed that experimentally produced ECM from HDF, MAF or FRC prevented the G0/G1 cell cycle arrest, induced by the BRAFi/MEKi cocktail in contrast to the cell culture conditions on plastic or Coll-1-plated dishes (Fig 2F and Fig EV1C). The ECM therefore transmits signals that prevent the cytostatic action of MAPK pathway inhibitors. At the molecular level, ECM-mediated therapeutic escape of SKMEL5, 1205Lu and MM099 cells from

BRAF pathway inhibition was associated with sustained levels of the proliferation markers phosphorylated Rb, Cyclin D1 and Survivin, and lower levels of the cell cycle inhibitor p27KIP1, together with decreased phosphorylation of ERK1/2 in presence of the targeted drugs (Fig 2G and Fig EV1D). Upon BRAF inhibition, the levels of proliferative markers were observed to be higher in melanoma cells on MAF- and FRC-derived ECMs than on HDF derived ECMs. In contrast no significant changes on p53 levels were observed. Together, these results indicate that fibroblasts assembled and remodeled matrices that provide a drug tolerant environment for BRAF mutant melanoma cell lines and short-term cultures.

Expression of the collagen receptors DDR1 and DDR2 in melanoma

Previous studies have demonstrated the critical role of ECM receptors belonging to the integrin family in drug resistance (Seguin et al, 2015). Moreover, BRAF inhibition has been described to generate a drug protective stroma with high $\beta 1$ integrin/FAK signaling, as a result of the paradoxical action of BRAFi on MAF (Hirata et al., 2015). Yet, in our experimental conditions, we were unable to show a significant implication of the $\beta 1$ integrin/FAK axis in drug protection conferred by fibroblast-derived ECMs. Indeed, addition to blocking $\beta 1$ integrin antibodies or the depletion of FAK both failed to prevent the protective properties of fibroblast-derived ECM against the growth and survival inhibitory signals induced by BRAFi (Appendix Fig S2).

This finding prompted us to interrogate the contribution of other ECM receptors in targeted therapy resistance. Keeping in mind the elevated levels of fibrillar collagens found in fibroblast-derived ECMs (Fig 1B)(Appendix Fig S1), we examined the functional implication of the collagen tyrosine kinase receptors DDR1 and DDR2 (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997). The analysis of TCGA datasets for cutaneous melanoma showed that the DDR1 and DDR2 genes were genetically altered in 20% and 13% of melanoma cases, respectively. Interestingly, a significant fraction of melanomas was found to be associated with an amplification of DNA copy number and higher mRNA levels of DDR1 and DDR2 (respectively 13% and 10% of samples) (Fig 3A). This is consistent with the notion that these collagen receptors may play an important role in melanoma pathogenesis. Immunohistochemical analysis of DDR1 and DDR2 expression in benign nevi and malignant primary and metastatic melanocytic skin lesions, further showed that DDR1 and DDR2 levels significantly increased during melanoma progression, indicating that DDR1 and DDR2 may represent novel prognostic factors for melanoma (Fig 3B) (Appendix Fig S3). We next examined the levels of DDR1 and DDR2 in a collection of melanoma cell lines and short-term melanoma cultures in relation to the cell state differentiation markers MITF, SOX10 and AXL. DDR1 and DDR2 were both expressed in melanoma cell lines regardless their differentiation cell phenotype (Fig 3C). In patient-derived short-term melanoma cultures, higher DDR1 and DDR2 protein levels were detected in BRAF mutant MM099 and MM029 and NRAS mutant MM165 cells with the MITFlow, SOX10low and AXLhigh dedifferentiated phenotype signature (Fig 3D). Moreover, higher levels of DDR2 were found to be associated with lower levels of the melanocytic marker MITF and higher levels of the drug-resistant marker AXL in dedifferentiated mesenchymal-like BRAFi-resistant M229R, M238R and UACC62R cells compared to their parental counterparts (Girard et al, 2020; Misek et al, 2020; Nazarian et al, 2010) (Fig 3E). The examination of public gene expression datasets of the melanoma differentiation signature confirmed that DDR1 and DDR2 levels were increased in the undifferentiated (U) and neural crest-like (NC) cell sub-populations from the TSOI signature (Fig 3F) (Tsoi et al, 2018) and in the invasive MITF^{LOW} cells from the HOEK signature

(Appendix Fig S4) (Widmer et al., 2012). Dedifferentiated/undifferentiated melanoma cells display intrinsic resistance to MAPK pathway inhibition (Muller et al., 2014; Rambow et al., 2019; Tsoi et al., 2018). In line with this notion, we found that DNA amplification and elevated mRNA levels of DDR1 negatively correlated to the activity of BRAF and MEK inhibitors in melanoma cell lines from the GDSC (Genomic of Drug Sensitivity in Cancer) (Appendix Fig S5). Together, these observations associate DDR expression with melanoma progression and with the invasive and therapy-resistant phenotype.

Targeting DDR impairs ECM-mediated resistance to oncogenic BRAF pathway inhibition

Next, we compared how fibroblast-derived ECMs modulate DDR phosphorylation, an event linked to their activity (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997). Immunoblot analysis of lysates from 1205Lu and MM099 cells plated on MAF- and FRC-derived ECMs indicated that MAF-derived matrices have a stronger ability to increase the levels and phosphorylation of DDR1 and/or DDR2 compared to HDF-derived matrices (Fig EV2A), supporting a functional implication of DDR in melanoma drug tolerance. Interestingly, BRAF and/or MEK inhibition has no significant effect on DDR phosphorylation in 1205Lu cells cultivated on MAF-derived ECMs (Appendix Fig S6). To address the contribution of DDR in MMDR, a siRNA approach was then used to target DDR1, DDR2 or both in melanoma cells cultured on MAF- or FRC-derived ECMs, in the presence of BRAFi alone or combined with MEKi. Immunoblot analysis showed specific DDR1 and DDR2 protein reduction after siRNA transfection using two different targeted sequences in BRAFi-treated 1205Lu cells cultured on MAF- or FRC-derived ECMs (Fig 4A and Fig EV2B). Compared to the single knockdown, the simultaneous knockdown of DDR1 and DDR2 overcame MMDR to BRAF targeted therapy as revealed by decreased levels of cell cycle progression markers in both 1205Lu and SKMEL5 cells (Fig 4A-B). Importantly, depletion of both DDR1 and DDR2 enhanced the cytotoxic activity of co-targeting BRAF/MEK as shown by the increased cleavage of apoptotic Caspase 3 that was detected in SKMEL5 and MM099 melanoma cells (Fig 4B and Fig EV2C). DDR are druggable receptors targeted by Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor (TKI) initially developed as an ABL inhibitor, which also inhibits DDR activity with high efficacy (Day et al., 2008). Imatinib belongs to therapeutic molecules used in the clinic for the treatment of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome (Druker et al., 2001). Enzymatic activities of DDR were also inhibited by other small molecules including DDR1-IN-1 (Kim et al., 2013). We first confirmed that Imatinib and DDR1-IN-1 efficiently inhibited type I collagen-induced DDR1 and DDR2 tyrosine phosphorylation in 1205Lu cells (Fig EV2D). Inhibition of DDR1/2 kinases by Imatinib or DDR1IN-1 suppressed the protective action of MAF- and FRC-derived ECMs against BRAF inhibition, as evidenced by the significant decrease in 1205Lu cell proliferation, which was observed after co-treatment with BRAFi and DDR1/2 inhibitors (Fig 4C and Fig EV2E). Similar anti-proliferative effects of DDR inhibitors were observed during drug-protection assays performed in SKMEL5 and MM099 cells on MAF- or FRC-derived ECMs (Fig EV2F-G). Mutant BRAF and DDR1/2 cotargeting in the three melanoma cell lines plated on FRC- or MAF-derived ECMs decreased levels of phosphorylated Rb, E2F1 and Survivin, and induced Caspase 3 cleavage (Fig 4D and Fig EV3A-B). Similar biochemical events were promoted by BRAFi or with the combined BRAFi/MEKi treatment, in the presence of Nilotinib, a next-generation BCR-ABL inhibitor that is approved for the treatment of Imatinib-resistant patients and targeting DDR1/2 (Day et al., 2008)(Fig EV3C) =. Induction of apoptosis in co-treated melanoma cells was further confirmed

using flow cytometry analysis of cell death markers (Fig 4E and Fig EV3D).

Recent studies described that collagen binding to DDR leads to their activation and clustering into filamentous membrane structures that are associated with collagen fibrils (Yeung et al., 2019). We thus examined the clustering and spatial distribution of phosphorylated DDR in melanoma cells plated on collagen I coated plastic dishes or on 3D-ECMs, in response to oncogenic BRAF pathway inhibition. To detect DDR1 and/or DDR2 we used an antibody that specifically recognizes phosphorylated DDR1 at Y792 and an antibody that recognizes phosphorylated DDR2 at Y740 but also cross-reacts with the phosphorylated DDR1 (Yeung et al., 2019). Immunofluorescence staining of P-DDR1 and P-DDR1/2 revealed that 1205Lu cells, which were cultured on purified collagen I displayed a globular dot-like distribution of these two receptors, whereas cells seeded on FRC-derived 3D ECMs exhibited a fraction of P-DDR distributed into linear membrane clusters (Fig 5A-B). Importantly, cell exposure to BRAFi or to BRAFi/MEKi combo-therapy dramatically increased the proportion of P-DDR1 and P-DDR1/2 containing linear clusters, on FRC-derived 3D ECM, as well as F-actin remodeling (Fig 5A-B). Notably, the formation of linear clusters of P-DDR1 and P-DDR1/2 upon MAPK pathway inhibition is also significantly increased in cells plated on MAF-derived 3D ECMs compared to cells cultured on HDF-derived ECMs (Fig 5C-D and Fig EV4A), and these clusters co-localized with collagen fibers (Fig EV4B). Similar observations on phosphorylated DDR clustering were obtained with SKMEL5 melanoma cells (Fig EV4C-D). These data suggest that therapy-induced cytoskeletal changes drive a linear clustering of phosphorylated DDR along collagen fibers and subsequently cause MMDR. These findings therefore suggest that DDR1 and DDR2 determine BRAF mutant melanoma cell responsiveness to BRAF-targeted therapy, with regards to ECM features and that the drug-tolerant action of DDR is dependent to their enzymatic activities and correlates with the formation of filamentous membrane structures.

Pharmacological inhibition of DDR by Imatinib improves targeted therapy efficacy, counteracts drug-induced collagen remodeling and delays tumor relapse

The anti-tumor activity of Imatinib combined with the BRAFi Vemurafenib was assessed in a pre-clinical xenograft melanoma model. BRAF-mutated melanoma cells (1205Lu) were subcutaneously xenografted into nude mice (CDX model), which were exposed to BRAFi, Imatinib or BRAFi plus Imatinib (Fig 6A). As expected, BRAF inhibition induced a rapid tumor reduction, whereas Imatinib alone did not display a significant anti-melanoma effect (Fig 6B). However, following 12 days, tumors treated with BRAFi alone had resumed growth, whereas the combination treatment with Imatinib markedly delayed tumor relapse and led to a significant reduction in tumor volume (Fig 6B-D) and weight (Fig 6C). Immunohistochemical analysis of tumor samples further documented that in comparison to single regimens, the combined BRAFi and Imatinib treatment dramatically reduced cell proliferation and led to apoptotic tumor cell death, as shown by the in-situ expression of cleaved Caspase 3 and decreased Ki67 (Fig 6D). Consistent with these observations, the BRAFi/Imatinib combination significantly increased the survival of melanoma-bearing mice (Fig 6E) that were treated for 30 days, without apparent body weight loss or signs of toxicity throughout the study (Fig 6F). Seeing as Increased collagen deposition has previously been described in melanoma xenografts upon treatment with BRAFi (Girard et al., 2020; Jenkins et al., 2015), we next investigated collagen content and fiber organization in tumor tissues from mice treated with the different regimens. Histochemical analysis showed that BRAFi treatment triggered a profound remodeling of the melanoma stromal ECM (Fig 7A), with marked increase of the collagen

fiber's area and thickness, which was suppressed by Imatinib. Collagen color analysis under polarized light showed a decrease in mature orange and red fibers in tumors treated with the combined regimen, compared to the single-agent treatment (Fig 7B). Finally, tumor imaging with second harmonic generation (SHG) confirmed the fibrillar nature of the collagen network that was rearranged upon BRAFi treatment but not upon the combined BRAFi/Imatinib treatment (Fig 7A-C). These data suggest that treatment with Imatinib counteracts the adverse effect of the targeted therapy on aberrant collagen deposition and organization, a process potentially contributing to drug resistance and relapse.

MMDR involves a targetable pro-survival NIK/IKK/NFκB2 pathway

Finally, we wished to better characterize at the molecular level the MMDR process that is promoted by collagen receptors DDR1 and DDR2. To identify MMDR-related signaling pathways triggered by their tyrosine kinase activity, we performed a phospho-kinase screening with protein extracts from melanoma cells cultured on fibroblast-derived 3D ECMs or plastic, in the presence of BRAFi. Unfortunately, this approach did not reveal any significantly augmented kinase activity or increased phosphorylation of kinase substrates (Appendix Fig S7A-B). Moreover, consistent with the results of the phospho-kinase screening, using immunoblot analysis, we did not observe by immunoblot analysis any changes in the phosphorylation of the AKT survival pathway in melanoma cells cultured under MMDR conditions (Appendix Fig S7C).

On the contrary compared to siCTRL cells, biochemical analysis of DDR silenced melanoma cells revealed that the concomitant depletion of the two receptors decreased the expression of RelB, NFκB2 precursor protein p100 and NFκB2 p52 processed form, in SKMEL5 and MM099 cells cultured in MMDR conditions, following exposure to BRAFi alone or combined with MEKi (Fig 8A-B). A similar decrease in RelB and p100 was observed in DDR-depleted 1205Lu cells, following treatment with targeted agents (Fig EV5A). Consistent with these results, pharmacological inhibition of DDR using Imatinib that impaired melanoma MMDR by triggering cell cycle arrest and apoptosis, decreased in a time-dependent manner the expression of RelB in 1205Lu cells cultured in MMDR conditions (Fig EV5B). RelB and p52 are components of the non-canonical NFκB2 pathway (Taniguchi & Karin, 2018), which is activated by the upstream kinases NIK (NFκB inducing kinase) and IKKα (IκB kinase) (Fig 8C). Interestingly, levels of RelB and p52 were found elevated in melanoma cells cultured on fibroblast-derived ECMs compared to plastic and collagen-coated dishes (Fig 8D). Using a pan-IKK inhibitor BMS345541 (Fig 8E and Fig EV5C-D) and a recently developed NIK inhibitor (NIKi) (Mondragon et al, 2019) (Fig 8F-G and Fig EV5E), we confirmed the implication of the NFκB2 pathway in MMDR, as illustrated by decreased cell cycle markers (pRb and Survivin) and increased Caspase 3 cleavage, in BRAFi-treated melanoma cells cultured on FRC- or MAF-derived ECMs. Comparable decreased levels of p52 and RelB as well as cell cycle markers were observed following pharmacological targeting of DDR and NIK in MMDR conditions (Fig 8F-G and Fig EV5E). Together, our findings suggest that melanoma cell adaptation to oncogenic MAPK pathway inhibition involves the interaction of tumor cells with the mesenchymal stroma enriched in fibrillar collagens, thereby promoting DDR-dependent activation of the NFκB2/RelB pathway (Fig 9).

DISCUSSION

Preventing melanoma resistance and relapse to targeted therapy remains a significant challenge for successful disease management. Emerging evidence suggests that stromal components of the tumor microenvironment, including the ECM,

play a key role in establishing resistant niches by allowing melanoma cells to rapidly adapt and tolerate therapeutic drugs, before mutation-driven resistance mechanisms are acquired (Meads et al., 2009; Rambow et al., 2019; Smith et al., 2016). Here, we describe a novel mechanism of adaptation and tolerance to oncogenic BRAF pathway inhibition, which involves the dynamic interaction of melanoma cells with the ECM. When comparing cell-derived matrices produced by normal HDF, FRC and MAF, we found that depending on fibroblast origin, properties of experimentally derived ECMs differ remarkably. MAF-derived ECMs exhibit a higher level of fiber organization and increased stiffness compared to ECMs generated by normal dermal fibroblasts HDF. This is in agreement with what has been previously demonstrated by others (Gopal et al, 2017; Kaukonen et al, 2017). Interestingly, we observed that FRC, which are resident lymph node fibroblasts harbor some phenotypic and functional properties similar to MAF such as myofibroblast-like properties. In this regard, FRC produce and remodel a stiff ECM enriched in fibrillar collagens. Consistent with this, we show that similar to MAF-derived ECM, the ECM generated by FRC provides melanoma cells with increased protection from targeted drugs, compared to ECMs generated from HDF. However, it is important to note that in contrast to classic 2D culture conditions, HDF-derived ECMs can confer protection against BRAF inhibition, indicating that MMDR is dependent on structural 3D ECM organization. Importantly, MMDR is described in three different BRAF mutant melanoma cells, regardless of their transcriptional phenotypic MITF/AXL signature. Functionally, we demonstrate that collagen receptors DDR1 and DDR2 mediate MMDR to BRAF/MEK inhibitor therapy through a pro-survival NIK/IKKα/NFκB2 pathway. We show that DDR knockdown or the inhibition of their catalytic activity impairs drug tolerance that is promoted by MAF- or FRC-derived ECM and induces melanoma cell death. DDR1 and DDR2 are both expressed at different levels in the skin (Cario, 2018), particularly in the epidermis from which melanoma originates following the malignant transformation of melanocytes. Overlapping functions have been attributed to DDR1 and DDR2 in melanoma with regards to cancer cell growth and invasiveness. A recent study correlated high DDR1 expression in melanoma lesions with poor prognosis and showed that DDR1 controls melanoma cell invasion and survival (Reger de Moura et al, 2019). Other studies have reported that DDR2 depletion in melanoma cell lines reduced their invasive and metastatic abilities (Badiola et al, 2011; Poudel et al, 2015). Consistently, we observed augmented expression of the two receptors during the malignant transition from benign melanocytic lesions to metastatic melanoma and that their expression is linked with therapy-resistant melanoma cell populations. Our data therefore suggests that the function of DDR1 and DDR2 also overlaps during the response to BRAFV600 targeted therapy. Accordingly, knockdown of both receptors is required to fully prevent MMDR to oncogenic BRAF pathway inhibition. Collagen abundance has recently been identified as an important contributor to melanoma cell phenotype switching through lineage-specific microenvironment sensing (Miskolczi et al, 2018). Herein, we provide evidence for a role of collagen-rich matrices during the adaptive phase of tolerance to targeted therapies.

Interestingly, β1 integrin, another collagen receptor that plays a major role in EMDR (Seguin et al., 2015), has also been linked to adaptive responses to BRAF inhibition via fibronectin-mediated activation of FAK, leading to MAPK pathway reactivation (Fedorenko et al., 2015; Hirata et al., 2015). Contrary to β1 integrin, engagement of DDR by collagens mediates drug tolerance in the absence of MAPK/ERK pathway reactivation. This suggests that DDR participate in the early response to BRAF inhibition through a pathway distinct from that of β1 integrin. Additionally, we show that fibroblast-derived ECMs promote phospho-DDR1/2 clustering into linear

membrane structures aligned with collagen and resembling those described by others (Agarwal et al, 2007; Corcoran et al, 2019; Yeung et al., 2019). Importantly, receptor linear clustering is enhanced upon melanoma cell treatment with targeted therapies, thus making the involvement of this process during the early phase of drug adaptation highly probable. In addition, linear clustering of phospho-DDR upon BRAF pathway inhibition is favored on MAF- and FRC-derived ECMs compared to HDF-derived ECM, correlating with the topological organization of collagen fibers and their drug protective effect. The exact mechanism underlying the induction of DDR clustering following MAPK pathway inhibition is however unknown.

Biochemical studies revealed that fibroblast-derived matrices enhance the activation of the non-canonical NF κ B2 pathway that account for most of melanoma cell tolerance to BRAF/MEK inhibition. The NF κ B2/p52/RelB pathway represents a major alternative route of NF κ B signaling (Taniguchi & Karin, 2018), which has been involved in drug resistance in myeloma (Landowski et al, 2003) and prostate cancer (Nadiminty et al, 2013). In melanoma, the NF κ B2 pathway is upregulated compared to melanocytes and prevents melanoma senescence (De Donatis et al, 2016). In this study, we demonstrate that suppression of DDR signaling impairs MMDR by reducing NF κ B2/p52/RelB expression. In addition, inhibition of NIK or IKK α , two upstream activators of the NF κ B2 pathway (Taniguchi & Karin, 2018), also abrogates ECM-mediated resistance to BRAF pathway inhibition. Further supporting a potential role for the NF κ B2 pathway in melanoma resistance to targeted therapy is the observation that the drug-resistant undifferentiated and neural crest-like sub-populations display a strong enrichment for the NIK/NF κ B signaling pathway (Tsoi et al., 2018). Precisely how DDR interact with the NIK/IKK α /NF κ B2 pathway remains to be determined. The adaptive response of melanoma cells to BRAF inhibition implicates force-induced actomyosin cytoskeletal remodeling (Girard et al., 2020; Kim et al, 2016; Orgaz et al, 2020). In addition, DDR1 clustering and collagen mechanical reorganization have been shown to involve interactions with myosin IIA, a key component of the actomyosin network (Coelho et al, 2017). In cancer cells, the classical NF κ B pathway is activated by mechanical cues and RhoA-ROCK-myosin II signaling (Sero et al, 2015). We can therefore speculate that BRAFi/MEKi-driven cytoskeletal reorganization and DDR linear clustering along with collagen fibrils regulate the NIK/IKK α /NF κ B2 pathway by increasing actomyosin tension. Another possibility is the recruitment of NIK/IKK α to the DDR signaling platforms, leading to their enzymatic activation, p52/RelB regulation and MMDR.

Our recent report revealed that increased collagen deposition and tumor stiffening is an early response to BRAF inhibition to create a drug protective niche (Girard et al., 2020). In this study, DDR inhibition by the clinically approved TKI Imatinib improved the action of BRAFi on melanoma treatment by delaying tumor relapse, normalizing the collagen network and increasing mice survival. Thus, this combination strategy could be effective in a clinical application as it allows the suppression of the stromal fibrotic-like reaction induced by oncogenic BRAF pathway inhibition and prevents tumor relapse.

Our findings support a model in which BRAF targeted drugs fuel a self-feeding mechanism involving collagen-bound DDR signaling platforms, responsible for collagen network remodeling and drug tolerance. Another issue highlighted by our *in vivo* drug response melanoma model, is the possible implication of stromal DDR in the therapeutic response. Consistent with this, a major role of CAF-derived DDR2 in collagen fiber organization and breast cancer metastasis has been reported (Corsa et al, 2016). DDR signaling might therefore influence both cancer and stromal cells during tumor adaptation to BRAF inhibition.

Our work adds to the emerging notion that DDR are becoming attractive targets in anti-cancer therapies. Inhibiting DDR1 or

DDR2 with Nilotinib (Jeitany et al, 2018), Dasatinib (Hammerman et al, 2011; von Massenhausen et al, 2016), or other non-approved inhibitors (Ambrogio et al, 2016; Grither & Longmore, 2018) was shown to decrease tumorigenicity, invasion or metastasis of several carcinomas (Corsa et al., 2016). Importantly, a recent study in melanoma reported that targeting DDR2 with Dasatinib enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy (Tu et al, 2019). Together this study and our work point to the critical role of collagen receptors DDR in regulating the immune and mesenchymal stroma and the response to current therapies in melanoma.

In summary, our findings reveal that interaction of matrix collagen fibers with DDR favors the emergence of drug-tolerant melanoma cells, during the initial phase of adaptation to MAPK targeting therapies. We also provide evidence that targeting MMDR with clinically approved DDR inhibitors may represent an attractive salvage strategy to overcome resistance to oncogenic BRAF inhibition. This combinatorial approach may thus be beneficial for melanoma patients treated with targeted therapies.

MATERIALS AND METHODS

Melanoma cells, reagents and antibodies

Melanoma cell lines were obtained as previously described (Didier et al, 2018; Rathore et al, 2019; Tichet et al, 2015). Isogenic pairs of Vemurafenib-sensitive (P) and resistant (R) cells (M229, M238, M249) were provided by R.S. Lo (Nazarian et al., 2010). The isogenic pair of Vemurafenib-sensitive (UACC62P) and resistant (UACC62R) cells was provided by R. Neubig (Misek et al., 2020). Short-term cultures of patient melanoma cells were kindly provided by J.C. Marine and are described elsewhere (Verfaillie et al, 2015; Wouters et al, 2020). Melanoma cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS) (HyClone) and 1% penicillin/streptomycin solution. Cell lines were used for experiments within 6 months of thawing. To guarantee cell line authenticity, cells were expanded and frozen at the lowest possible passages and used for a limited number of passages after thawing. Cells were routinely tested for the expression of melanocyte lineage proteins such as MITF. All cell lines were routinely tested for the absence of mycoplasma using PCR. For live imaging and red nuclear labeling 1205Lu cells were transduced with NucLight Red lentivirus reagent (Essen Bioscience) and selected with puromycin (1 μ g/ml, Sigma Aldrich)

Culture reagents were purchased from Thermo Fisher Scientific. BRAFi (PLX4032, Vemurafenib), MEKi (GSK1120212, Trametinib and GDC-0973/RG7420, Cobimetinib), dual RAFi/MEKi (RO5126766), DDR1-IN-1, Nilotinib, and IKK inhibitor BMS345541, were obtained from Selleckchem. Imatinib mesylate was purchased from Enzo Lifescience. The NIK inhibitor was described before (Mondragon et al., 2019). FAK inhibitor PF573228 was from Tocris Bioscience. An equal amount of DMSO was used as the vehicle control. Tissue culture grade Collagen I (#A1064401) used for coating wells and plates was obtained from Thermo Fisher Scientific. Collagen I (#354249) used for 3D applications was obtained from Corning. Matrigel (#E1270) and all other reagents were obtained from Sigma-Aldrich unless otherwise stated. β 1 Integrin blocking antibody (clone A1IB2) and the control isotype were purchased from Merck Millipore. Information on antibodies used in this study is provided in the Appendix Table.

Isolation and culture of primary fibroblasts and MAFs

HDF were isolated and maintained as previously described (Robert et al, 2006). Human lymphatic fibroblasts (FRC#2 and #5) were purchased from ScienCell Research Laboratories. Metastatic melanoma clinical specimens were obtained with written informed consent from each patient and studies were approved by the hospital ethic committee (Nice Hospital Center

and University Côte d'Azur). Briefly, the tissue sample was cut into small pieces and digested using collagenase/dispase. Following filtration of the large debris, the solution was serially centrifuged and the final pellet was re-suspended in DMEM supplemented with 10% FBS and seeded in a tissue culture dish. After 30 min, the fibroblasts adhered to the dish whilst other cellular types remained in suspension. Verification of MAF was determined by flow cytometry using CAF markers such as β 1-integrin, PDGFR β , FAP α and α SMA.

Fibroblasts were cultured in fibroblast medium (ScienCell) supplemented with 10% FBS, 1% fibroblast growth supplement (FGS) and 1% penicillin/streptomycin solution. All experiments were performed with fibroblasts until passage 10.

Fibroblast-derived 3D ECM and MMDR assay

3D de-cellularized ECMs were generated as previously described (Beacham et al, 2007). Briefly, fibroblasts were seeded in gelatin-coated tissue culture dishes, cultured for 8 days in complete medium and treated with 50 μ g/ml ascorbic acid every 48h. Cells were then washed with PBS and ECMs were decellularized using a pre-warmed extraction buffer for 2 min (PBS 0.5% Triton X-100, 20 mM NH₄OH). Matrices were then gently washed several times with PBS.

For MMDR assays, melanoma cells were seeded on top of the de-cellularized 3D ECMs for 48 h at 37°C in 5% CO₂ and cultured in complete medium for a further 96 h in the presence of the various inhibitors, as indicated in the figure legends. Cells were detached and fixed in 70% ethanol or lysed in lysis buffer for cell cycle and immunoblot analysis, respectively.

Matrix remodeling assay

5 \times 10⁴ fibroblasts were embedded in 100 μ l of collagen I/Matrigel mix (final concentration of collagen I: 4 mg/mL and Matrigel: 2 mg/ml), seeded in a glass bottom 96-well plate (MatTek) and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS for 6 days. The gel area was measured using ImageJ software and the gel contraction was calculated using the formula $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter}) / \text{well diameter}$ as previously described (Albregues et al, 2014).

RNAi studies

Non-targeting control, DDR1#1 (VHS50139), DDR1#2 (HSS187878), DDR2#1 (HSS107350), and DDR2#2 (HSS107352) and FAK (PTK2) siRNA duplexes were purchased from Thermo Fisher Scientific. Transfection of siRNA was carried out using Lipofectamine RNAi MAX (Thermo Fisher Scientific), at a final concentration of 50 nM. Unless stated otherwise, cells were assayed at 2 or 4 days post transfection.

Immunoblot and immunoprecipitation

Whole-cell lysates were prepared using lysis buffer containing 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 1% Triton X-100 supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Pierce) and briefly sonicated. Proteins were separated using SDS-PAGE and were transferred onto PVDF membranes (GE Healthcare Life sciences) for immunoblot analysis. Membranes were incubated with the primary antibody overnight, washed and then incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody. Antibodies and working dilution used are listed in Supplementary Table 1. Blots were developed with a chemiluminescence system (GE Healthcare Life Sciences).

For immunoprecipitation (IP) assays, cells treated with 10 μ g/ml of collagen I for 18 h with the indicated inhibitors were lysed as described above, then incubated overnight at 4°C with rocking in lysis buffer containing Protein G Sepharose beads (Merck) and an antibody directed against DDR2. Beads were then washed 3 times with 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 0.1% Triton X-100 supplemented with protease and phosphatase inhibitors. IP products were separated using SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis.

Proliferation assay

Real time analysis of cell growth was carried out using the IncuCyte™ ZOOM imaging system (Essen Bioscience). 1205Lu melanoma cells stably expressing the nuclear fluorescent label red NuCLight reagent were seeded in triplicate in complete medium (15 \times 10³ cells/well in 12-well plates) on fibroblast-derived 3D ECM, collagen I coated wells or in uncoated plastic wells and treated with the indicated drugs. Phase contrast and red immunofluorescent images were taken every 6 h over a 5-day period (4 images per well at x 4 magnification). Cell proliferation was quantified by counting the number of fluorescent nuclei over time, which was calculated as the cell growth rate. Growth curves were generated using the GraphPad prism 8 software

Alternatively, cell proliferation was analyzed by counting cells with Hoechst-stained nuclei.

Flow cytometry

Cell cycle profiles were determined using flow cytometry analysis of propidium iodide (PI) stained cells as previously described (Didier et al., 2018). Melanoma cells were cultured on top of fibroblast-derived ECMs, collagen I coated wells or uncoated plastic wells and were treated with the indicated drugs for 96 h. Cells were then washed, fixed in 70% ethanol and incubated at -20°C for 24 h. Finally, cells were stained for 20 min at 37°C in buffer containing 40 μ g/ml PI and 20 μ g/ml ribonuclease A. Cell cycle profiles were collected using the FACSCanto II (Becton Dickinson). Cell death was evaluated following staining with AnnexinV/PI (eBioscience) and analyzed by flow cytometry as described (Didier et al., 2018).

Immunofluorescence and microscopy

Cells were grown on type I collagen- (0.14 mg/ml) or fibroblast derived ECM-coated glass coverslips. Following BRAFi or BRAFi+MEKi treatment, cells were rinsed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), and incubated for 1 h in PBS containing 10% normal goat serum (Cell Signaling), and then incubated overnight with the indicated primary antibodies that were diluted in PBS containing 2% normal goat serum. F-actin was stained with Alexa Fluor 488 phalloidin (1:100; Thermo Fisher Scientific) and nuclei were stained with DAPI. Following incubation with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies, coverslips were mounted in ProLong antifade mounting reagent (Thermo Fisher Scientific). Images were captured using a wide field microscope (Leica DM5500B, at x 63 magnification). Cell area and globular versus linear clusters of cells (n > 20) were determined and quantified using ImageJ software. Following fixation and incubation with primary antibodies and Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies, de-cellularized matrices on coverslips were mounted in ProLong antifade reagent. Images were captured using a wide field microscope (Leica DM5500B, at x 40 magnification). The orientation of fibronectin and collagen fibers was assessed in the immunofluorescence images using ImageJ software. Data were plotted as frequency of distribution. For co-localization analyses of collagen-1 and phospho-DDR1/2, an anti-collagen type I mouse monoclonal antibody (Sigma, C2456) was used.

Cleaved caspase 3 and Ki67 staining was assessed on 5 μ m frozen sections of cell-derived melanoma xenografts. Samples-derived melanoma xenografts. Samples were fixed for 30 min with 4% PFA in PBS, rehydrated for 10 min in Tris 0.1 M, permeabilized in Tris 0.1 M + 1% Triton for 1 h, and then blocked for 1 h in Tris 0.1 M containing 1% BSA, 0.3% Triton, anti-CD16/CD32 (FC Block, 1/100). Antibodies were diluted in Tris 0.1 M containing 1% BSA, 0.3% Triton and incubated overnight at 4°C. Following several washes with Tris 0.1 M, bound antibodies were detected using Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody. Images were captured using a wide field microscope (Leica DM5500B, at x 40 magnification).

Mass spectrometry analysis

Proteomic analysis of de-cellularized 3D ECMs was performed as described (Gopal et al., 2017). Briefly, ECM proteins were solubilized in urea, reduced and alkylated and proteins were digested with PNGase F (New England BioLabs), endoproteinase Lys-C (Promega) and highsequencing-grade trypsin. Each sample was reconstituted in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 2% acetonitrile and analyzed using liquid chromatography (LC) tandem mass spectrometry (MS/MS) in an LTQ-Orbitrap-Velos (Thermo Electron, Bremen, Germany) online with a nanoLC Ultimate 3000 chromatography system (Dionex). Protein identification and estimation of abundance were determined using raw LC Orbitrap MS data that were processed using the MASCOT search engine (version 2.4.1). Spectra were searched against a SwissProt Human database. The protein abundance was calculated using the iBAQ score and represented as molar percent.

Phospho-kinase profiling

Phospho-kinase screening was performed using a phospho-kinase array (Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array #ARY003B; R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. After cell extraction, 600µg of protein was added per sample. Array spots were analyzed using ImageJ software.

Atomic force microscopy

Elastic properties of fibroblast-derived 3D ECMs were analyzed by AFM using a Bioscope Catalyst operating in Point and Shoot (Bruker Nano Surfaces), coupled with an inverted optical microscope (Leica DMI6000B, Leica Microsystems Ltd.). The apparent Young's Modulus (E_{app}) was measured on unfixed ECM using a silicon nitride tip (40 nm of diameter) mounted on a cantilever with a nominal spring constant of 0.03 N/m (MLCT-D, Bruker). The force-distance curves were collected using a velocity of 4.5 µm/s, in relative trigger mode and by setting the trigger threshold to 1 nN. Each point represents a specific Young's Modulus obtained by fitting the corresponding individual force-curve acquired on a determined point of the sample. E_{app} values were represented as scatter dot plot using GraphPad Prism software.

Cell line-derived xenograft (CDX) tumor models

Mouse experiments were carried out in accordance with the Institutional Animal Care and the local ethical committee (CIEPAL-Azur agreement NCE/2018-483). 1×10^6 1205Lu melanoma cells were subcutaneously implanted into both flanks of 6 week old female athymic nude nu/nu mice (Janvier, France). The tumor was measured with a caliper and the volume was calculated using the formula: $V = \text{width} \times \text{length}^2 \times 0.5$. When the tumor reached 75 mm³, mice were randomly grouped into control and test groups. Vemurafenib (35 mg/kg) and Imatinib mesylate (75 mg/kg) were delivered (alone or in combination) intraperitoneally three times per week. Mice in the control group were treated with vehicle alone. Mice were treated for 30 days and followed for up to 50 days or until tumors reached a pre-defined volume (1000 mm³). Once the animals were sacrificed, tumors were dissected, weighed and snap frozen in liquid nitrogen in an optimal cutting temperature compound (OCT; Tissue-Tek) (Gentaur). The sections were processed as described above and analyzed using immunofluorescent microscopy or formalin fixed and paraffin embedded for picosirius red staining or SHG analysis.

Fibrillar collagen imaging

Collagen in de-cellularized 3D ECMs or in paraffin-embedded melanoma tissues was stained with picosirius red using standard protocols. Tumor sections were analyzed using polarized light microscopy as previously described (Rich & Whittaker, 2005). Images were acquired under polarized illumination using a light transmission microscope (Zeiss PALM, at 5 x magnification). Fiber thickness was analyzed according to the change in polarization color. Birefringence hue and amount were quantified as a percent of total tissue area using ImageJ

software. SHG imaging of paraffin-embedded melanoma tissues was recorded on a Zeiss 510 NLO microscope (Carl Zeiss Microscopy) with the Mai Tai HP DeepSee (Newport Corporation) and 360-440 nm band pass filter.

Tissue microarray analysis

Immunohistochemistry analysis of DDR1 and DDR2 expression was assessed on TMA sections (US Biomax, #ME1004h) using VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories) with the DAB reagent (Vector Laboratories) and counterstained with haematoxylin (Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Images were captured using a bright field microscope (Nikon, at 20 x magnification). Histological scoring of the samples was performed in blinded fashion.

Analysis of gene expression from public databases

Publicly available gene expression data sets of human melanoma cell lines were used to analyze DDR1, DDR2, MITF, AXL and SOX10 levels according to the differentiation status. Cell states were classified into four differentiation states (Undifferentiated, Neural crest-like, Transitory, Melanocytic) as previously described (Tsoi et al., 2018) and using GSE80829 and <https://systems.crump.ucla.edu/dediff/>. DDR1, DDR2, MITF and AXL expression was analyzed in human melanoma samples within the Mannheim (GSE4843), Philadelphia (GSE4841), and Zurich (GSE4840) cohorts (Widmer et al., 2012). Proliferative (MITFhigh AXLlow) and invasive (MITFlow AXLhigh) melanoma subgroups were defined as previously described (Rathore et al., 2019; Widmer et al., 2012). Genomic alterations of DDR1 and DDR2 from the skin melanoma TCGA database were retrieved using cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>). Correlation between DDR1 genomic alterations and expression and the activity ($-\log_{10}[IC50M]$) of BRAFi (Dabrafenib, Vemurafenib) and MEKi (Trametinib) were performed across the GDSC (Genomic of Drug Sensitivity in Cancer) melanoma cell line pharmacogenomic data using CellMinerCDB (<https://discover.nci.nih.gov/cellminerfdb/>) (Luna et al, 2021).

Statistical analysis

Unless otherwise stated, all experiments were repeated at least 3 times and representative data/images are shown. Statistical data analysis was performed using GraphPad Prism 8 software. The unpaired two-tailed Mann-Whitney test was used for statistical comparisons between two groups. The Kruskal-Wallis test with the indicated post-tests or two-way ANOVA analysis of variance test with Sidak, Dunnett or Tukey post-tests was used to compare three or more groups. A Chi-square test was performed for statistical analysis of TMA. A Log-rank (Mantel-Cox) test was applied to Kaplan-Meier survival curves. Data represent biological replicates (n) and are depicted as mean values \pm SEM as indicated in the figure legends.

Data availability:

The mass spectrometry proteomics data have been deposited on the ProteomeXchange Consortium of proteomics resource (<http://www.proteomexchange.org>) with the dataset identifier PXD026645

Acknowledgments. We thank Roger Lo for the M229P/R, M238P/R and M249P/R melanoma cells Chris Marine and Ghanem for the short-term cultured melanoma cells and Richard Neubig for the UACC62 parental and resistant melanoma cells. We acknowledge Maeva Gesson and Marie Irondelle from the C3M imaging facility for their helpful advice. We thank the C3M animal facility and Cédric Matthews for the SHG microscopy analysis (IBDM imaging platform, AMU-Marseille). We also thank Ana Popovic for critical reading of the manuscript. This work was supported by funds from the: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Ligue Contre le Cancer, Institut National du Cancer (INCA_12673), ITMO Cancer Aviesan (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Science and Health) within the framework of the Cancer Plan, and the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01. We also thank the PiCSL-FBI platform (IBDM, AMU-Marseille) a

member of France Biolmaging, supported by the "Investments for the Future" (ANR-10-INBS-04). The financial contribution of the Conseil général 06, Canceropôle Provence Alpes Côte d'Azur and Région Provence Alpes Côte d'Azur to the C3M is also acknowledged. I.B. was a recipient of a doctoral fellowship from La Ligue Contre le Cancer.

Author contributions. S.T.D. and M.D. designed the study, analyzed and interpreted data, ensured financial support, and wrote the paper with inputs from I.B., A.P., V.P. and C.A.G. I.B. performed the majority of the experiments and analyzed the data with the help of M.L., A.C., A.M., S.D.,

M.O., C.R., V.P., A.P. and C.A.G. F.L. performed the flow cytometry analyses. S.P. performed the AFM analyses. S.A. performed the mass spectrometry analyses. C.G. and T.P. contributed with reagents and expertise.

Conflict of Interest. T.P. is the co-founder of Yukin Therapeutics. The remaining authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Agarwal G, Mihai C, Iscru DF (2007) Interaction of discoidin domain receptor 1 with collagen type 1. *J Mol Biol* 367: 443-455
- Albregues J, Bourget I, Pons C, Butet V, Hofman P, Tartare-Deckert S, Feral CC, Meneguzzi G, Gaggioli C (2014) LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep* 7: 1664-1678
- Ambrogio C, Gomez-Lopez G, Falcone M, Vidal A, Nadal E, Crossetto N, Blasco RB, FernandezMarcos PJ, Sanchez-Céspedes M, Ren X et al (2016) Combined inhibition of DDR1 and Notch signaling is a therapeutic strategy for KRAS-driven lung adenocarcinoma. *Nat Med* 22: 270-277
- Badiola I, Villace P, Basaldua I, Olaso E (2011) Downregulation of discoidin domain receptor 2 in A375 human melanoma cells reduces its experimental liver metastasis ability. *Oncol Rep* 26: 971-978
- Beacham DA, Amatangelo MD, Cukierman E (2007) Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 10: Unit 10 19
- Cario M (2018) DDR1 and DDR2 in skin. *Cell Adh Migr* 12: 386-393
- Coelho NM, Arora PD, van Putten S, Boo S, Petrovic P, Lin AX, Hinz B, McCulloch CA (2017) Discoidin Domain Receptor 1 Mediates Myosin-Dependent Collagen Contraction. *Cell Rep* 18: 1774-1790
- Corcoran DS, Juskaite V, Xu Y, Gorklitz F, Alexandrov Y, Dunsby C, French PMW, Leitinger B (2019) DDR1 autophosphorylation is a result of aggregation into dense clusters. *Sci Rep* 9: 17104
- Corsa CA, Brenot A, Grither WR, Van Hove S, Loza AJ, Zhang K, Ponik SM, Liu Y, DeNardo DG, Eliceiri KW et al (2016) The Action of Discoidin Domain Receptor 2 in Basal Tumor Cells and Stromal Cancer-Associated Fibroblasts Is Critical for Breast Cancer Metastasis. *Cell Rep* 15: 2510-2523
- Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294: 1708-1712
- Day E, Waters B, Spiegel K, Alnadaf T, Manley PW, Buchdunger E, Walker C, Jarai G (2008) Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur J Pharmacol* 599: 44-53
- De Donatis GM, Le Pape E, Pierron A, Cheli Y, Hofman V, Hofman P, Allegra M, Zahaf K, Bahadoran P, Rocchi S et al (2016) NF- κ B2 induces senescence bypass in melanoma via a direct transcriptional activation of EZH2. *Oncogene* 35: 2735-2745
- Didier R, Mallavialle A, Ben Jouira R, Domdom MA, Tichet M, Auberger P, Luciano F, Ohanna M, Tartare-Deckert S, Deckert M (2018) Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Mol Cancer Ther* 17: 1416-1429
- Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M (2001) Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344: 1038-1042
- Fedorenko IV, Wargo JA, Flaherty KT, Messina JL, Smalley KSM (2015) BRAF Inhibition Generates a Host-Tumor Niche that Mediates Therapeutic Escape. *J Invest Dermatol* 135: 3115-3124
- Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE (2012) From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 12: 349-361
- Fletcher AL, Acton SE, Knoblich K (2015) Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 15: 350-361
- Girard CA, Lecacheur M, Ben Jouira R, Berestjuk I, Diazzi S, Prod'homme V, Mallavialle A, Larbret F, Gesson M, Schaub S et al (2020) A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma. *Cancer Res* 80: 1927-1941
- Gopal S, Veracini L, Grall D, Butori C, Schaub S, Audebert S, Camoin L, Baudalet E, Radwanska A, Beghelli-de la Forest Divonne S et al (2017) Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nat Commun* 8: 14105
- Grither WR, Longmore GD (2018) Inhibition of tumor-microenvironment interaction and tumor invasion by small-molecule allosteric inhibitor of DDR2 extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E7786-E7794
- Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, Xu C, Dutt A, Zhou W, Brace LE, Woods BA, Lin W, Zhang J et al (2011) Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov* 1: 78-89
- Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, Larkin J, Marais R, Sahai E (2015) Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer Cell* 27: 574-588
- Hynes RO, Naba A (2012) Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a004903
- Jeitany M, Leroy C, Tosti P, Lafitte M, Le Guet J, Simon V, Bonenfant D, Robert B, Grillet F, Mollevi C et al (2018) Inhibition of DDR1-BCR signalling by nilotinib as a new therapeutic strategy for metastatic colorectal cancer. *EMBO Mol Med* 10
- Jenkins MH, Croteau W, Mullins DW, Brinckerhoff CE (2015) The BRAF(V600E) inhibitor,

34. PLX4032, increases type I collagen synthesis in melanoma cells. *Matrix Biol* 48: 66-77
35. Kalluri R (2016) The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 16: 582-598
36. Kaukonen R, Mai A, Georgiadou M, Saari M, De Franceschi N, Betz T, Sihto H, Ventela S, Elo L, Jokitalo E et al (2016) Normal stroma suppresses cancer cell proliferation via mechanosensitive regulation of JMJD1a-mediated transcription. *Nat Commun* 7: 12237
37. Kaur A, Webster MR, Marchbank K, Behera R, Ndoye A, Kugel CH, 3rd, Dang VM, Appleton J, O'Connell MP, Cheng P et al (2016) sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. *Nature* 532: 250-254
38. Kim HG, Tan L, Weisberg EL, Liu F, Canning P, Choi HG, Ezell SA, Wu H, Zhao Z, Wang J et al
39. (2013) Discovery of a potent and selective DDR1 receptor tyrosine kinase inhibitor. *ACS Chem Biol* 8: 2145-2150
40. Kim MH, Kim J, Hong H, Lee SH, Lee JK, Jung E, Kim J (2016) Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. *EMBO J* 35: 462-478
41. Landowski TH, Olashaw NE, Agrawal D, Dalton WS (2003) Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene* 22: 2417-2421
42. Leitinger B (2014) Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int Rev Cell Mol Biol* 310: 39-87
43. Luna A, Elloumi F, Varma S, Wang Y, Rajapakse VN, Aladjem MI, Robert J, Sander C, Pommier Y, Reinhold WC (2021) CellMiner Cross-Database (CellMinerCDB) version 1.2: Exploration of patient-derived cancer cell line pharmacogenomics. *Nucleic Acids Res* 49: D1083-D1093
44. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS (2009) Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 9: 665-674
45. Misek SA, Appleton KM, Dexheimer TS, Lisabeth EM, Lo RS, Larsen SD, Gallo KA, Neubig RR (2020) Rho-mediated signaling promotes BRAF inhibitor resistance in dedifferentiated melanoma cells. *Oncogene* 39: 1466-1483
46. Miskolczi Z, Smith MP, Rowling EJ, Ferguson J, Barriuso J, Wellbrock C (2018) Collagen abundance controls melanoma phenotypes through lineage-specific microenvironment sensing. *Oncogene* 37: 3166-3182
47. Mondragon L, Mhaidly R, De Donatis GM, Tosolini M, Dao P, Martin AR, Pons C, Chiche J, Jacquin M, Imbert V et al (2019) GAPDH Overexpression in the T Cell Lineage Promotes
48. Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma through an NF-kappaB-Dependent Mechanism. *Cancer Cell* 36: 268-287 e210
49. Mouw JK, Ou G, Weaver VM (2014) Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 771-785
50. Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, Kong X, Possik PA, Cornelissen-Steijger PD, Geukes Foppen MH et al (2014) Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 5: 5712
51. Nadiminty N, Tummala R, Liu C, Yang J, Lou W, Evans CP, Gao AC (2013) NF-kappaB2/p52 induces resistance to enzalutamide in prostate cancer: role of androgen receptor and its variants. *Mol Cancer Ther* 12: 1629-1637
52. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, 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
53. Orgaz JL, Crosas-Molist E, Sadok A, Perdrix-Rosell A, Maiques O, Rodriguez-Hernandez I, Monger J, Mele S, Georgouli M, Bridgeman V et al (2020) Myosin II Reactivation and Cytoskeletal Remodeling as a Hallmark and a Vulnerability in Melanoma Therapy Resistance. *Cancer Cell* 37: 85-103 e109
54. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 15: 1243-1253
55. Poudel B, Lee YM, Kim DK (2015) DDR2 inhibition reduces migration and invasion of murine metastatic melanoma cells by suppressing MMP2/9 expression through ERK/NF-kappaB pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 47: 292-298
56. Rambow F, Marine JC, Goding CR (2019) Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev* 33: 1295-1318
57. Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Ben Jouira R, Garcia E, Larbret F, Gesson M, Audebert S, Lacour JP et al (2019) Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 38: 5873-5889
58. Reger de Moura C, Battistella M, Sohail A, Caudron A, Feugeas JP, Podgorniak MP, Pages C, Mazouz Dorval S, Marco O, Menashi S et al (2019) Discoidin domain receptors: A promising target in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 32: 697-707
59. Rich L, Whittaker P (2005) Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J morphol Sci* 22: 97-104
60. Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, Chiarion Sileni V, Schachter J, Garbe C, Bondarenko I et al (2019) Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 381: 626-636
61. Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E, Sabatie E, Cano A, Garcia de Herreros A, Ballotti R et al (2006) SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 66: 7516-7523
62. Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresch DA (2015) Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol* 25: 234-240
63. Sero JE, Sailem HZ, Ardy RC, Almuttaqi H, Zhang T, Bakal C (2015) Cell shape and the microenvironment regulate nuclear translocation of NF-kappaB in breast epithelial and tumor cells. *Mol Syst Biol* 11: 790
64. Shain AH, Bastian BC (2016) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 16: 345-358
65. Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G et al (1997) An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* 1: 25-34
66. Smith MP, Brunton H, Rowling EJ, Ferguson J, Arozarena I, Miskolczi Z, Lee JL, Girotti MR, Marais R, Levesque MP et al (2016) Inhibiting Drivers of Non-mutational Drug Tolerance Is a
67. Salvage Strategy for Targeted Melanoma Therapy. *Cancer Cell* 29: 270-284
68. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT et al (2012) Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487: 500-504
69. Taniguchi K, Karin M (2018) NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol* 18: 309-324

72. Tichet M, Prod'Homme V, Fenouille N, Ambrosetti D, Mallavialle A, Cerezo M, Ohanna M, Audebert S, Rocchi S, Giaccherio D et al (2015) Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat Commun* 6: 6993
73. Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, Wong DJL, Atefi M, Shirazi R, Wang X et al
74. (2018) Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* 33: 890-904 e895
75. Tu MM, Lee FYF, Jones RT, Kimball AK, Saravia E, Graziano RF, Coleman B, Menard K, Yan J, Michaud E et al (2019) Targeting DDR2 enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy. *Sci Adv* 5: eaav2437
76. Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, Kleer CG, Fridman R (2012) Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 31: 295-321
77. 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
78. Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T (1997) The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1: 13-23
79. von Massenhausen A, Sanders C, Bragelmann J, Konantz M, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Duensing S, Schrock A, Bootz F et al (2016) Targeting DDR2 in head and neck squamous cell carcinoma with dasatinib. *Int J Cancer* 139: 2359-2369
80. Widmer DS, Cheng PF, Eichhoff OM, Belloni BC, Zipser MC, Schlegel NC, Javelaud D, Mauviel A, Dummer R, Hoek KS (2012) Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res* 25: 343-353
81. Wouters J, Kalender-Atak Z, Minnoye L, Spanier KI, De Waegeneer M, Bravo Gonzalez-Blas C, Mauduit D, Davie K, Hulselmans G, Najem A et al (2020) Robust gene expression programs underlie recurrent cell states and phenotype switching in melanoma. *Nat Cell Biol* 22: 986-998
- Yeung DA, Shanker N, Sohail A, Weiss BA, Wang C, Wellmerling J, Das S, Ganju RK, Miller JLC,
82. Herr AB et al (2019) Clustering, Spatial Distribution, and Phosphorylation of Discoidin Domain Receptors 1 and 2 in Response to Soluble Collagen I. *J Mol Biol* 431: 368-390
83. Young HL, Rowling EJ, Bugatti M, Giurisato E, Luheshi N, Arozarena I, Acosta JC, Kamarashev J, Frederick DT, Cooper ZA et al (2017) An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *J Exp Med* 214: 1691-1710

FIGURE 1

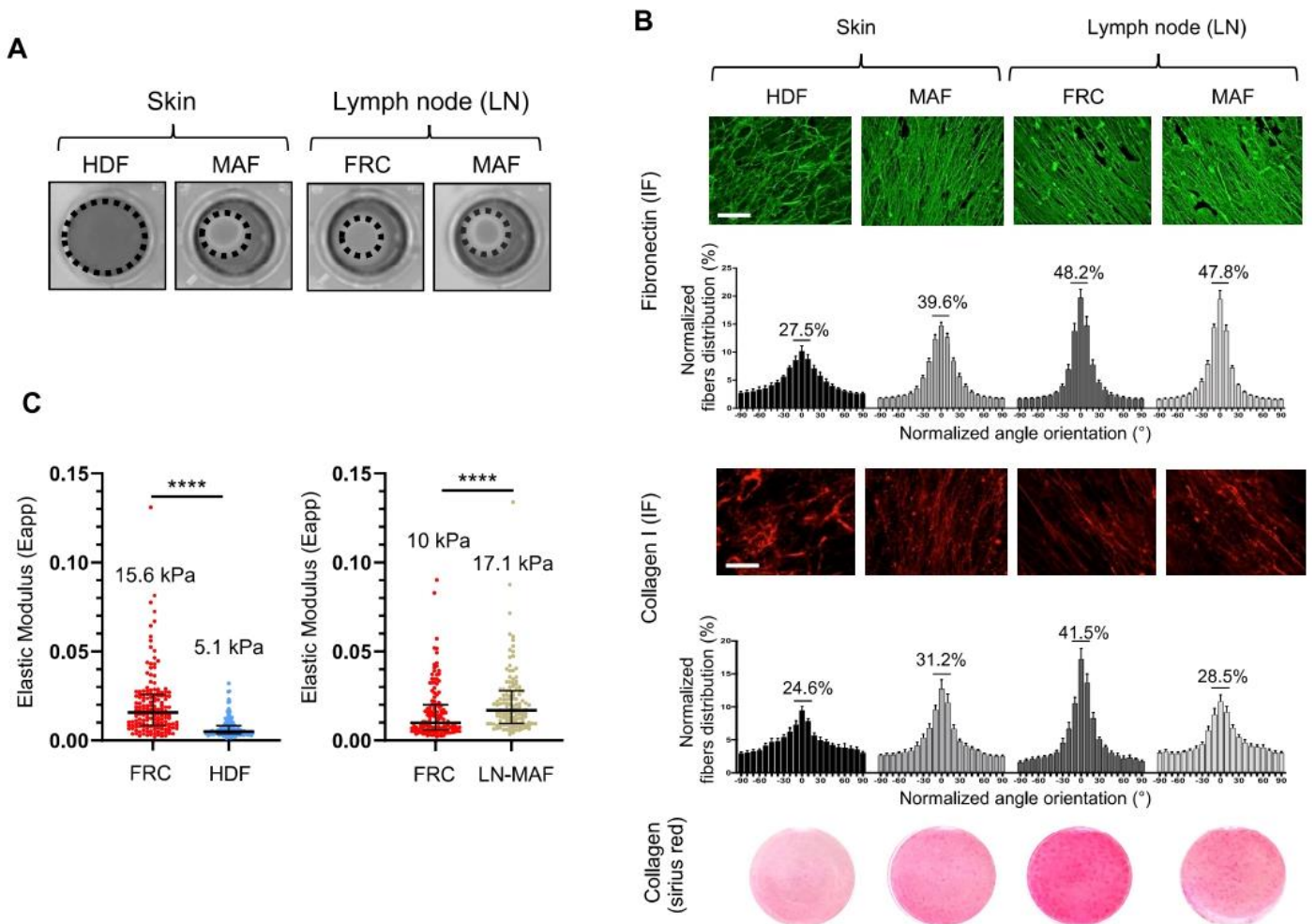


Figure 1. Composition, topology and mechanical properties of fibroblast-derived 3D ECMs.

A. Images show collagen matrix gel contraction by HDF (human dermal fibroblasts), skin-MAF (melanoma associated fibroblasts isolated from skin lesions), LN-FRC (lymph node fibroblast reticular cells), and LN-MAF (melanoma associated fibroblasts isolated from metastatic lymph node). Data are representative of $n = 3$ independent experiments.

B. Immunofluorescence analysis of fibronectin (green) and collagen (red) fibers on de-cellularized ECM produced by human fibroblasts. Fibers orientation was quantified using ImageJ software. Scale bar, $50 \mu\text{m}$. A representative image of picrosirius red staining from 10 analyzed is shown for each condition.

C. Atomic force microscopy (AFM) measurement of the elastic properties (Apparent Young modulus E_{app}) of fibroblast-derived ECMs. Each dot represents a specific Young's Modulus obtained by fitting the corresponding individual force-curve acquired on a determined point of the sample. A representative experiment from 2 independent experiments is shown.

FIGURE 2

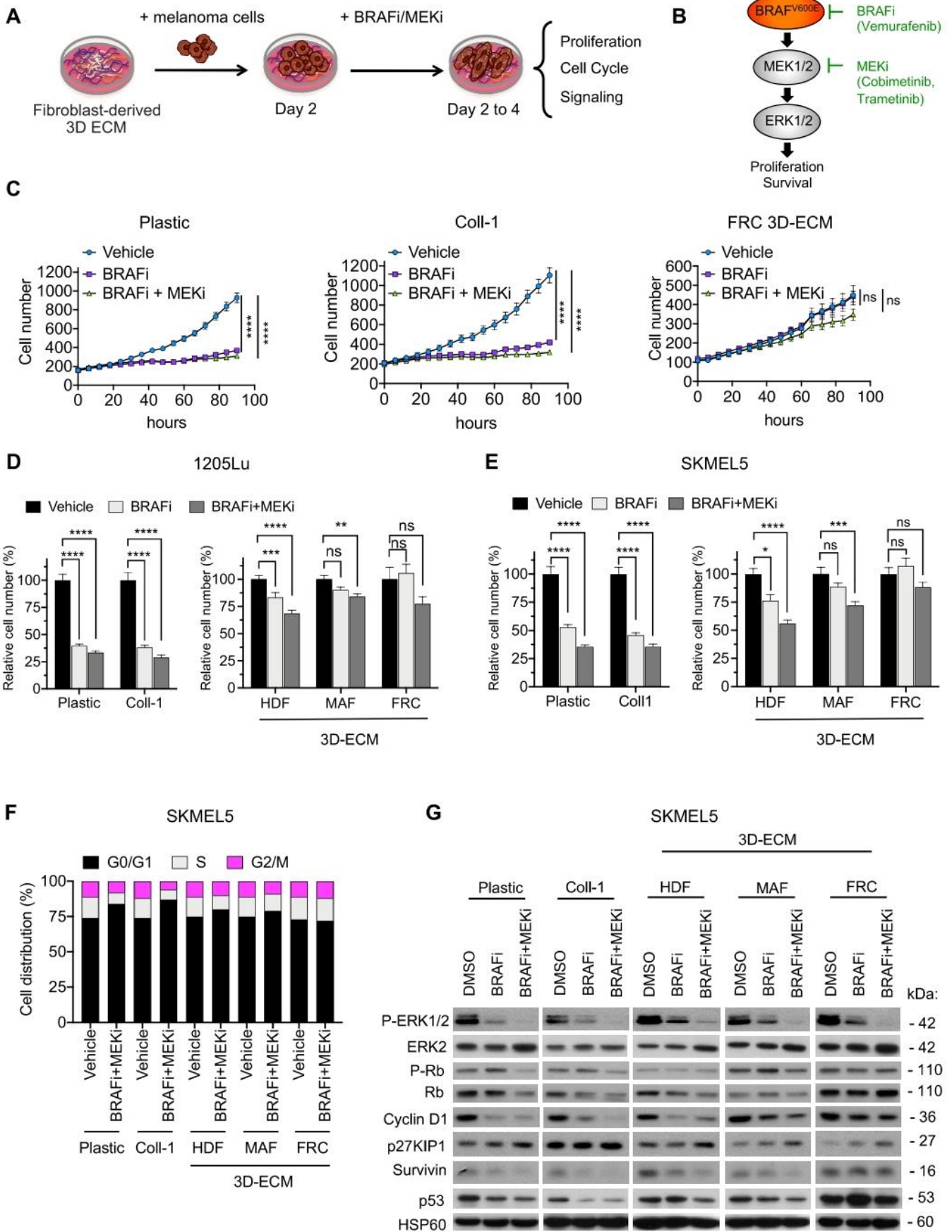


Figure 2. Fibroblast-derived 3D ECM confers drug-protective action to melanoma cells against anti-BRAF^{V600E} therapies.

A. Scheme of the ECM-mediated drug protection assay.

B. Illustration of the BRAF^{V600E} pathway and the MAPK pathway inhibitors used in the study.

C. Time-lapse imaging of proliferation of NuLight-labeled 1205Lu cells plated on plastic (left panel), Coll-1 (collagen-1; middle panel) or FRC-derived ECM (right panel) and treated with vehicle, 5 μ M BRAFi or 2 μ M BRAFi plus 0.01 μ M MEKi using the IncuCyte ZOOM system. Each data points represent the mean of NuLight red nuclear objects per field \pm SEM. *P=0.0475, ***P=0.0012, ****P<0.0001, two-way ANOVA was followed by Dunnett's multiple comparison test (n = 3).

D, E. Quantification of proliferation of 1205Lu (D) and SKMEL5 (E) cells plated for 48 h on plastic, Coll-1 or the indicated fibroblast-derived ECMs prior a 96 h treatment with vehicle, 5 μ M BRAFi or 2 μ M BRAFi plus 0.01 μ M MEKi. Cells were counted by Hoechst-labeled nuclei staining. Data are represented as bar plots with mean \pm SEM normalized to vehicle. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001, Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison test .

F Flow cytometry analysis of cell cycle distribution of SKMEL5 cells cultured on plastic, Coll-1 or the indicated fibroblast-derived ECMs and treated with vehicle or 2 μ M BRAFi combined with 0.01 μ M MEKi. The percentage of cells in different phases of the cell cycle is indicated.

G Immunoblotting of protein extracts from SKMEL5 cells cultivated as described above on plastic, Coll-1 or the indicated fibroblast-derived ECMs in the presence or not of BRAFi or BRAFi/MEKi for 96 h, using antibodies against P-ERK1/2, ERK2 or cell cycle markers (P-Rb, Rb, Cyclin D1, p27KIP1, Survivin, p53). HSP60, loading control.

Source data are available online for this figure.

FIGURE 3

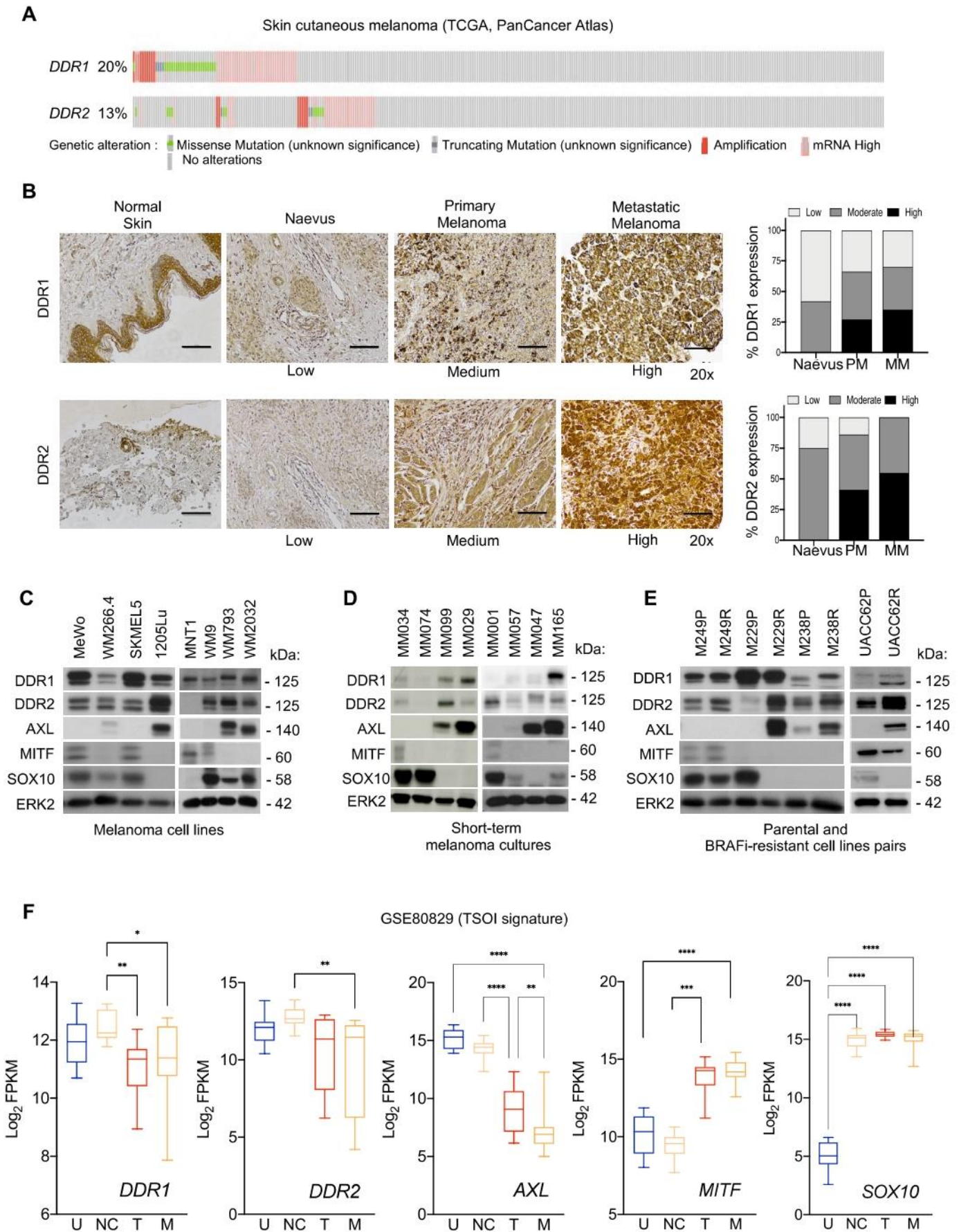


Figure 3. Expression of DDR1 and DDR2 in human melanoma.

A. Meta-analysis of 363 cutaneous melanoma from TCGA (skin cutaneous melanoma, PanCancer Atlas) (<http://www.cbioportal.org/>) showing the percentage of samples with genetic alterations of DDR1 and DDR2. Cases with missense (green) and truncating (blue) mutations, amplification (red) and mRNA overexpression (pink) are indicated; gray, individual cases.

B. Immunohistochemical analysis of DDR1 and DDR2 levels on human melanoma tissue microarrays. Representative IHC images and quantification (right bar histograms) of DDR1 and DDR2 expression in normal skin, naevus, primary melanoma (PM) and lymph node melanoma metastases (MM). Scale bar, 100 μ m. Histological scoring of the samples was performed in blinded fashion. Samples were scored as low, medium or high for DDR1 or DDR2 expression (naevus, n = 12; PM, n = 30; MM, n = 20). Chi-square, ****P<0.0001.

C, D, E. Immunoblotting of equal amounts of protein extracts from melanoma cell lines (C), patient-derived short-term cell cultures (D) or isogenic pairs of parental sensitive and BRAFi resistant cell lines (E) using antibodies against DDR1, DDR2 or markers of the melanoma cell differentiation AXL, MITF or SOX10. ERK2, loading control.

F. DDR1 and DDR2 levels increase in dedifferentiated melanoma cells. Box and whisker plots (10th to 90th percentile) show DDR1, DDR2, MITF, AXL and SOX10 expression among four differentiation melanoma cell states (U, Undifferentiated, n=10; NC, Neural crest-like, n=14; T, Transitory, n=12; M, Melanocytic, n=17) (GSE80829). The expression of AXL, MITF and SOX10 is shown as control markers of cell differentiation. n, number of cell lines representative of each cell state. Multiple comparisons were performed using two-way ANOVA. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Source data are available online for this figure.

FIGURE 4

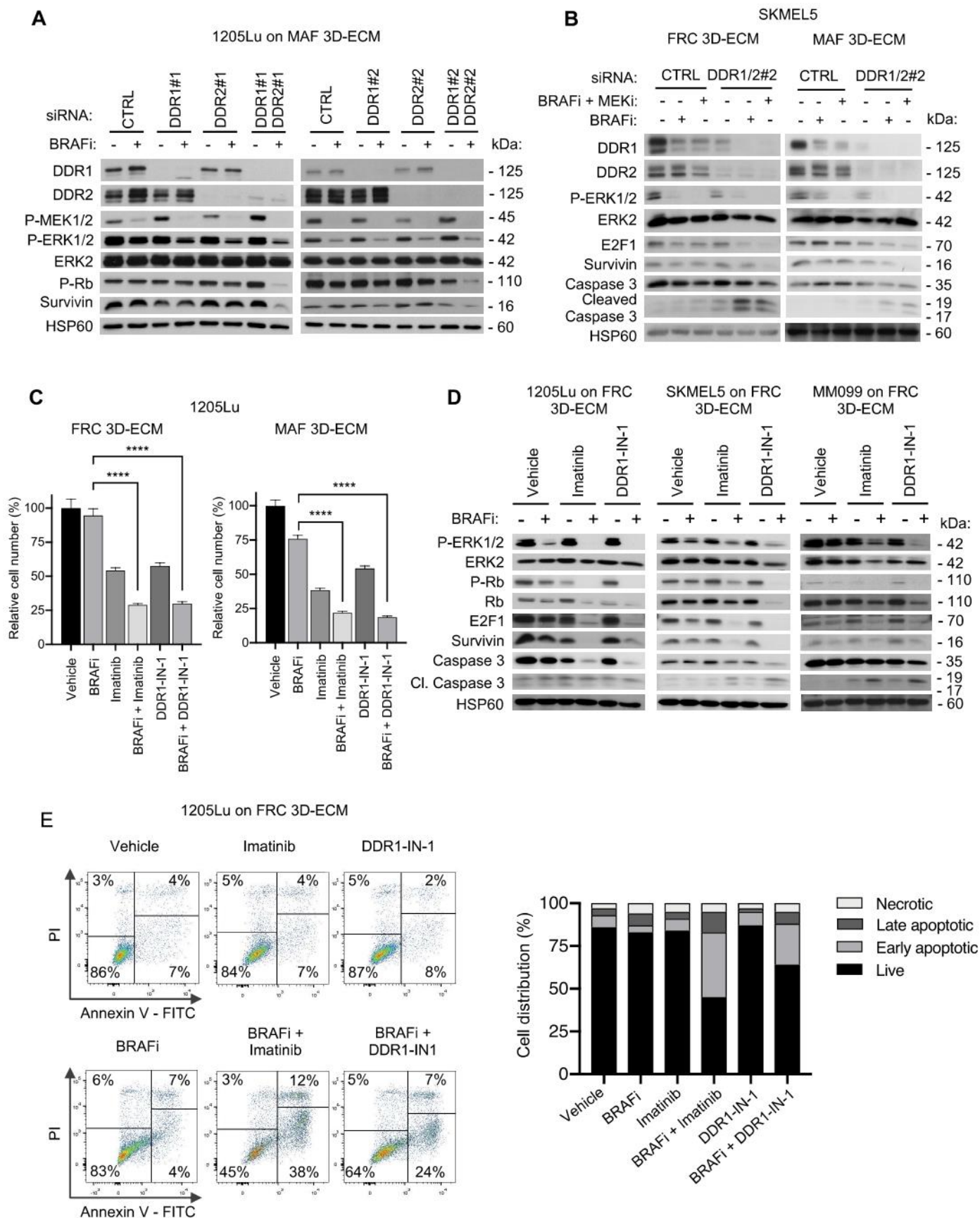


Figure 4. Inhibition of DDR1 and DDR2 by genetic or pharmacological approaches abrogates ECM-mediated resistance to BRAF^{V600} pathway inhibition.

A. Immunoblotting of protein extracts from 1205Lu cells transfected with a siRNA control (CTRL) or two different sequences of siRNA (#1 and #2) directed against DDR1 or DDR2 alone or in combination prior being cultivated on MAF-derived ECM and treated or not with 5 μ M BRAFi for 96 h, using antibodies against the indicated proteins. HSP60, loading control.

B. Immunoblotting of protein extracts from SKMEL5 cells transfected with siCTRL or the combination siDDR1#2/siDDR2#2 prior being cultivated on FRC- or MAF-derived ECMs (left and right panels, respectively) and treated with vehicle, 5 μ M BRAFi or 2 μ M BRAFi plus 0.01 μ M MEKi, using antibodies against the indicated proteins. HSP60, loading control.

C. Quantification of the time-lapse imaging of the proliferation of NuLight-labeled 1205Lu cells using the IncuCyte ZOOM system. Cells were plated for 48 h on FRC- or MAF-derived ECMs prior a 96 h treatment with vehicle or 5 μ M BRAFi in the presence or not of 7 μ M Imatinib or 1 μ M DDR1-IN-1. The bar plots represent the mean normalized to vehicle of NuLight red nuclear objects per field \pm SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. ****P<0.0001, two way ANOVA was followed by Sidak's multiple comparison test.

D. Immunoblotting of protein extracts from 1205Lu, SKMEL5 and MM099 cells plated for 48 h on FRC-derived ECM prior a 96 h treatment with vehicle or 5 μ M BRAFi in the presence or not of Imatinib (7 μ M for 1205Lu, 10 μ M for SKMEL5 and MM099) or DDR1-IN-1 (1 μ M for 1205Lu, 5 μ M for SKMEL5, 3 μ M for MM099), using antibodies against the indicated proteins. HSP60, loading control.

E. Flow cytometry analysis of cell death (Annexin V/PI labeling) in 1205Lu cells plated on FRC-derived ECM and treated as above. Right bar plots show the distribution of cells (% of total) across the different forms of death.

Source data are available online for this figure.

FIGURE 5

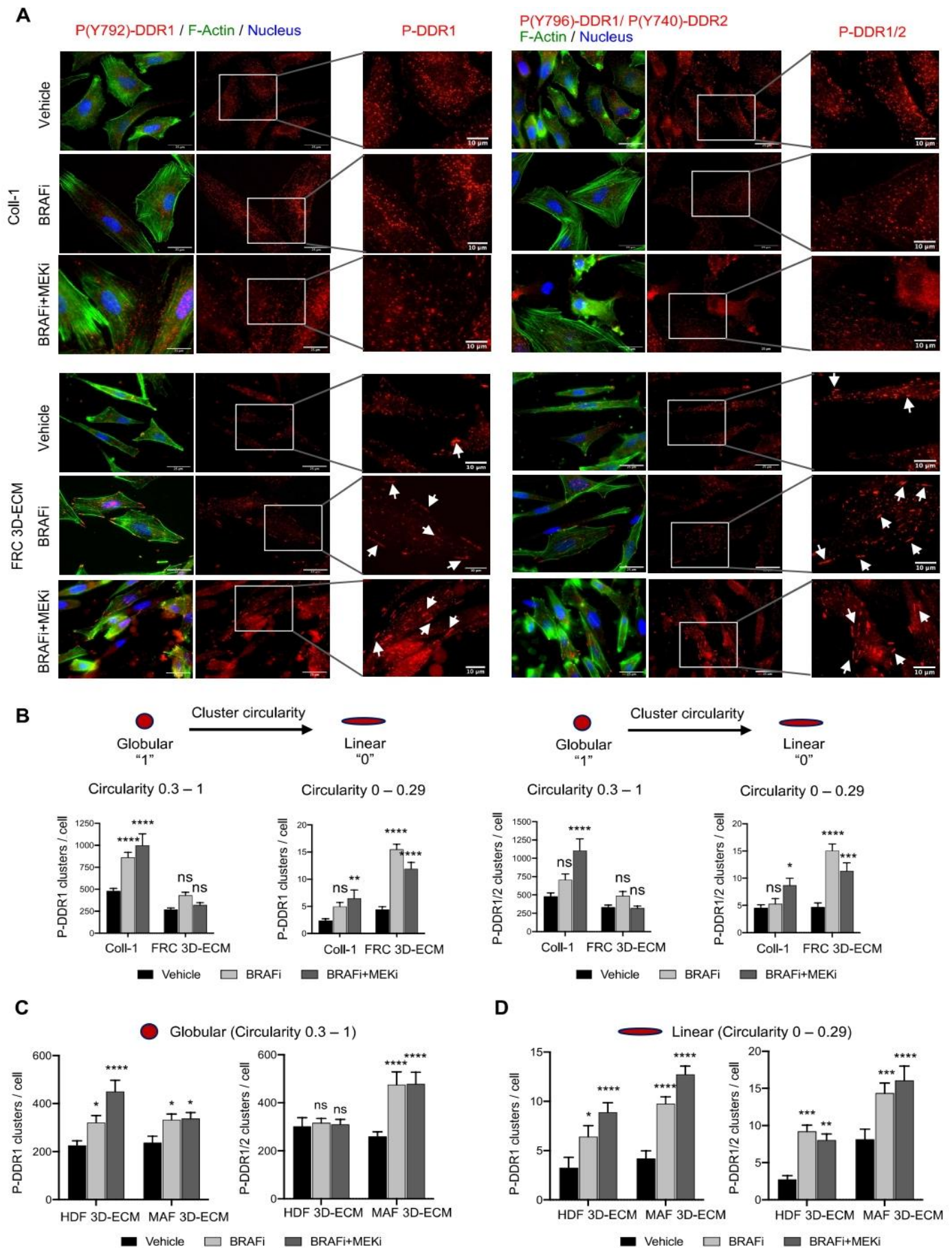


Figure 5. Interaction of melanoma cells with 3D-ECMs induces the linear clustering of phosphorylated DDR upon BRAFi/MEKi treatment.

A. Representative images of 1205 cells cultivated on collagen-I (Coll-I) or FRC-derived ECM for 48 h prior treatment with vehicle or 5 μ M BRAFi or 2 μ M BRAFi plus 0.01 μ M MEKi for 96 h. Immunofluorescence for Phospho-DDR1 (P(Y792)-DDR1) (red; left panels) and Phospho-DDR1/2 (P(Y796)-DDR1/P(Y740)-DDR2) (red; right panels), F-actin (green) and nuclei (blue) is shown. Enlarged images of P-DDR1 and P-DDR1/2 immunostaining are shown. White arrows indicate P-DDR1 and P-DDR1/2 cell membrane linear clustering. Scale bar, 25 μ m (enlarged images: scale bar, 10 μ m).

B. Quantification of globular versus linear clusters of Phospho-DDR1 (left panels) and PhosphoDDR1/2 (right panels) from immunofluorescence staining shown in (A) using Image J software.

Prior the quantification of DDRs clusters a “subtract background” function of ImageJ has been applied to all images. In order to quantify clusters, the IsoData threshold has been used.

Clusters with circularity 0.3 to 1 has been defined as “globular” and clusters with circularity 0 to 0.29 has been as “linear”. Data are from >20 individual cells (n = 3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, 2way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparisons test.

C, D Quantification of globular (C) and linear (D) clusters of Phospho-DDR1 and PhosphoDDR1/2 from immunofluorescence staining shown in Fig EV4A of 1205Lu cells cultivated on HDF- or MAF-derived ECM and treated with the indicated targeted drugs as described in (A).

Data are from >20 individual cells. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, 2way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparisons test.

Source data are available online for this figure.

Figure 6. Targeting DDR by Imatinib sensitizes melanoma tumors to BRAF^{V600E} inhibition.

- A. Outline of the experimental set up and treatment regimens.
- B. 1205Lu cells were s.c. inoculated into nude mice and when tumors reached 75 mm³, mice were treated with the indicated mono- or combo-therapy for 30 days. Graphs show tumor growth following treatment by indicated drugs. Data shown are mean ± SEM of tumor volume. Vehicle and Imatinib groups, n = 10 tumors from 5 mice; Vemu and Vemu/Imatinib groups, n = 20 tumors from 10 mice). ****P<0.0001, two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison.
- C. Scatter plot graphs showing the tumor weight upon treatment by the indicated mono- or combo-therapy. Data shown are mean ± SEM of tumor weight (n = 6 mice). ***P<0.0002, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test; ns, non-significant.
- D. Immunofluorescence stainings using anti-cleaved Caspase 3 (red), anti-Ki67 (green) and DAPI in tumor sections of 1205Lu-derived xenografts from (B). Scale bar, 100 μm. A microphotograph of the tumor size in each treated group is shown (representative of n = 5 to 10 mice).
- E. Kaplan-Meier survival curves of mice treated with vehicle, Imatinib, BRAFi or BRAFi plus Imatinib. Median time to progression was 18, 20, 36 and 48 days, respectively. Log rank (Mantel-Cox) for BRAFi vs BRAFi/Imatinib mesylate. ****p<0.0001 and hazard ratio (log rank) : 0.2403 (95% CI of ration, 0.08123 to 0.7106).
- F. Mouse body weight was measured at the indicated day. Data shown are mean ± SEM (n = 5 to 10 mice).

FIGURE 7

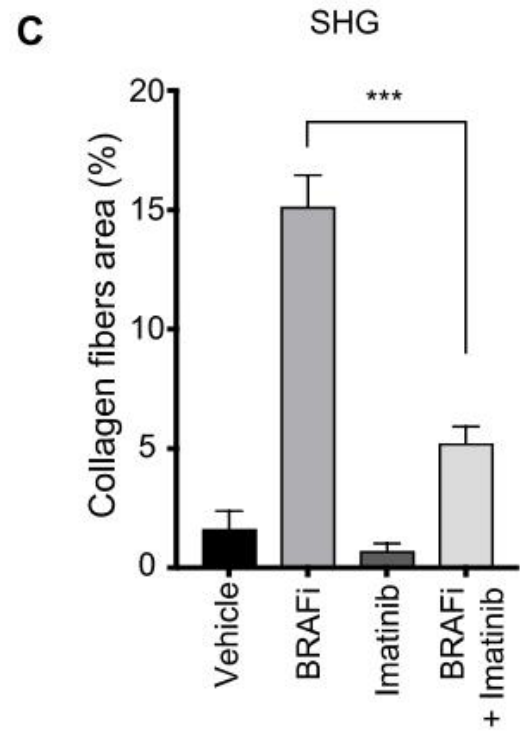
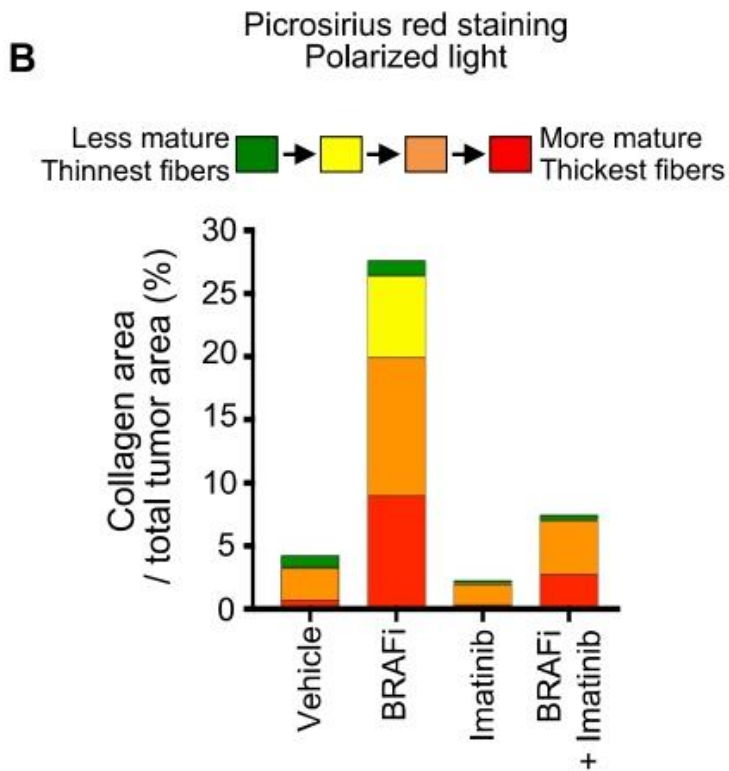
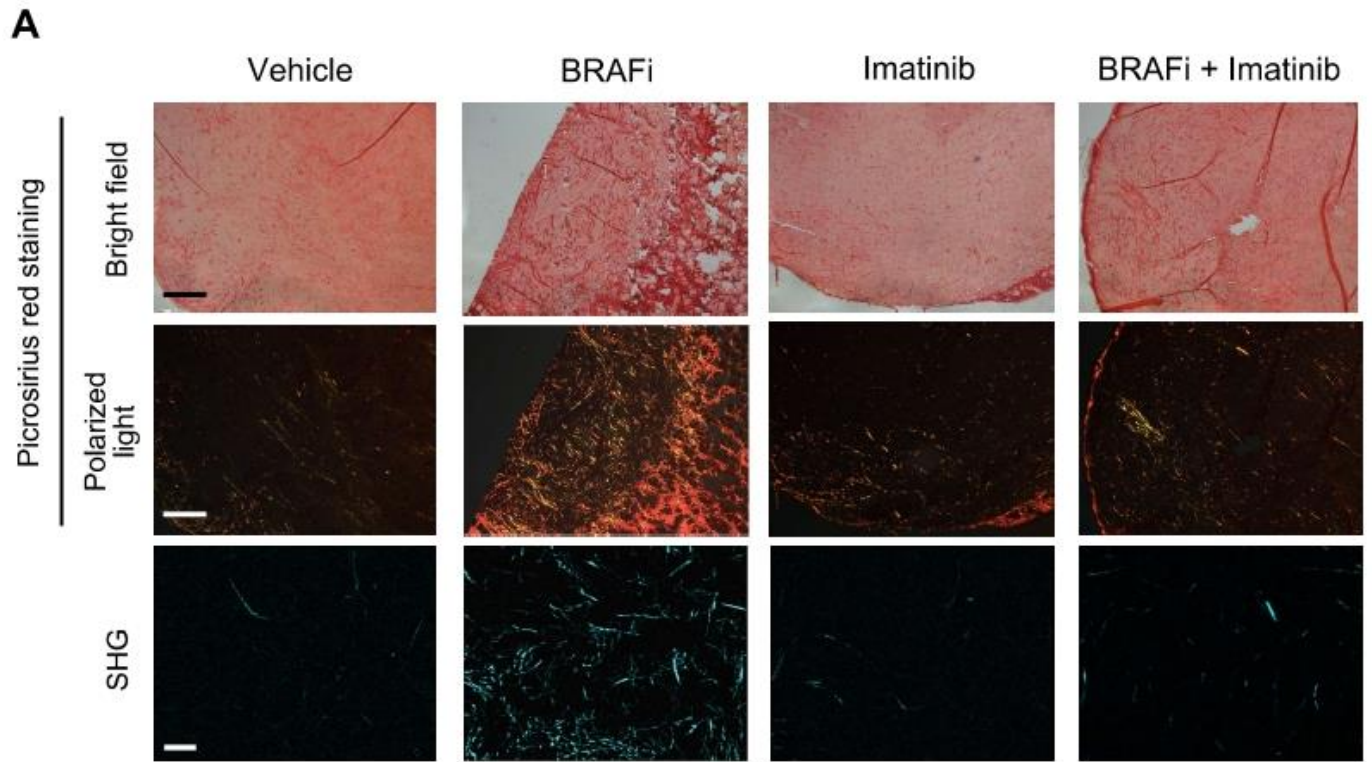


Figure 7. Imatinib normalizes collagen deposition and remodeling induced upon BRAFi treatment.

A. Sections of 1205Lu xenografts from Fig. 6B were stained with picosirius red and imaged under transmission light (upper panels) or polarized light (middle panels) (scale bar, 500 μm) or imaged by second harmonic generation (SHG) microscopy (lower panels) (scale bar, 50 μm) to examine collagen fiber network upon the mono or combined regimens.

B. Quantification of collagen maturity and fiber thickness in 1205Lu xenografts stained with picosirius red using polarized light microscopy. Birefringence hue and amount of collagen fibers were quantified as a percent of total tissue area (2 to 4 fields per tumor section, n = 4 tumors per condition).

C. Quantification of collagen fibers using SHG microscopy in tumor sections from (A). *** $p < 0.0002$, Mann-Whitney test.

FIGURE 8

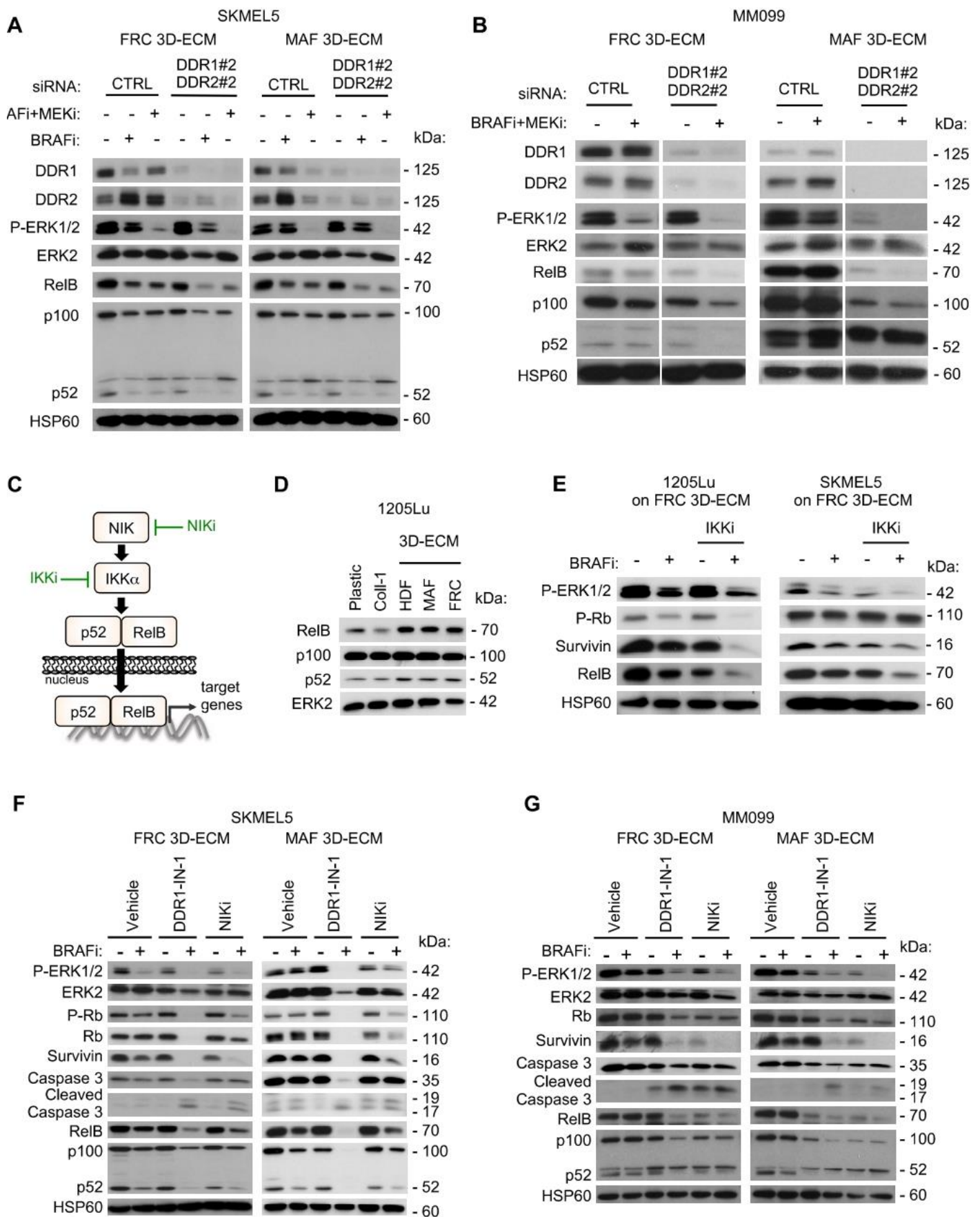


Figure 8. Targeting the non-canonical NF κ B2 pathway overcomes DDR-dependent MMDR to BRAF^{V600E} pathway inhibition.

A. Immunoblot analysis of protein extracts from siCTRL- or siDDR1/2-transfected SKMEL5 cells plated on FRC- or MAF-derived ECMs in the presence or not of 5 μ M BRAFi, 2 μ M BRAFi plus 0.01 μ M MEKi for 96 h using antibodies against DDR1, DDR2, P-ERK1/2, ERK2, RelB, p100/p52 and HSP60 as loading control were used.

B. Immunoblot analysis of protein extracts from siCTRL- or siDDR1/2-transfected MM099 short-term cultures plated on FRC- or MAF-derived ECMs in the presence or not of 2 μ M BRAFi plus 0.01 μ M MEKi for 96 h using antibodies as above.

C. Illustration of the non-canonical p52/RelB NF κ B2 pathway and inhibitors used in the study.

D. Immunoblot analysis of protein extracts from 1205Lu cells cultivated on plastic, Coll-1 or on indicated fibroblast-derived ECMs for 48 h using antibodies against RelB, p100/p52 and ERK2 as loading control.

E. Immunoblot analysis of protein extracts from 1205Lu (left panels) or SKMEL5 (right panels) cells cultivated on FRC-derived ECMs for 96 h in the presence of 5 μ M BRAFi and/or a pan-IKK inhibitor (IKKi, BMS-345541 3 μ M) using antibodies against P-ERK1/2, P-Rb, Survivin, RelB, and HSP60 as loading control.

F, G Immunoblot analysis of protein extracts obtained from SKMEL5 (F) or MM099 (G) cells plated on FRC- or MAF-derived ECMs and treated with 5 μ M BRAFi in combination or not with DDR1-IN-1 (5 μ M for SKMEL5 and 3 μ M for MM099) or 10 μ M NIK inhibitor (NIKi) for 96 h. Antibodies against P-ERK1/2, ERK2, P-Rb, Rb, Survivin, Caspase 3, cleaved Caspase 3, RelB, p100/p52 and HSP60 as loading control were used.

Source data are available online for this figure.

Figure 9

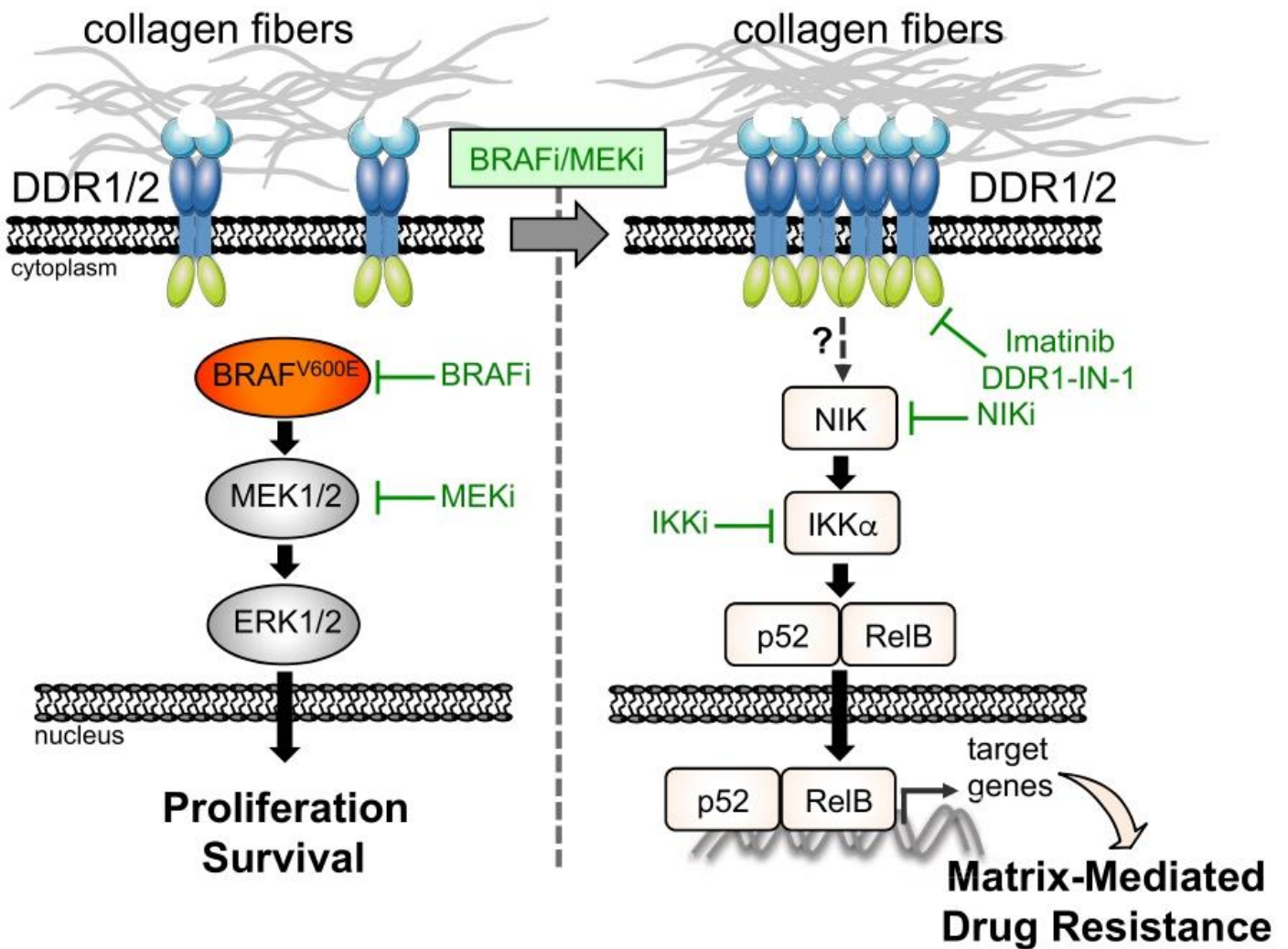


Figure 9. Model of DDR-dependent matrix-mediated drug resistance (MMDR) to MAPKtargeting therapies in melanoma.

BRAF-mutated melanoma cells adapt to BRAF/MEK inhibition by turning on a drug tolerant pathway that is initiated by collagen-rich environments interacting with cancer cell DDR. Clustered DDR activates the non-canonical NFκB2 (p52/RelB) pathway that is therapeutically targetable with clinically approved DDR inhibitor such as Imatinib or with pre-clinically tested NIK inhibitors.

Annexe III :

The profibrotic miR-143/145 cluster promotes mesenchymal phenotypic plasticity associated with resistance to targeted therapies in melanoma

- Résumé :

La plasticité cellulaire phénotypique adaptative a été décrite comme un facteur essentiel de résistance thérapeutique dans les cellules de mélanome. Ainsi, la résistance non génétique se définit par l'acquisition d'un phénotype de type mésenchymateux, un comportement invasif et des caractéristiques typiquement observées dans la fibrose comme la capacité à produire et remodeler de la matrice extracellulaire et activer les voies de la mécanotransduction. C'est dans ce contexte que cette étude a permis d'identifier le cluster de « FibromiRs » miR143/145, des micro-ARN impliqués dans la fibrogenèse, comme étant fortement exprimés dans les cellules présentant une résistance non génétique. A l'aide d'approches *in vitro* et *in vivo*, nous avons montré le rôle du cluster miR143/145 dans la régulation de la résistance non-génétique, la capacité des cellules à produire et remodeler la matrice et leur mécanotransduction en régulant les facteurs de transcription YAP et MRTF-A. Ce cluster contribue à la transition phénotypique vers un état de type mésenchymateux invasif et résistant. Au niveau moléculaire, la FSCN1 a été identifié comme un gène cible clé de miR143/145. Ces travaux ont permis de dévoiler le rôle du cluster de miR143/145 dans le comportement agressif des cellules de mélanome dédifférenciées résistantes et de proposer ce cluster comme nouvelles cibles thérapeutiques du mélanome.

Sous presse à Embo Molecular Medecine, publié sur BioRxiv : DOI : [10.1101/2021.07.02.450838](https://doi.org/10.1101/2021.07.02.450838)

Blockade of pro-fibrotic response mediated by the miR-143/-145 cluster prevents targeted therapy-induced phenotypic plasticity and delays resistance in melanoma

Diazzi S.^{1,2,3}, Baeri A.², Fassy J.², Lecacheur M.^{1,3}, Marin-Bejar O.^{4,5}, Girard C.A.^{1,3}, Lefevre L.^{1,3}, Lacoux C.², Irondelle M.¹, Mounier C.², Truchi M.², Couralet M.², Ohanna M.^{1,3}, Carminati A.^{1,3}, Berestjuk I.^{1,3}, Larbret F.^{1,3}, Gilot D.⁶, Vassaux G.², Marine J.-C.^{4,5}, Deckert M.^{1,3}, Mari B.^{2,7*†} and Tartare-Deckert S.^{1,3,7†*}

¹Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice 06200, France

²Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), 06560 Sophia Antipolis, France

³Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer 2016, Nice, France

⁴Laboratory For Molecular Cancer Biology, VIB Center for Cancer Biology, VIB, Leuven, Belgium

⁵Department of Oncology, KU Leuven, Leuven, Belgium

⁶INSERM U1242, University of Rennes, Rennes, France

⁷FHU-OncoAge, Nice, France

*Corresponding author. Email: tartare@unice.fr and mari@unice.fr

† These authors contributed equally to this work

Competing interests: S.D., B.M., S.T.-D., and M.D. have a patent pending on use of antifibrotic drugs to enhance targeted therapies in melanoma (EP21305325.9). All other authors declare that they have no competing interests.

ABSTRACT

Lineage dedifferentiation towards a mesenchymal-like state is a common mechanism of adaptive response and resistance to targeted therapy in melanoma. Yet, the transcriptional network driving this phenotypic plasticity remains elusive. Remarkably, this cellular state displays myofibroblast and fibrotic features and escapes MAPK inhibitors (MAPKi) through extracellular matrix (ECM) remodeling activities. Here we show that the anti-fibrotic drug Nintedanib/BIBF1120 is active to normalize the fibrous ECM network, enhance the efficacy of MAPK-targeted therapy and delay tumor relapse in a pre-clinical model of melanoma. We also uncovered the molecular networks that regulate the acquisition of this resistant phenotype and its reversion by Nintedanib, pointing the miR-143/-145 pro-fibrotic cluster as a driver of the therapy-resistant mesenchymal-like phenotype. Upregulation of the miR-143/145 cluster under BRAFi/MAPKi therapy was observed in melanoma cells *in vitro* and *in vivo* and was associated with an invasive/undifferentiated profile of resistant cells. The 2 mature miRNAs generated from this cluster, miR-143-3p and miR-145-5p collaborated to mediate phenotypic transition towards a drug resistant undifferentiated mesenchymal-like state by targeting Fascin actin-bundling protein 1 (FSCN1), modulating the dynamic crosstalk between the actin cytoskeleton and the ECM through the regulation of focal adhesion dynamics as well as contributing to a fine-tuning of mechanotransduction pathways. Our study brings insights into a novel miRNA-mediated regulatory network that contributes to non-genetic adaptive drug resistance and provides proof-of-principle that preventing MAPKi-induced pro-fibrotic stromal response is a viable therapeutic opportunity for patients on targeted therapy.

INTRODUCTION

Because of its high mutational burden, metastasis propensity, and resistance to treatment, cutaneous melanoma is one of the most aggressive human cancers and the deadliest form of skin cancer (1). Melanoma is a non-epithelial tumor that originates from neural crest-derived and pigment producing melanocytes in the skin. Genetic alterations in the *BRAF*, *NRAS*, or *NF1* genes define melanoma subtypes and lead to the MAPK pathway hyperactivation (2, 3). Current therapeutic options for BRAF^{V600E/K} metastatic melanoma include MAPK-targeted therapies, which show remarkable efficacy during the first months of treatment (4, 5). However, the majority of patients treated with a combination of BRAF inhibitor (BRAFi) and MEK inhibitor (MEKi) inevitably relapse within months (6). Genetic mechanisms of resistance cannot singly explain the acquisition of therapy resistance in melanoma and non-genetic heterogeneity actively participates in drug tolerance (7, 8). Extensive studies have been carried out to dissect the non-mutational mechanisms of resistance (9, 10). Genetic and non-genetic mechanisms of resistance are frequently linked and not mutually exclusive (8). Non-genetic resistance is due to the intrinsic melanoma cell phenotypic plasticity, i.e., ability to undergo transcriptional and epigenetic reprogramming in response to environmental challenges or upon therapy (11). These adaptive mechanisms exploit the developmental plasticity of melanoma cells and often result in an undifferentiated state characterized by upregulation of receptor tyrosine kinases (RTK) like PDGFR β or AXL, downregulation of melanocyte differentiation transcription factors MITF and SOX10 (12) and acquisition of mesenchymal and invasive features (9, 10, 13-18).

Tumors are shaped dynamically by reciprocal crosstalk between cancer cells and the ECM through cellular-ECM interactions and stromal matrix remodeling. Recent findings indicated that elevated ECM production and remodeling contribute to adaptive and acquired resistance to BRAFi therapy by conferring a drug-protective niche to melanoma cells (19-22). Moreover, we recently reported that undifferentiated mesenchymal-like BRAFi-resistant cells exhibit myofibroblast/cancer associated fibroblast (CAF)-like features leading to pro-fibrotic ECM reprogramming *in vitro* and *in vivo* (22, 23). Cell autonomous ECM deposition and remodeling abilities adopted by melanoma cells after MAPKi treatment results in crosslinked collagen matrix and tumor stiffening fostering a feedforward loop dependent on the mechanotransducers YAP and MRTFA and leading to therapy resistance (22). Thus, this profibrotic-like response, typical of the early adaptation and acquired resistance to MAPK inhibition, provides a therapeutic escape route through the activation of alternative survival pathways mediated by cell-matrix communications. However, the signaling networks underlying the acquisition of this undifferentiated, mesenchymal-like melanoma cell state and drug resistant behavior remain unclear.

We reasoned that therapeutic approaches aimed at preventing this targeted therapy-induced abnormal pro-fibrotic-like response could represent rationale combination strategies to normalize the fibrous stroma and overcome non-genetic resistance in BRAF^{V600E}-mutant melanomas. We show here that the anti-fibrotic drug Nintedanib (BIBF1120) improves the response of the BRAFi/MEKi targeted therapy in a pre-clinical model of melanoma as well as in BRAF-mutated cell lines by preventing MAPKi-induced lineage dedifferentiation, ECM reprogramming and

mesenchymal traits. We also identified the master regulator associated with the acquisition of this pro-fibrotic and dedifferentiation program, pointing the miR-143/145 cluster as a driver of the phenotype switching to a drug resistant mesenchymal-like cell state.

RESULTS

Nintedanib/BIBF1120 prevents MAPKi-induced pro-fibrotic-like response, enhances targeted therapy efficiency and delays tumor relapse

In order to limit ECM reprogramming and collagen remodeling associated with therapy resistance and relapse in melanoma, we tested the effect of the anti-fibrotic drug Nintedanib (BIBF1120), a triple inhibitor of PDGFR, VEGFR and FGFR used to treat idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in combination with BRAFi/MEKi in a syngeneic model of transplanted murine YUMM1.7 Braf-mutant melanoma (24). YUMM1.7 cells were subcutaneously injected and tumors were treated with vehicle, BIBF1120 alone, a combination of BRAFi plus MEKi, or the triple combination (Fig. 1A). BIBF1120 did not display any anti-melanoma effect when administered alone, slightly slowing down tumor growth but not triggering tumor volume decrease. Administration of the BRAFi/MEKi initially reduced tumor growth but after three weeks of treatment, tumor growth resumed and 100% of tumors relapsed. Importantly, combination of MAPK-targeted therapies and BIBF1120 significantly delayed relapse and led to complete remission in 33% of mice (2 out of 6) (Fig. 1B-C and Supplementary Fig. S1A). Overall, the combined treatment significantly improved mice survival (Fig. 1C) without body weight loss or sign of toxicity throughout the study (Fig. 1D). As previously described in melanoma xenograft models (22), an extensive deposition of collagens and increased expression of ECM remodeling and myofibroblast markers were observed in YUMM1.7 tumors treated with the combination BRAFi/MEKi as revealed by picrosirius red staining of collagen fibers and qPCR analysis of typical molecular markers of tumor fibrosis. This response was significantly reduced by the co-administration of BIBF1120 (Fig. 1E-G and Supplementary Fig. S1B). Thus, combination of targeted therapy with the anti-fibrotic drug Nintedanib prevents the appearance of a pro-fibrotic matrix observed upon MAPK-targeted therapy exposure and significantly delays the onset of resistance *in vivo*.

We next examined the impact of Nintedanib on ECM reprogramming and cell phenotype switching in the context of early adaptation and resistance to MAPK targeted therapy in human BRAF^{V600E} mutated melanoma M238P cells. BIBF1120 strongly attenuated targeted drugs-induced ECM/myofibroblast-related signatures, prevented the undifferentiated AXL^{high} MITF^{low} phenotype switch (Supplementary Fig. S1C) and potentiated the effect of the BRAFi/MEKi cocktail on M238P cell viability (Supplementary Fig. S1D). The efficacy of the described treatment to reduce upregulation of Fibronectin (FN1) and LOXL2 expression was confirmed at protein levels by Western Blot analysis. Of note, a strong activation of AKT induced by the BRAFi/MEKi cocktail was fully inhibited by BIBF1120, suggesting that the anti-fibrotic drug is able to counteract the rewiring of alternative survival pathway observed upon MAPK oncogenic pathway inhibition (Supplementary Fig. S1E) (17).

We finally evaluated the effect of BIBF1120 on the undifferentiated mesenchymal-like resistant M238R cells obtained through chronic exposure of the M238P cells to the BRAFi Vemurafenib (17) and that displayed cross-resistance to MEKi (25). We recently reported that this RTK-driven resistant cell line exhibits low expression of the differentiation factor MITF and high AXL levels and displays a strong myofibroblast-like phenotype with expression of classical ECM and contractile markers such as smooth muscle actin- α (α SMA) and Myosin light chain 2 (MLC2) as well as ECM remodeling activities compared with parental M238P cells (Fig. 1H) (22). BIBF1120 was able to attenuate melanoma undifferentiated state markers and expression of ECM and myofibroblast/CAF-related signature (Fig. 1I), but also significantly decreased cell viability and resistance to BRAFi (Fig. 1J). To address the specific contribution of PDGFR β inhibition in Nintedanib effects, we compared the effect of the selective PDGFR inhibitor CP673451 with Nintedanib in M238R resistant cells. The two inhibitors showed similar efficiency in causing a strong decrease in phospho-PDGFR β and phospho-AKT levels (Supplementary Fig. S1F). However, while selective inhibition of PDGFR attenuated the myofibroblast-like signature typical of resistant cells (Supplementary Fig. S1G) and significantly decreased cell viability (Supplementary Fig. S1H), CP673451 was found less efficient than BIBF1120 in inducing phenotypic switch towards a more differentiated cell state (Supplementary Fig. S1G). Altogether, these findings indicate that an anti-fibrotic therapy is able to revert the undifferentiated-mesenchymal resistant phenotype and potentiate targeted therapy in human melanoma cells.

Suppression of MAPKi-induced resistant pro-fibrotic phenotype by Nintedanib is associated with loss of miR-143/145 cluster expression

Next we investigated the molecular mechanisms associated with the emergence of MAPKi-induced mesenchymal and pro-fibrotic phenotype and its inhibition by Nintedanib/BIBF1120. Because several microRNAs (miRNAs), named FibromiRs, have been shown to play key roles in the initiation and progression of fibrotic processes in various organs (26-29), we performed an expression screening to compare the level of these FibromiRs in BRAF^{V600E} mutant melanoma cells sensitive to MAPK-targeted therapies (M229P, M238P, M249P) compared to their corresponding resistant counterparts (17). The screening identified miR-143-3p and miR-145-5p, localized within the miR-143/145 cluster on chromosome 5 as the best hits with a strong upregulation in AXL^{high} MITF^{low} mesenchymal-like resistant M238R and M229R cells tested compared to parental cells (Fig. 2A, Supplementary Fig. S2A). Similar results were obtained in the mesenchymal resistant UACC62R cells (30). In contrast, acquisition of resistance through secondary NRAS mutation was not associated with increased expression of miR-143-3p and miR-145-5p in the non-mesenchymal AXL^{low} MITF^{high} M249R cells (Fig. 2A, Supplementary Fig. S2A). Upregulation of miR-143/145 cluster expression was also observed in BRAFi/MEKi double resistant (DR) melanoma clones described in (31). Interestingly expression levels of the two miRNAs were more pronounced in acquired DR melanoma cells displaying a mesenchymal-like cell state (Supplementary Fig. S2B). We next examined whether a treatment with BRAFi, MEKi, or a combination of both was able to modulate the expression of the cluster. The two drugs, alone or in combination, significantly increased miR-143-3p and miR-145-5p expression levels in all BRAF^{V600E} mutant melanoma cells tested including patient-derived short-term melanoma cultures (Supplementary Fig. S2C-G). This strong induction was abolished when the BRAFi/MEKi treatment was combined with BIBF1120, both in melanoma cell lines cultured *in vitro* (Fig. 2B) and in the YUMM.1.7 syngeneic model (Fig. 2C) presented in Fig. 1. Overall, the expression of the miR-143/-145 cluster paralleled the phenotypic switch associated with a mesenchymal resistant phenotype.

Given the critical role of RTK upregulation such as PDGFR β and of the pro-fibrotic TGF- β signaling pathway overactivation in mesenchymal resistance (12, 17, 22, 23), we stimulated MAPKi sensitive melanoma cells with PDGF-BB or with TGF- β and analyzed miR-143-3p and miR-145-5p expression. Both TGF- β and PDGF-BB triggered a strong upregulation of miR-143/-145 expression in M238P cells (Fig. 2D). Conversely, treatment of mesenchymal BRAFi-resistant M238R cells with

BIBF1120 but also with the TGF- β receptor inhibitor SB431542, the pan-AKT inhibitor GSK690693 or the PDGFR inhibitor CP673451 significantly decreased the expression of the two mature miRNAs (Fig. 2E, Supplementary Fig. S2H), indicating that both PDGF and TGF- β pathways control the expression of the miR-143/-145 cluster in melanoma cells.

Finally, we investigated the expression of these miRNAs in several Patient-Derived Xenograft (PDX) samples that acquired resistance to BRAFi/MEKi combo-therapy and exhibited distinct phenotypic and molecular profiles. (Fig. 2F) (32). Upregulation of miR143/-145 cluster between therapy naïve and resistant cells was observed in two different PDX samples, MEL015 and MEL003, with a predominant invasive/undifferentiated transcriptome profile (Fig. 2F-G) (32). The MEL015 resistant model also presented elevated expression of

ECM remodeling, myofibroblast and pro-fibrotic markers such as *COL1A1*, *LOXL2*, *CYR61*, *THBS1* and *MYL9*. In contrast, we did not observe an upregulation of the cluster in drug resistant lesions from the two additional PDX models, MEL006 and MEL047, in which the mesenchymal-like signature is not overrepresented (Fig. 2F-G). These data indicate that upregulation of the pro-fibrotic miR-143/-145 cluster is also observed in PDX MAPKi resistant melanomas associated with an invasive/undifferentiated transcriptome profile.

miR-143/-145 cluster promotes melanoma cell dedifferentiation towards a pro-fibrotic mesenchymal-like state and resistance to MAPK therapeutics.

To confirm a potential link between the miR-143/-145 cluster and ECM reprogramming, we first used a gain of function approach consisting in the transient overexpression of miR-143-3p or miR-145-5p in various therapy-naïve BRAF-mutant melanoma cells (Supplementary Fig. S3A). The results showed increased expression of transcripts related to ECM structure and remodeling as well as myofibroblast/CAF markers in cells overexpressing either miRNA compared to miR-neg control cells (Fig. 3A). Conversely, we next tested whether miR-143-3p or miR-145-5p inhibition can reverse the phenotypic profibrotic response induced by oncogenic BRAF inhibition in M238P melanoma cells. BRAFi treatment was combined with Locked nucleic acid (LNA)-modified antisense oligonucleotides (ASOs) designed against miR-143 (LNA-143), miR-145 (LNA-145) or a control LNA ASO (LNA-Ctrl). RT-qPCR analysis showed that the BRAFi-induced ECM- and myofibroblast/CAF-related gene signature was significantly inhibited by LNA-143 and LNA-145 ASOs (Fig. 3B). These results were confirmed at protein level by Western Blot analysis of cell lysates and conditioned media of ECM proteins and cross-linking enzymes as well as myofibroblast/CAF markers using same gain- or loss-of-function approaches (Fig. 3C-D and Supplementary Fig. S3B).

We next investigated whether the cluster contributed to the acquisition of the slow cycling, undifferentiated and invasive cell state. Melanoma cells experienced reduced cell proliferation after ectopic expression of miR-143-3p or miR-145-5p as visualized by Western Blot analysis of cell cycle markers (Supplementary Fig. S4A) and by analysis of cell confluence by live-cell imaging (Fig. 3E and Supplementary Fig. S4B) with an accumulation of cells in the G0/G1 phase and a decreased percentage of cells in S phase (Supplementary Fig. S4C). Acquisition of the slow cycling cell state was not linked to cell death, as confirmed by annexin V/DAPI staining (Supplementary Fig. S4D). Inhibition of proliferation was also accompanied by enhancement of cell migratory abilities, as shown using Boyden chamber assays (Fig. 3F and Supplementary Fig. 4E) as well as by the acquisition of a less differentiated phenotype, with decreased levels of MITF and SOX10, and increased levels of AXL, PDGFR β , EGFR, NGFR and SOX9 (Fig. 3G and Supplementary Fig. S4F). Lentivirus-mediated stable overexpression of the two miRNAs in two distinct melanoma cell lines reproduced increased ECM protein production, inhibition of cell proliferation and transition to an undifferentiated/invasive phenotype (Supplementary Fig. S5A-E) observed upon transient transfection. Acquisition of this features was also linked to a decreased intrinsic sensitivity to BRAFi/MEKi treatment, as measured by crystal violet survival assays performed on melanoma cells stably overexpressing miR-143/-145 cluster compared to control cells (Supplementary Fig. S5F). Conversely, targeting the two miRNAs by ASOs in combination with BRAFi

improved the efficacy of the targeted drug (Fig. 3H, Supplementary Fig. S6A-B), demonstrating that miR-143/-145 cluster upregulation in response to BRAF^{V600E} pathway inhibition represents a pivotal adaptive resistance mechanism to MAPK therapeutics. Of note, inhibition of miR-145-5p alone and combined inhibition of the two miRNAs also significantly decreased the viability of BRAFi resistant melanoma cells M238R (Supplementary Fig. S6C-D).

Identification of miR-143-3p / miR-145-5p targets functionally associated with the undifferentiated mesenchymal-like phenotype in melanoma cells

To identify miR-143-3p and miR-145-5p targets associated with the resistant mesenchymal phenotype, we first combined *in silico* target prediction tools and experimental transcriptomic approaches using the miRonTop web tool (33) in M238R or M238P cells following transient transfection of mimics (Fig. 4A-B) or stable lentivirus transduction. Functional annotation of the gene expression profiles associated with miRNA overexpression showed a strong overlap in pathways associated with cell migration and invasion, cell cycle as well as cytoskeleton organization (Supplementary Table 1). The predicted targets for each of the mature miRNAs were significantly overrepresented among the downregulated genes in response to the corresponding mimics transfection (Fig. 4B). A first set of target candidates were identified by crossing these predicted targets and the genes shown experimentally to be downregulated in resistant M238R cells compared to parental M238P cells (Fig. 4C).

Second, RNAs from cells stably overexpressing the miR-143/-145 cluster were analyzed by RNA-sequencing and processed through Ingenuity Pathway Analysis (IPA) to identify the common regulators (transcription factors, growth factors, cytokines, transmembrane receptors, kinases, and phosphatases) between parental cells overexpressing the cluster and resistant cells (Fig. 4D). These analyses notably highlighted changes related to decreased cell proliferation, increased cell invasion and fibrotic pathways activation. To narrow the best target candidates, we finally compared the best-predicted targets based on the two different gain-of-function approaches (Supplementary Table 2 and 3). This strategy resulted in selecting one target candidate for miR-143-3p, 6 target candidates for miR-145-5p and 2 target candidates for both miR-143-3p and miR-145-5p (Fig. 4E). We started with investigations on the F-actin bundling protein Fascin1 (FSCN1), a key regulator of cytoskeleton dynamics, previously associated with tumor growth, migration, invasion and metastasis (34). Using long-reads Nanopore sequencing data, we confirmed lower levels of FSCN1 transcript in M238R compared with M238P cells while reads corresponding to the putative miR-143/-145 cluster primary transcript could be only detected in M238R cells (Supplementary Fig. S7A). The characterization of hFSCN1 3'UTR sequence revealed the presence of 2 miR-143-3p and 4 miR-145-5p binding sites. Validation of these sites was first performed using a luciferase reporter corresponding to the full 3'UTR FSCN1 harboring WT or a mutated sequence of the miRNA recognition elements (Fig. 4F and Supplementary Fig. S7B). Finally, qPCR and Western Blot analyses confirmed that FSCN1 was downregulated at both mRNA and protein levels upon miR-143-3p and miR-145-5p ectopic expression in various melanoma cells as well as in cells stably overexpressing the cluster (Fig. 4G-H and Supplementary Fig. S7C-D).

FSCN1 is a functional miR-143/-145 target contributing to the phenotypic switch towards the undifferentiated / mesenchymal-like and resistant state

Considering the strong expression of the miR-143/-145 in BRAF^{V600E} mutant mesenchymal-like resistant cells compared to their parental counterparts, we compared FSCN1 expression levels in various pairs of resistant and sensitive melanoma cell lines. Western blot indicated that FSCN1 protein levels were lower in undifferentiated mesenchymal resistant cells compared to parental cells, while on the other hand they were elevated in M249R melanoma cells acquiring genetic resistance compared to parental cells (Supplementary Fig. S8A). We then confirmed the opposite regulation of FSCN1 and miR143/-145 cluster expression upon BRAFi treatment both *in vivo* using xenografted nude mice (tumors analyzed at the endpoint, as described in (22)) and *in vitro* with different human BRAF mutant melanoma cells (Fig. 5A and Supplementary Fig. S8B). Finally, FSCN1 levels were partially restored in M238P cells treated with BRAFi when Vemurafenib was combined with the LNA-miR-143, LNA-miR-145 or a

combination of the two, as visualized by immunofluorescence staining (Fig. 5B), suggesting that FSCN1 downregulation upon BRAFi exposure is due to increased expression of miR-143-3p and miR-145-5p.

To evaluate the influence of FSCN1 downregulation among the various cellular effects mediated by miR-143-3p and miR-145-5p, we then performed a loss-of-function experiment using FSCN1 specific siRNAs in BRAF-mutant parental melanoma cells. Western Blot analysis of cell cycle markers (Fig. 5C and Supplementary Fig. S8C) and cell confluence analysis by live-cell imaging (Supplementary Fig. S8D) showed reduced proliferation after downregulation of FSCN1. This slow-cycling state induced by FSCN1 silencing was accompanied by an enhancement in cell migratory abilities (Fig. 5D and Supplementary Fig. S8E). Moreover, FSCN1 invalidation modulated melanoma cells differentiation state, inducing the switch to a poorly differentiated phenotype characterized by reduced levels of MITF and increased levels of AXL and NGFR (Fig. 5E and Supplementary Fig. S8F).

Using the opposite strategy, we then asked whether ectopic expression of FSCN1 was able to revert the mesenchymal-like phenotype and restore drug sensitivity in BRAFi resistant melanoma cells. Resistant cells transduced for stable FSCN1 overexpression displayed an increased proliferative rate compared to cells transduced with a control lentivirus (Fig. 5F). This effect was linked to diminished migratory abilities (Supplementary Fig. S9A). This phenotypic transition was further confirmed by Western Blot analysis of differentiation markers in various mesenchymal resistant cells, with increased expression of melanocytic markers (MITF, SOX10) and decreased levels of invasive markers (AXL, SOX9) as well as decreased production of ECM proteins and the ECM-remodeling enzyme LOXL2 (Fig. 5G and Supplementary Fig. S9B). Finally, mirroring the effect of miR-143/-145 ASOs, forced expression of FSCN1 in M238R cells decreased viability in the presence of BRAFi (Fig. 5H). Altogether these data underline the central function of the miR-143/145/FSCN1 axis in the acquisition of an undifferentiated, mesenchymal-like cell state associated with therapy resistance.

The miR-143/-145 cluster/FSCN1 axis regulates actin cytoskeleton dynamics and mechanopathways

Acquisition of the mesenchymal-like resistant state implies a massive cytoskeletal rearrangement reflected by morphological changes with cells assuming a flattened and spindle-like shape (17, 22, 30). Based on the key function of FSCN1 in F-actin microfilaments reorganization (35-37), we specifically analyzed the contribution of the miR143/-145 cluster/FSCN1 axis on actin cytoskeleton dynamics. Transient overexpression of miR-143-3p and miR-145-5p triggered morphological changes similar to the ones observed upon BRAFi alone or BRAFi plus MEKi administration, as shown by F-actin staining and increased cell area (Fig. 6A-B and Supplementary Fig. S10A-B). To better understand the crosstalk between ECM remodeling and rearranged actin dynamics, we performed immunofluorescent staining of focal adhesions, multi-protein structures that connect ECM to the actomyosin cytoskeleton. An increased number of focal adhesions revealed by phosphoPaxillin staining characterized melanoma cells expressing miR-143-3p or miR-145-5p or melanoma cells upon BRAF pathway inhibition (Fig. 6C-D and Supplementary Fig. S10CD). Changes in focal adhesion dynamics following miR-143 or miR-145 overexpression were also confirmed by Western Blot analysis of focal adhesion components such as phospho-FAK and phospho-SRC (Supplementary Fig. S10E). In addition, we observed an increase of phosphorylated and total forms of MLC2 and phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) upon cluster overexpression, suggesting the activation of the ROCK/JAK/STAT3 actomyosin contractility pathway by the two miRNAs. We then investigated whether FSCN1 downregulation produced a similar effect on actin dynamics. Indeed, FSCN1 knockdown led to actin cytoskeleton reorganization with a significant cell area increase (Fig. 6E and Supplementary Fig. S10F) as well as an increased number of focal adhesions per cell (Fig. 6F and Supplementary Fig. S10G).

Actomyosin remodeling critically regulates the cellular localization of mechanotransducers such as the Hippo pathway transcriptional co-activator YAP and the serum responsive factor co-activator MRTFA, two factors previously associated with resistance to MAPK-targeted therapies and pro-fibrotic responses (22, 23, 30, 38). Expression of miR-143-3p and miR-145-5p in

therapy-naïve melanoma cells enhanced YAP and MRTFA nuclear localization as shown by immunofluorescent staining (Fig. 7A-C and Supplementary Fig. 11A-B). As previously described (22, 30, 38), similar observations were made upon administration of MAPKi to melanoma cells (Fig. 7B-D, Supplementary Fig. S11C-D). Increased YAP and MRTFA activity upon miR-143/145 overexpression was also confirmed by upregulated expression of several target genes (*CTGF*, *CYR61*, *AMOTL2*, *THBS1*, *AXL*), as shown by RT-qPCR analysis (Fig. 7E and Supplementary Fig. S11E). Again, these changes in cytoskeleton organization were reproduced by FSCN1 knockdown, with nuclear translocation of MRTFA and YAP (Fig. 7F-G and Supplementary Fig. S11F) and increased target gene expression (Fig. 7H). Finally, using the opposite strategy, we tested whether ectopic expression of FSCN1 was able to revert the constitutive activation of mechanical pathways typical of this cell state. Indeed, forced expression of FSCN1 in mesenchymal resistant cells significantly attenuated nuclear localization of YAP and MRTFA as well as their transcriptional activity (Supplementary Fig. S12A-C). Overall, our data highlight the central function of the miR-143/-145/FSCN1 axis in the regulation of actin cytoskeleton dynamics and mechanopathways, leading to the acquisition of an undifferentiated and drug resistant mesenchymal-like cell state.

DISCUSSION

Treatments against advanced melanoma invariably end with therapy resistance and failure. Preventing resistance on therapies targeting the MAPK oncogenic pathway still remains a challenge in successful melanoma clinical management. Our present study reveals that combination of the anti-fibrotic drug Nintedanib with targeted therapy provides therapeutic benefit in pre-clinical models of melanoma. We showed that Nintedanib is able to prevent the acquisition by melanoma cells of an undifferentiated mesenchymal-like phenotype, an aggressive cell state previously shown to be associated with the expression of pro-fibrotic markers, acquisition of myofibroblast/CAF-like activities and enhanced mechanosignaling as well as drug resistance (22, 23). Importantly, we provided evidence that the triplet combination BRAFi/MEKi/Nintedanib is active to normalize the fibrous collagen network, delay the onset of resistance and improve mice survival. We also confirmed the efficacy of this therapeutic combination in human BRAF^{V600E} mutant melanoma cells and described its potential to impair phenotype switching and improve response to targeted therapy (Fig. 8).

Nintedanib (BIBF-1120) is a multiple tyrosine kinase inhibitor, targeting PDGFR (α and β), FGFR-1, -2, -3, and -4 and VEGFR-1, -2, and -3 as well as several intracellular tyrosine kinases such as Src, Lck or Lyn. It has been approved for the treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) following several clinical trials demonstrating clinical efficacy in slowing disease progression (39). Nintedanib was shown to interfere with fundamental processes in lung fibrosis in a variety of *in vitro* assays performed on primary lung fibroblasts from patients with IPF, notably the inhibition of growth factor-induced proliferation/migration and TGF- β -induced myofibroblast activation as well as the downregulation of ECM proteins (40). However, although substantial pre-clinical evidence demonstrates that Nintedanib has anti-fibrotic but also anti-inflammatory and anti-angiogenic activity, the exact contribution of inhibition of specific kinases to the activity of the drug in IPF has not been established and its precise anti-fibrotic mechanism(s) of action is not known. In melanoma, the effects of Nintedanib are likely achieved through the normalization of the fibrotic and drug-protective ECM generated by melanoma cells upon MAPK-targeted therapy exposure. Interestingly, our *in vitro* observations suggest that Nintedanib's effect on melanoma cells cannot be solely explain through PDGFR β inhibition. In addition, a direct effect of Nintedanib on CAF *in vivo* is also possible regarding the described paradoxical activation of CAF upon BRAF inhibition in melanoma (41, 42). In line with this hypothesis, Nintedanib was shown to have inhibitory effects on CAF proliferation and activation in a murine model of melanoma (43).

Herein, we found that combined administration of Nintedanib and MAPK-targeted therapy dampens the increased miR-143/-145 cluster expression triggered by oncogenic BRAF pathway inhibition, suggesting that inhibition of ECM reprogramming in presence of Nintedanib is, at least partially, mediated by preventing upregulation of these two "FibromiRs". Induction of the miR-143/-

145 cluster paralleled the phenotypic switch associated with the undifferentiated mesenchymal-like phenotype and high expression levels of the two miRNAs are correlated with the mesenchymal MAPKi-resistant phenotype in all BRAF^{V600E} mutant human melanoma cell lines known to overexpress RTKs including the PDGFR β . Analysis of PDX models confirmed that expression levels of miR-143-3p and miR-145-5p are associated with a predominant invasive/undifferentiated transcriptomic profile in resistant lesions. Clinically, our findings are supported *in silico* by the observation that the pri-miR-143/-145 precursor, MIR143HG was part of the specific mesenchymal signature of a subset of MAPKi-resistant cells described in Song *et al.* (44). Elevated levels of these miRNAs following BRAFi/MEKi treatment are likely due primarily to the direct inhibition of the MAPK pathway, as oncogenic signals including activation of the MAPK pathway strongly inhibit expression of the cluster in several epithelial cancers (45). In addition, we have shown a positive regulation of the cluster by PDGF or TGF- β signaling, as previously observed in the context of fibrosis and smooth muscle cell differentiation (46, 47). This observation supports the notion that pro-fibrotic signaling pathways typical of the mesenchymal resistance drive expression of the miR-143/-145 cluster in melanoma cells. Besides, the AKT pathway could also upregulate expression levels of the two miRNAs.

Accordingly, previous studies stated that *PTEN* deletion favors the onset of a fibrotic phenotype in lung fibrosis and increased Fibronectin deposition in melanoma (20, 48). The observation that Nintedanib abrogated both AKT activation and miR-143/-145 expression in melanoma cells is in agreement with the importance of this pathway for acquisition and maintenance of drug resistance. Overall, our data indicate that Nintedanib can target both pro-fibrotic and survival pathways, mediated at least in part through PDGFR β /AKT activation and converging to miR-143/-145 cluster expression.

The role of miR-143 and miR-145 in cancer has been widely debated in the last decade (49). The tumor suppressive role traditionally attributed to the cluster (50) has been challenged by recent genetic and cellular expression studies pointing mesenchymal cells as the main source of the cluster (51, 52). In melanoma, we disclosed that miR-143-3p and miR-145-5p promote the acquisition of an invasive and mesenchymal-like phenotype linked to drug adaptation and resistance. The importance of miR-143/145 cluster in the acquisition of this undifferentiated state is further highlighted with a loss-of-function approach showing that miR-143-3p and miR-145-5p inhibitors are able to limit ECM reprogramming and activation of mechanopathways and improve anti-BRAF treatment efficacy. While further work using a combination of ASOs directed against the two mature miRNAs or the primary transcript is necessary to confirm these promising results in a melanoma xenograft model, we propose that the miR-143/-145 cluster may represent a novel attractive therapeutic target to prevent cells from switching to a mesenchymal/invasive state and tumor relapse after targeted therapy.

Our study shows that mechanistically the miR-143/-145 cluster functions in melanoma cells through targeting the cytoskeletal regulator FSCN1, one of the best hits identified by our screening, confirming previous studies indicating that FSCN1 is a direct target of both mature miRNAs (53, 54). FSCN1 has been widely studied in several malignancies for its role in promoting invasion and metastasis. However, a complete characterization of FSCN1 functions in melanoma is still missing and some published studies are controversial (55-57). Consistent with our study, FSCN1 downregulation was shown to inhibit melanoma cell proliferation (56) and to promote invasion (57). Interestingly, FSCN1 expression levels appear to be related to the differentiation stage of melanocytes and transient FSCN1 expression in melanoblast precursors is required for their proliferation and migration, with FSCN1 knockout resulting in hypopigmentation in adult mice (56). Notably, miR-1455p is also considered as a key regulator of the pigmentary process in melanocytes, a role mediated by the downregulation of pigmentation genes and melanosome trafficking components, including FSCN1 (58). These findings are in line with our data showing that FSCN1 downregulation drives phenotypic transition to an undifferentiated cell state associated with very low expression of the master regulator of melanocyte differentiation and function, MITF. FSCN1 downregulation may thus be exploited to generate lineage

plasticity and revert to a poorly differentiated phenotype during drug adaptation of melanoma cells.

The miR-143/145 FSCN1 axis also directly modulates the dynamic crosstalk between the actin cytoskeleton and the ECM through the regulation of focal adhesion dynamics. This process is known to promote melanoma survival through FAK signaling and the ROCK pathway to induce actin-myosin-mediated contractile forces (41, 42, 59). The involvement of the miR-143/145 cluster is also linked to a fine-tuning of mechanotransduction pathways. Enhanced YAP and MRTFA nuclear translocation reinforces the fibrotic-like phenotype promoted by the cluster and probably facilitates resistance acquisition, as previously demonstrated for these mechanotransducers (22, 30, 59). Interestingly, MRTFA has been involved in the transcriptional regulation of miR-143 and miR-145 expression (47, 60, 61), suggesting that this transcriptional state might be further stabilized by a positive feedback loop. Such regulatory loops between miRNAs and transcription factors have been previously described in the establishment and maintenance of melanoma phenotypic states (62, 63).

Despite the ability of FSCN1 downregulation to mimic the main functional effects observed by the ectopic expression of the miR-143/145 cluster, we do not exclude the contribution of other targets in the acquisition of the mesenchymal resistant phenotype promoted by the cluster. FSCN1 knockdown failed to reproduce the global ECM signature reprogramming induced by the miR-143/145 cluster. MiRNA target prediction tools identified a plethora of genes involved in cell cycle regulation, DNA damage response, inflammatory pathways, and actin-SRF regulatory network that need to be fully investigated in this context.

We conclude that our work opens new therapeutic avenues to prevent or delay the onset of targeted therapy resistance in melanoma. Our findings provide a rationale for designing clinical trials with Nintedanib and potentially other anti-fibrotic agents to enhance treatment efficacy in BRAF-mutated melanoma patients. We also bring an original mechanism of action directly linking the inhibition of the BRAF oncogenic pathway with the induction of the miR-143/145 FibromiR cluster promoting the acquisition of a drug resistant, undifferentiated and mesenchymal-like cell state (Fig. 8). Finally, we propose the cluster as a new promising biomarker or druggable target to overcome non-genetic processes of phenotypic plasticity-driven therapeutic resistance.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and reagents:

Isogenic pairs of Vemurafenib-sensitive and resistant melanoma cells (M229, M238, M249) were provided by R. Lo. UACC62 Vemurafenib-sensitive (UACC62P) and resistant melanoma cells (UACC62R) were provided by Neubig's lab. 1205Lu cells were obtained from Rockland. YUMM1.7 mouse melanoma cells were a kind gift from M. Bosenberg (24). A375DR melanoma cells were provided by S. Shen. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 7% FBS (Hyclone) and 1% penicillin/streptomycin. Resistant cells were continuously exposed to 1 μ M of Vemurafenib.

Cell lines were routinely tested for the absence of Mycoplasma by PCR.

Short-term cultures of patient melanoma cells MM034 and MM099 were generated in the laboratory of Pr G. Ghanem. Culture reagents were purchased from Thermo Fisher

Scientific. Vemurafenib (PLX4032), Trametinib (GSK1120212), Cobimetinib, SB431542, GSK690693, Nintedanib (BIBF1120) and Staurosporine were from Selleckem. CP673451 was purchased from Tocris Bioscience. Recombinant human TGF- β 1 was obtained from ImmunoTools. Recombinant human PDGF-BB was purchased from Peprotech.

Information on all reagents used is provided in tables S4, S5 and S6.

In vivo experiments:

Mouse experiments were carried out according to the Institutional Animal Care and the local ethical committee (CIEPAL-Azur agreement NCE/2018-483). 4×10^5 YUMM1.7 cells were injected in both flanks of C57BL/6 mice. Tumors were measured with caliper and treatments were started when the tumors reached a volume of 0.1 cm^3 , after randomization of mice into control and test groups. Vemurafenib (30 mg/kg), Trametinib (0.3 mg/kg), and Nintedanib (50 mg/kg) were administered by oral gavage three times per

week. Control mice were treated with vehicle only. Animals were sacrificed when the tumors reached a volume of 1 cm^3 . After animal sacrifice, tumors were dissected, weighed and snap-frozen in liquid nitrogen for RNA or protein extraction and immunofluorescence analysis (embedded in OCT from Tissue-Tek). Tumors for picrosirius red staining were fixed in formalin. Melanoma cell-derived xenograft experiments performed on 6-week-old female athymic nude nu/nu mice were described in (22). Melanoma patient-derived xenografts models were established by TRACE (PDX platform; KU Leuven) using tissue from melanoma patients undergoing surgery at the University Hospitals KU Leuven. Written informed consent was obtained from all patients and all procedures were approved by the UZ Leuven Medical Ethical Committee (S54185/S57760/S59199) and carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

Statistical analysis:

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism. Unpaired two-tailed Student's T-test or unpaired two-tailed Mann Whitney test was used for statistical comparison between two groups. For comparisons between multiple groups, one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* tests was used. For statistical analysis of cell confluence live imaging, two-way ANOVA was used. For statistical analysis of Kaplan-Meier curves, the log rank (Mantel-Cox) test was used. Results are given as mean \pm SEM or mean \pm SD

Acknowledgments: We thank Roger Lo for M229P/R, M238P/R and M249P/R melanoma cells, Richard Neubig for UACC62 parental and resistant cell lines, Markus Bosenberg for YUMM1.7 cells, Ghanem for short-term cultured melanoma cells and Shensi Shen for the A375DR melanoma cells. Melanoma PDX models are from the PDX facility TRACE (KULeuven, Belgium). We thank Patrick Brest for helpful discussions. We also thank the C3M animal room facility and the C3M imaging facility as well as the UCA GenomiX platform and the PVM Vectorology Platform.

Funding: This work was supported by funds from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Centre National de la Recherche Scientifique" (CNRS), Ligue Contre le Cancer, Fondation ARC, Institut National du Cancer (INCA_12673), ITMO Cancer Aviesan (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Science and Health) within the framework of the Cancer Plan (Plan Cancer 2018 « ARN non-codants en cancérologie: du fondamental au translationnel » n° 18CN045), and the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01 and ANR-PRCI FIBROMIR). The financial contribution of the Conseil Général 06, Canceropôle PACA and Region Provence Alpes Côte d'Azur to the C3M and IPMC is also acknowledged. S.D. was a recipient of doctoral fellowships from the LABEX SIGNALIFE and Fondation pour la Recherche Médicale. I.B. and A.C. were recipients of a doctoral fellowship from La Ligue Contre le Cancer. The PDX work was supported by FWO (#G.0929.16N) and KULeuven (C1 grant) to J-C.M.

Author contributions:

Conception and design of the work: SD, MD, BM, ST-D
Development of methodology: SD, AB, JF, ML, GV, MD, BM, ST-D
Acquisition of data: SD, AB, JF, ML, OM-B, CG, LL, CL, CM, MT, MC, MO, AC, IB, FL, GV, J-CM
Analysis and interpretation of data: SD, AB, JF, MI, FL, MD, BM, ST-D
Writing – original draft: SD, BM, ST-D
Writing – review & editing: SD, CAG, DG, GV, J-CM, MD, BM, ST-D
Administrative, technical or material support: MD, BM, ST-D
Study supervision: MD, BM, ST-D.

Data and materials availability: Expression datasets that support the findings of this study have been deposited in the Gene Expression Omnibus SuperSeries record GSE171883 containing 3 distinct datasets under the following accession codes:

- Dataset 1: GSE171880. Effect of miR-143-3p or miR-145-5p mimics overexpression in M238P cells (microarrays).
- Dataset 2: GSE171881. RNA-Seq analysis of M238P stably expressing miR-143/-145 cluster.
- Dataset 3: GSE171882. Transcriptome analysis of M238R versus M238P using nanopore long reads sequencing.

All other data are available in the main text or in the supplementary materials.

REFERENCES

1. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(6):345-58.
2. Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):349-61.
3. Cancer Genome Atlas N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161(7):1681-96.
4. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507-16.
4. Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, et al. Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2019;381(7):626-36.
5. Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, et al. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol*. 2017;28(7):1631-9.
6. Rambow F, Marine JC, Goding CR. Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev*. 2019;33(19-20):1295-318.
7. Marine JC, Dawson SJ, Dawson MA. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2020.
8. Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, et al. Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell*. 2018;33(5):890-904 e5.
9. Rambow F, Rogiers A, Marin-Bejar O, Aibar S, Femel J, Dewaele M, et al. Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell*. 2018;174(4):843-55 e19.
10. Arozarena I, Wellbrock C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(7):377-91.
11. Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJ, Prahallad A, Robert C, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature*. 2014;508(7494):118-22.
12. 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(6):683-95.
13. Girotti MR, Pedersen M, Sanchez-Laorden B, Viros A, Turajlic S, Niculescu-Duvaz D, et al. Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov*. 2013;3(2):158-67.
14. 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.
15. Fallahi-Sichani M, Becker V, Izar B, Baker GJ, Lin JR, Boswell SA, et al. Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Mol Syst Biol*. 2017;13(1):905.
16. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to BRAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010;468(7326):973-7.
17. Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Ben Jouira R, Garcia E, et al. Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene*. 2019;38(30):5873-89.
18. Titz B, Lomova A, Le A, Hugo W, Kong X, Ten Hoeve J, et al. JUN dependency in distinct early and late BRAF inhibition adaptation states of melanoma. *Cell Discov*. 2016;2:16028.
19. Fedorenko IV, Abel EV, Koomen JM, Fang B, Wood ER, Chen YA, et al. Fibronectin induction abrogates the BRAF inhibitor response of BRAF V600E/PTEN-null melanoma cells. *Oncogene*. 2016;35(10):1225-35.
21. Marusak C, Thakur V, Li Y, Freitas JT, Zmina PM, Thakur VS, et al. Targeting Extracellular Matrix Remodeling Restores BRAF Inhibitor Sensitivity in BRAFi-resistant Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2020;26(22):6039-50.
23. Girard CA, Lecacheur M, Ben Jouira R, Berestjuk I, Diazzi S, Prod'homme V, et al. A feed-forward mechanosignaling loop confers resistance to therapies targeting the MAPK pathway in BRAF-mutant melanoma. *Cancer Res*. 2020.
24. Diazzi S, Tartare-Deckert S, Deckert M. Bad Neighborhood: Fibrotic Stroma as a New Player in Melanoma Resistance to Targeted Therapies. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6).
25. Meeth K, Wang JX, Micevic G, Damsky W, Bosenberg MW. The YUMM lines: a series of congenic mouse melanoma cell lines with defined genetic alterations. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016;29(5):590-7.
25. Atefi M, von Ew E, Attar N, Ng C, Chu C, Guo D, et al. Reversing melanoma cross-resistance to BRAF and MEK inhibitors by co-targeting the AKT/mTOR pathway. *PLoS One*. 2011;6(12):e28973.
26. Pottier N, Cauffiez C, Perrais M, Barbry P, Mari B. FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 2014;35(3):119-26.
27. Savary G, Dewaele E, Diazzi S, Buscot M, Nottet N, Fassy J, et al. The Long Noncoding RNA DNMT3OS Is a Reservoir of FibromiRs with Major Functions in Lung Fibroblast Response to TGF-beta and Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(2):184-98.
28. Hanna J, Hossain GS, Kocerha J. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Front Genet*. 2019;10:478.
29. Ishida M, Selaru FM. miRNA-Based Therapeutic Strategies. *Curr Anesthesiol Rep*. 2013;1(1):63-70.
30. Misek SA, Appleton KM, Dexheimer TS, Lisabeth EM, Lo RS, Larsen SD, et al. Rho-mediated signaling promotes BRAF inhibitor resistance in de-differentiated melanoma cells. *Oncogene*. 2020;39(7):146683.
31. Shen S, Faouzi S, Bastide A, Martineau S, Malka-Mahieu H, Fu Y, et al. An epitranscriptomic mechanism underlies selective mRNA translation remodelling in melanoma persister cells. *Nat Commun*. 2019;10(1):5713.
33. Marin-Bejar O, Rogiers A, Dewaele M, Femel J, Karras P, Pozniak J, et al. Evolutionary predictability of genetic versus nongenetic resistance to anticancer drugs in melanoma. *Cancer Cell*. 2021;39(8):1135-49 e8.
33. Le Brigand K, Robbe-Sermesant K, Mari B, Barbry P. MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics*. 2010;26(24):3131-2.
34. Ma Y, Machesky LM. Fascin1 in carcinomas: Its regulation and prognostic value. *Int J Cancer*. 2015;137(11):2534-44.
35. Hashimoto Y, Kim DJ, Adams JC. The roles of fascins in health and disease. *J Pathol*. 2011;224(3):289-300.
36. Jansen S, Collins A, Yang C, Rebowski G, Svitkina T, Dominguez R. Mechanism of actin filament bundling by fascin. *J Biol Chem*. 2011;286(34):30087-96.
37. Elkhatib N, Neu MB, Zensen C, Schmoller KM, Louvard D, Bausch AR, et al. Fascin plays a role in stress fiber organization and focal adhesion disassembly. *Curr Biol*. 2014;24(13):1492-9.
38. Kim MH, Kim J, Hong H, Lee SH, Lee JK, Jung E, et al. Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. *EMBO J*. 2016;35(5):462-78.
39. Bonella F, Stowasser S, Wollin L. Idiopathic pulmonary fibrosis: current treatment options and critical appraisal of nintedanib. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:6407-19.
40. Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2015;45(5):1434-45.

41. Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, et al. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer Cell*. 2015;27(4):574-88.
42. Cancer Cell. 2015;27(4):574-88.
43. Fedorenko IV, Wargo JA, Flaherty KT, Messina JL, Smalley KSM. BRAF Inhibition Generates a Host-Tumor Niche that Mediates Therapeutic Escape. *J Invest Dermatol*. 2015;135(12):3115-24.
44. Kato R, Haratani K, Hayashi H, Sakai K, Sakai H, Kawakami H, et al. Nintedanib promotes antitumor immunity and shows antitumor activity in combination with PD-1 blockade in mice: potential role of cancer-associated fibroblasts. *Br J Cancer*. 2021;124(5):914-24.
45. Song C, Piva M, Sun L, Hong A, Moriceau G, Kong X, et al. Recurrent Tumor Cell-Intrinsic and Extrinsic Alterations during MAPKi-Induced Melanoma Regression and Early Adaptation. *Cancer Discov*. 2017;7(11):1248-65.
46. 2017;7(11):1248-65.
47. Kent OA, Fox-Talbot K, Halushka MK. RREB1 repressed miR-143/145 modulates KRAS signaling through downregulation of multiple targets. *Oncogene*. 2013;32(20):2576-85.
48. Yang S, Cui H, Xie N, Icyuz M, Banerjee S, Antony VB, et al. miR-145 regulates myofibroblast differentiation and lung fibrosis. *FASEB J*. 2013;27(6):2382-91.
49. Long X, Miano JM. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) utilizes distinct pathways for the transcriptional activation of microRNA 143/145 in human coronary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2011;286(34):30119-29.
50. 2011;286(34):30119-29.
51. Kuwano K. PTEN as a new agent in the fight against fibrogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(1):5-6.
52. Poli V, Secli L, Avalle L. The MicroRNA-143/145 Cluster in Tumors: A Matter of Where and When. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3).
53. Das AV, Pillai RM. Implications of miR cluster 143/145 as universal anti-oncomiRs and their dysregulation during tumorigenesis. *Cancer Cell Int*. 2015;15:92.
54. Kent OA, McCall MN, Cornish TC, Halushka MK. Lessons from miR-143/145: the importance of cell type localization of miRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(12):7528-38.
55. McCall MN, Kim MS, Adil M, Patil AH, Lu Y, Mitchell CJ, et al. Toward the human cellular microRNAome. *Genome Res*. 2017;27(10):1769-81.
56. Liu R, Liao J, Yang M, Sheng J, Yang H, Wang Y, et al. The cluster of miR-143 and miR-145 affects the risk for esophageal squamous cell carcinoma through co-regulating fascin homolog 1. *PLoS One*. 2012;7(3):e33987.
57. 2012;7(3):e33987.
58. Kano M, Seki N, Kikkawa N, Fujimura L, Hoshino I, Akutsu Y, et al. miR-145, miR-133a and miR133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2804-14.
59. Scott KL, Nogueira C, Heffernan TP, van Doorn R, Dhakal S, Hanna JA, et al. Proinvasion metastasis drivers in early-stage melanoma are oncogenes. *Cancer Cell*. 2011;20(1):92-103.
60. Ma Y, Li A, Faller WJ, Libertini S, Fiorito F, Gillespie DA, et al. Fascin 1 is transiently expressed in mouse melanoblasts during development and promotes migration and proliferation. *Development*. 2013;140(10):2203-11.
61. 2013;140(10):2203-11.
62. Dynoodt P, Speeckaert R, De Wever O, Chevolet I, Brochez L, Lambert J, et al. miR-145 overexpression suppresses the migration and invasion of metastatic melanoma cells. *Int J Oncol*. 2013;42(4):1443-51.
63. 2013;42(4):1443-51.
64. Dynoodt P, Mestdagh P, Van Peer G, Vandesompele J, Goossens K, Peelman LJ, et al. Identification of miR-145 as a key regulator of the pigmentary process. *J Invest Dermatol*. 2013;133(1):201-9.
65. Orgaz JL, Crosas-Molist E, Sadok A, Perdrix-Rosell A, Maiques O, Rodriguez-Hernandez I, et al. Myosin II Reactivation and Cytoskeletal Remodeling as a Hallmark and a Vulnerability in Melanoma Therapy Resistance. *Cancer Cell*. 2020;37(1):85-103 e9.
66. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009;460(7256):705-10.
67. Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, et al. MicroRNAs miR-143 and miR145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev*. 2009;23(18):2166-78.
68. 2009;23(18):2166-78.
69. Boyle GM, Woods SL, Bonazzi VF, Stark MS, Hacker E, Aoude LG, et al. Melanoma cell invasiveness is regulated by miR-211 suppression of the BRN2 transcription factor. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24(3):525-37.
70. Li K, Tang M, Tong S, Wang C, Sun Q, Lv M, et al. BRAFi induced demethylation of miR-152-5p regulates phenotype switching by targeting TXNIP in cutaneous melanoma. *Apoptosis*. 2020;25(3-4):179-91.

Diazzi et al. Fig. 1
In vivo YUMM.1.7 syngeneic model

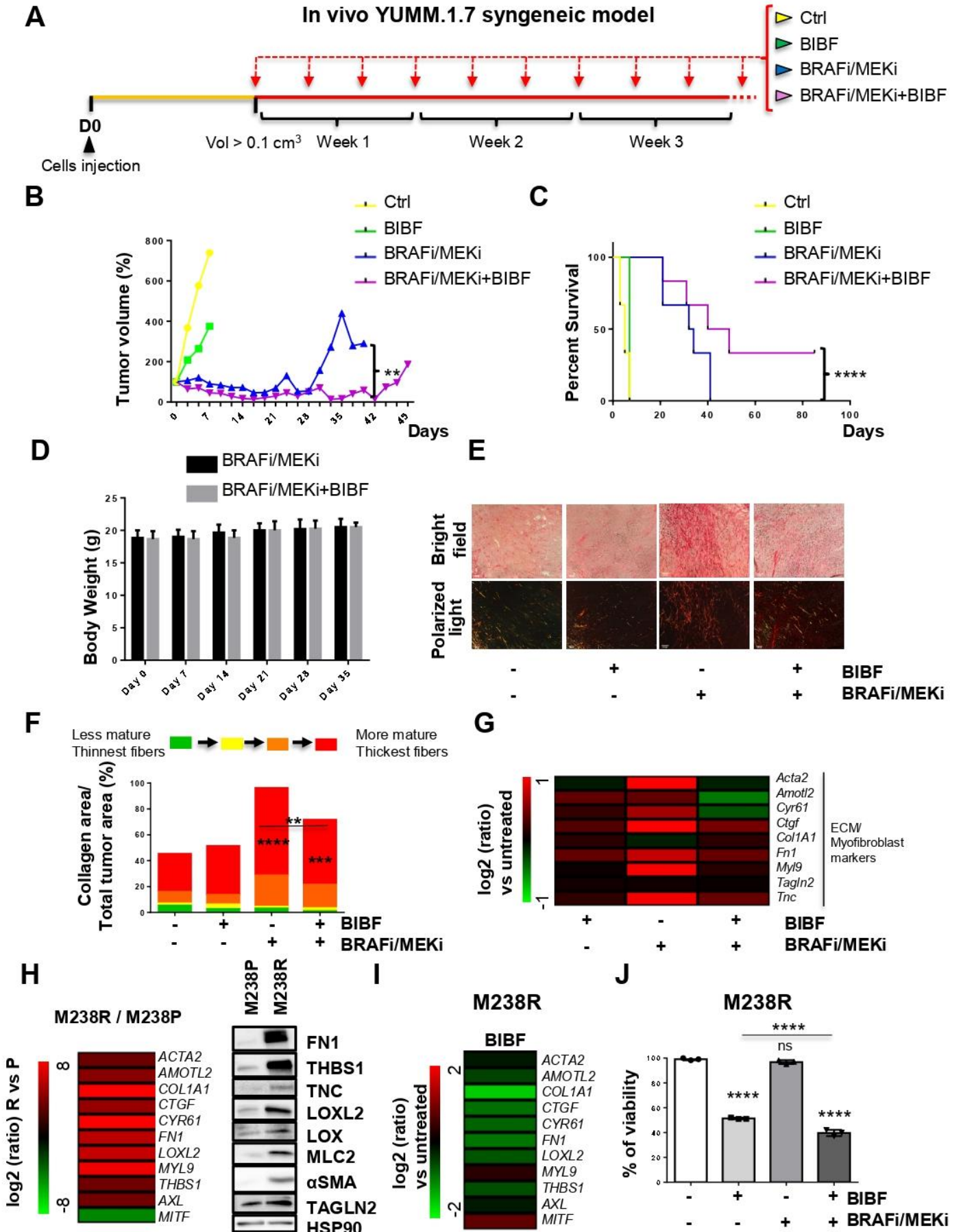


Fig. 1. Nintedanib/BIBF1120 prevents MAPKi-induced ECM remodeling, decreases resistance to targeted therapy and delays tumor relapse.

(A-G) Mouse YUMM1.7 melanoma cells were subcutaneously inoculated into C57BL/6 mice and when tumors reached 100 mm³ mice were treated with vehicle (Ctrl), Nintedanib/BIBF1120 (BIBF), MAPKi (BRAFi, Vemurafenib and MEKi, Trametinib) or BRAFi/MEKi plus BIBF. **(B)** Representative median graphics showing tumor growth following treatment (n = 6). Two-way ANOVA was used for statistical analysis. ** P≤0.01. **(C)** Kaplan-Meier survival curves of mice treated with the indicated therapies (n = 6). Log rank (Mantel-Cox) statistical test was used for MAPKi vs MAPKi/BIBF1120. ****P≤0.0001. **(D)** Mouse body weight was measured at the indicated times. Data shown are mean±SD (n = 6). **(E-F)** Tumor sections were stained with picosirius red and imaged under polarized light. **(E)** Representative image of collagen fibers network in tumors from mice under the different treatments. Scale bar 100 µm. **(F)** Quantification of collagen fibers thickness (n = 6 for control, BIBF and BRAFi/MEKi groups and n = 5 for BRAFi/MEKi + BIBF group). Two-way ANOVA statistical test was used for statistical analysis of mature collagen fibers thickness quantification. **P≤0.01, ***P≤0.001, ****P≤0.0001. Significance was calculated against the control group. Statistical significance of BIBF vs BIBF + BRAFi/MEKi was also calculated. **(G)** Heatmap showing the differential expression of ECM and myofibroblast/CAF genes in mice treated with MAPK-targeted therapies with or without BIBF compared to control mice (log2 ratio, n = 5). **(H)** Heatmap and Western Blot showing the expression of ECM, myofibroblast/CAF and phenotype switch markers in human M238R cells compared to the parental M238P cells. Heatmap represents the mean of expression of 3 independent experiments by RT-qPCR. **(I)** Heatmap showing the expression of ECM, myofibroblast/CAF and phenotype switch markers in human M238R cells treated with BIBF (2 µM, 72 h) or vehicle alone by RT-qPCR (n = 3). **(J)** Crystal violet viability assay of M238R cells treated with BRAFi (Vemurafenib, 3 µM), BIBF (2 µM) or with BRAFi (3 µM) plus BIBF (2 µM) for 72 h. Paired Student t-test was used for statistical analysis. ****P≤0.0001. Significance was calculated against the control group. Statistical significance of BIBF vs BIBF + BRAFi/MEKi was also calculated. Data is represented as mean ± SD from a triplicate representative of 3 independent experiments.

Diazi et al. Fig. 2

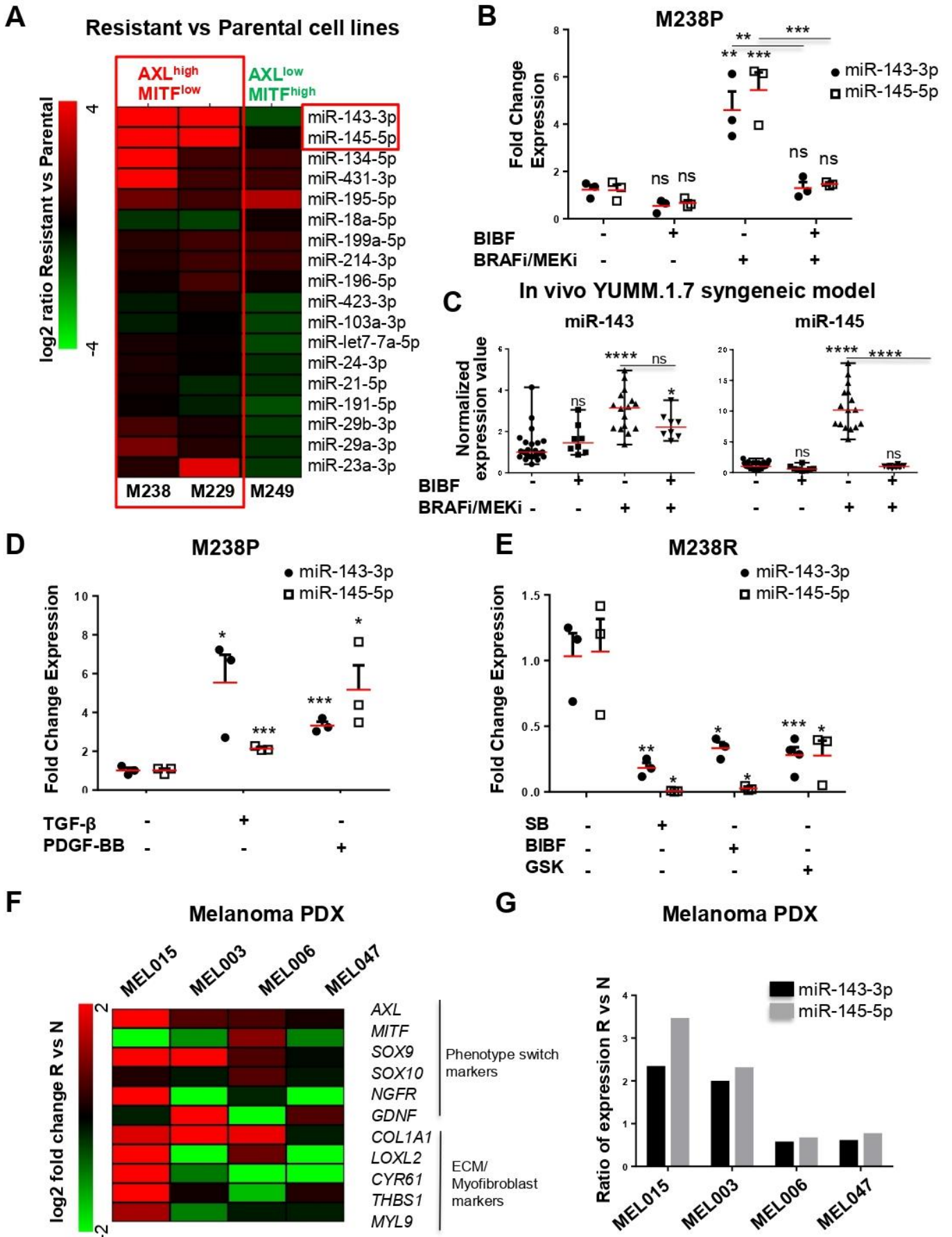


Fig. 2. Expression of miR-143/145 is correlated with the undifferentiated mesenchymal-like MAPKi-resistant phenotype and is negatively regulated by Nintedanib/BIBF1120.

(A) Heatmap showing the differential expression of a selection of miRNAs known as “FibromiRs” in human BRAF^{V600E} mutant melanoma cells sensitive to MAPK-targeted therapies (M229, M238, M249) and the corresponding BRAFi-resistant cells. The type of resistance for each cell line is indicated. Expression was evaluated by RT-qPCR; log₂ (R/P) is indicated for each cell line. **(B)** Relative miRNA expression levels were quantified in M238P cells treated for 72 h with BIBF1120 (BIBF, 2 μM), MAPKi (BRAFi, Vemurafenib and MEKi, Trametinib) (1 μM), or with MAPKi (1 μM) plus BIBF (2 μM) by RT-qPCR and normalized to miR-16-5p. Data is represented as mean ± SEM from a triplicate representative of 3 independent experiments. One-way Anova was used for statistical analysis. **P≤0.01, ***P≤0.001. Significance was calculated against the control group. Statistical significance of BRAFi/MEKi vs BRAFi/MEKi + BIBF was also calculated. **(C)** Expression of miR143-3p and miR-145-5p in control mice and mice treated with the indicated therapies (see legend of Fig.1 for details) was quantified by RT-qPCR. One-way ANOVA was used for statistical analysis. *P≤0.05, ****P≤0.0001. Significance was calculated against the control group. Statistical significance of BRAFi/MEKi vs BRAFi/MEKi + BIBF was also calculated. **(D)** Relative miRNA expression levels were quantified in M238P cells stimulated for 48 h with TGF-β (10 ng/mL) or PDGF-BB (20 ng/mL) by RT-qPCR and normalized to miR-16-5p. Data is represented as mean ± SEM from a triplicate representative of 3 independent experiments. P-values were calculated using Paired Student t-test. *P≤0.05, ***P≤0.001. **(E)** Relative miRNA expression levels were quantified in M238R cells treated for 48 h with the triple kinase inhibitor Nintedanib/BIBF1120 (BIBF, 2 μM), the TGF-β receptor kinase inhibitor SB431542 (SB, 10 μM), and the pan-AKT inhibitor GSK690693 (GSK, 10 μM) by RT-qPCR. Data is represented as mean ± SEM from a triplicate representative of 3 independent experiments. P-values were calculated using Paired Student t-test. *P≤0.05, **P≤0.01, ***P≤0.001. **(F, G)** Phenotype switch/invasive/ECM markers **(F)** and relative miRNAs expression levels **(G)** were quantified in therapy-naïve (N) and resistant (R) PDX samples. The log₂ fold change or the ratio of the fold change R vs N is shown for each couple of samples.

Diazzi et al. Fig. 3

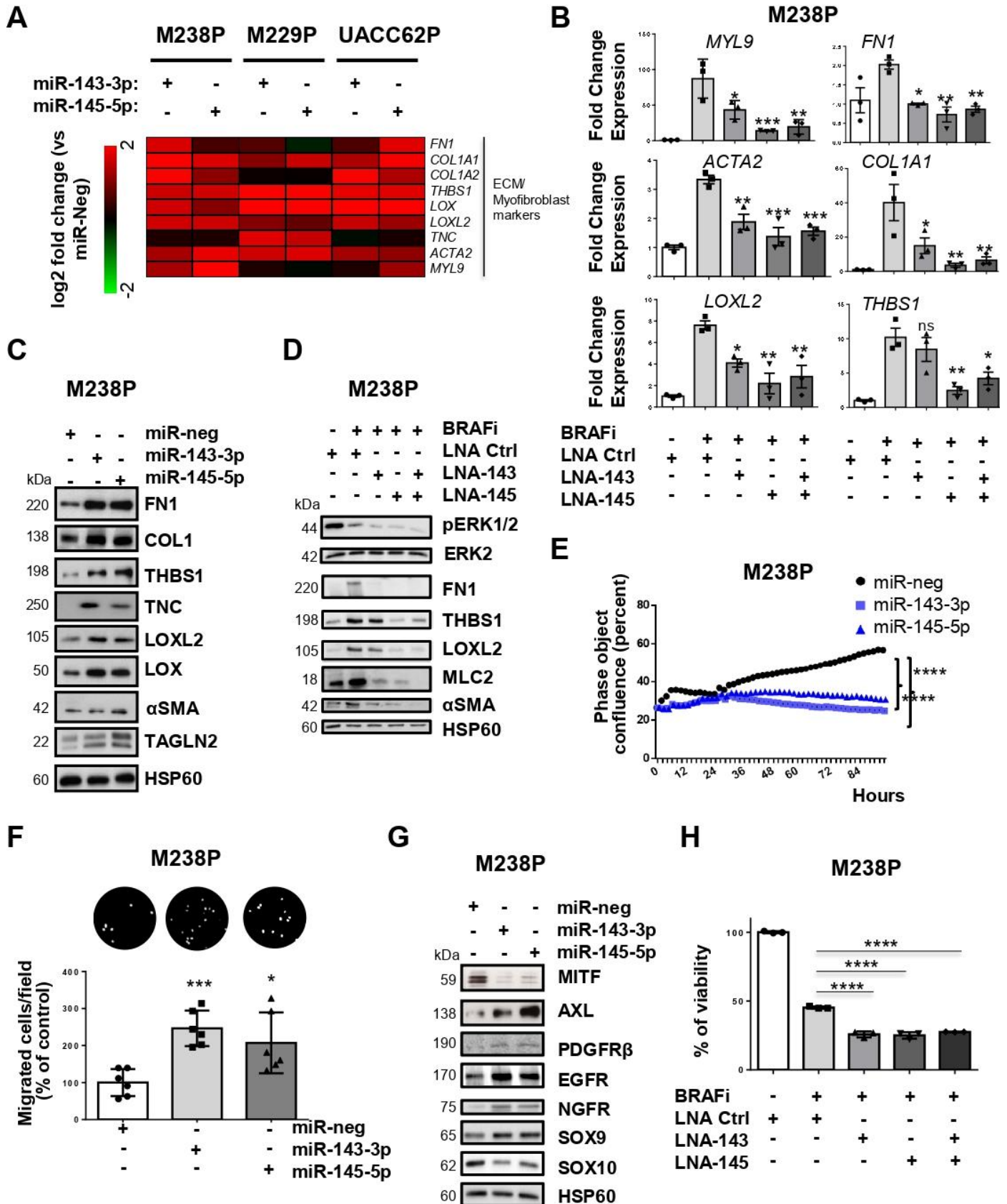


Fig. 3. miR-143/-145 cluster promotes ECM reprogramming, melanoma cell dedifferentiation and drug resistance.

(A) Heatmap showing the differential expression of a selection of ECM-related genes, cytoskeleton and myofibroblast markers in 3 distinct cell lines (M238P, UACC62P, M229P) transfected with the indicated mimics (control (miR-neg), miR-143 or miR-145 mimics, 72 h, 30 nM), assessed by RT-qPCR. (n = 3) **(B)** M238P cells were treated 72 h with BRAFi (Vemurafenib, 3 μ M) in the presence or the absence of LNA-based anti-miR-143 (LNA-143) or anti-miR-145 (LNA-145) (50 nM) or a combination of the two. ECM markers RT-qPCR data is represented as mean \pm SD from a triplicate representative of at least 3 independent experiments. One-way ANOVA was used for statistical analysis. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. **(C)** ImmunoBlot analysis of ECM remodeling markers on total cell lysates from M238P cells transfected as in **(A)**. **(D)** ImmunoBlot analysis of ECM remodeling markers of cells treated with the indicated combination of inhibitors. **(E)** Proliferation curves using time-lapse analysis of cells with the IncuCyte system. Graph shows quantification of cell confluence. Two-way ANOVA analysis was used for statistical analysis. **** $P \leq 0.0001$. **(F)** Migration assay performed in Boyden chambers. Representative images showing migrating cells in the different conditions. The histogram represents the quantitative determination of data obtained using ImageJ software. Paired Student t-test was used for statistical analysis. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$. **(G)** ImmunoBlot analysis of phenotype switch markers on lysates from cells treated as in **(A)**. **(H)** Crystal violet viability assay of M238P cells treated 72 h with the different combinations of inhibitors. Data is represented as mean \pm SD from a triplicate representative of at least 3 independent experiments. One-way ANOVA was used for statistical analysis. **** $P \leq 0.0001$.

Diazzi et al. Fig. 4
Gain-of-function (mimics)

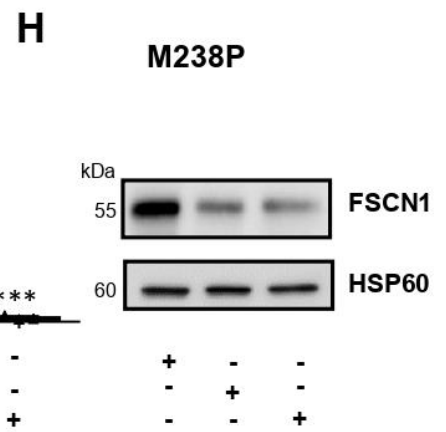
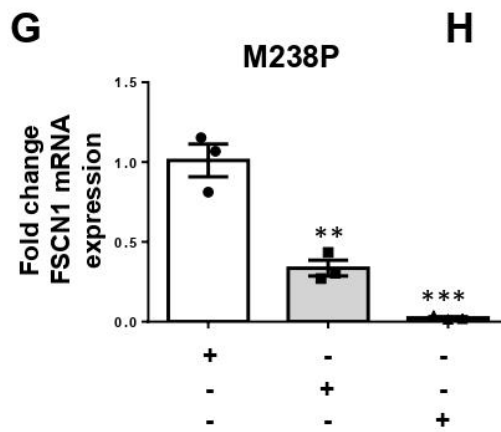
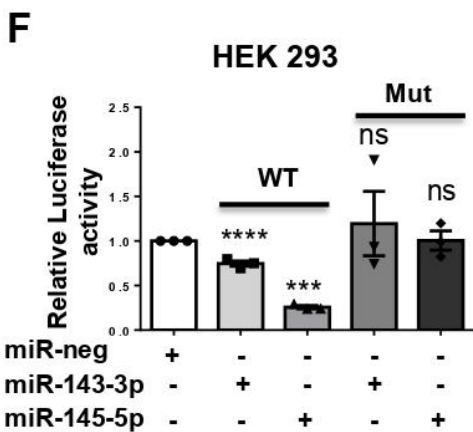
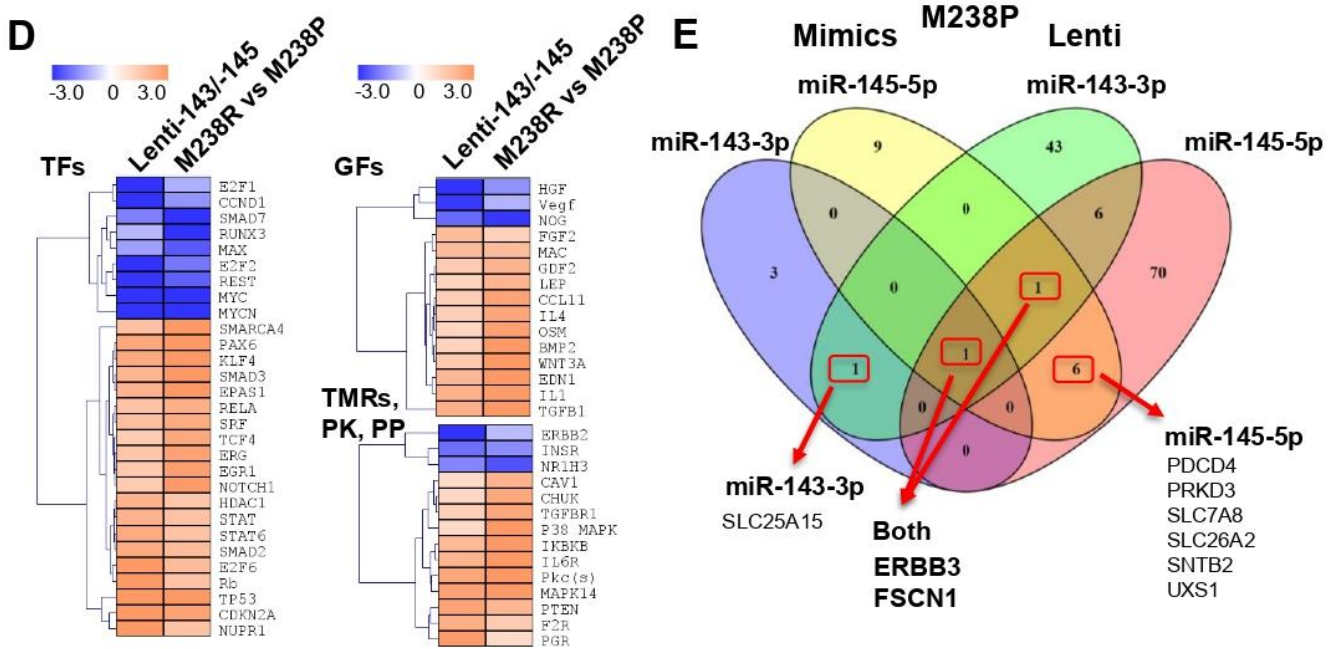
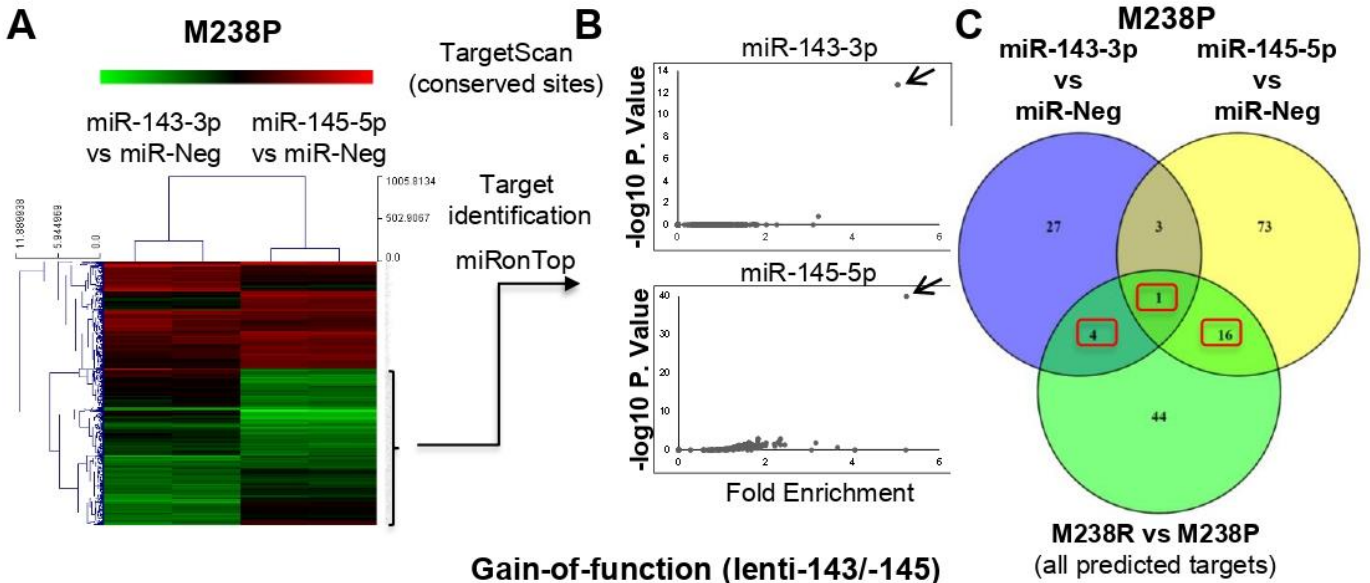


Fig. 4. Identification of gene targets and cellular pathways functionally associated with the miR-143/-145 cluster-mediated undifferentiated/mesenchymal-like melanoma cell phenotype.

(**A-C**) M238P cells were transfected separately with miR-143-3p, miR-145-5p or a negative control (miRneg) mimics and RNA content was analyzed using whole genome microarrays (dataset 1, n = 2). (**A**) Heatmap showing the genes differentially expressed after individual miRNA mimic overexpression. (**B**) Overrepresentation of miRNA predicted targets in the set of downregulated transcripts following miR-143-3p and miR-145-5p mimics transfection using miRonTop webtool. Each arrow indicates the corresponding overexpressed miRNA. (**C**) Venn diagram showing the selection of the best target candidates (red boxes) using miR-143-3p and miR-145-5p mimics transfection as well as comparison of M238R and M238P transcriptomic profiles. (**D-E**) M238P cells were transduced with a miR-143/145 construct and selected for stable expression of the cluster or transduced with a control vector, followed by RNA-seq analysis (dataset 2, n = 2). (**D**) Heatmap highlighting the common predicted upstream regulators altered in cells stably expressing the miR-143/-145 cluster and M238R cells compared to control M238P cells. A subset of common regulators (out of the top 50 scores) corresponding to transcription factors (TFs), cytokines and growth factors (GFs), transmembrane receptors, kinases and phosphatases is shown. Red arrows indicate annotations related to the TGF- β pathway. (**E**) Venn diagram summarizing the comparison of the best-predicted targets following the 2 gain-of-function approaches. Subsets of miR-143-3p and miR-145-5p predicted targets downregulated by both mimics and stable lentivirus expression are shown (red boxes). (**F**) Luciferase assay in HEK cells overexpressing miR-143 or miR-145 transfected with a plasmid harboring the WT or muted sequence of the miR-143 and miR-145 binding sites present in FSCN1 3'UTR. Each bar represents the mean \pm SE of experiments performed at least in triplicate. *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$. P-values were calculated using Paired Student t-test. (**G**) RT-qPCR analysis of FSCN1 expression in parental cells (M238P) transfected with the indicated mimics. Data is represented as mean \pm SE from a triplicate representative of at least 3 independent experiments. Paired Student t-test was used for statistical analysis. ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. (**H**) Western Blot analysis of FSCN1 expression in parental M238P cells transfected with the indicated mimics.

Diazzi et al. Fig. 5
In vivo xenograft 1205Lu

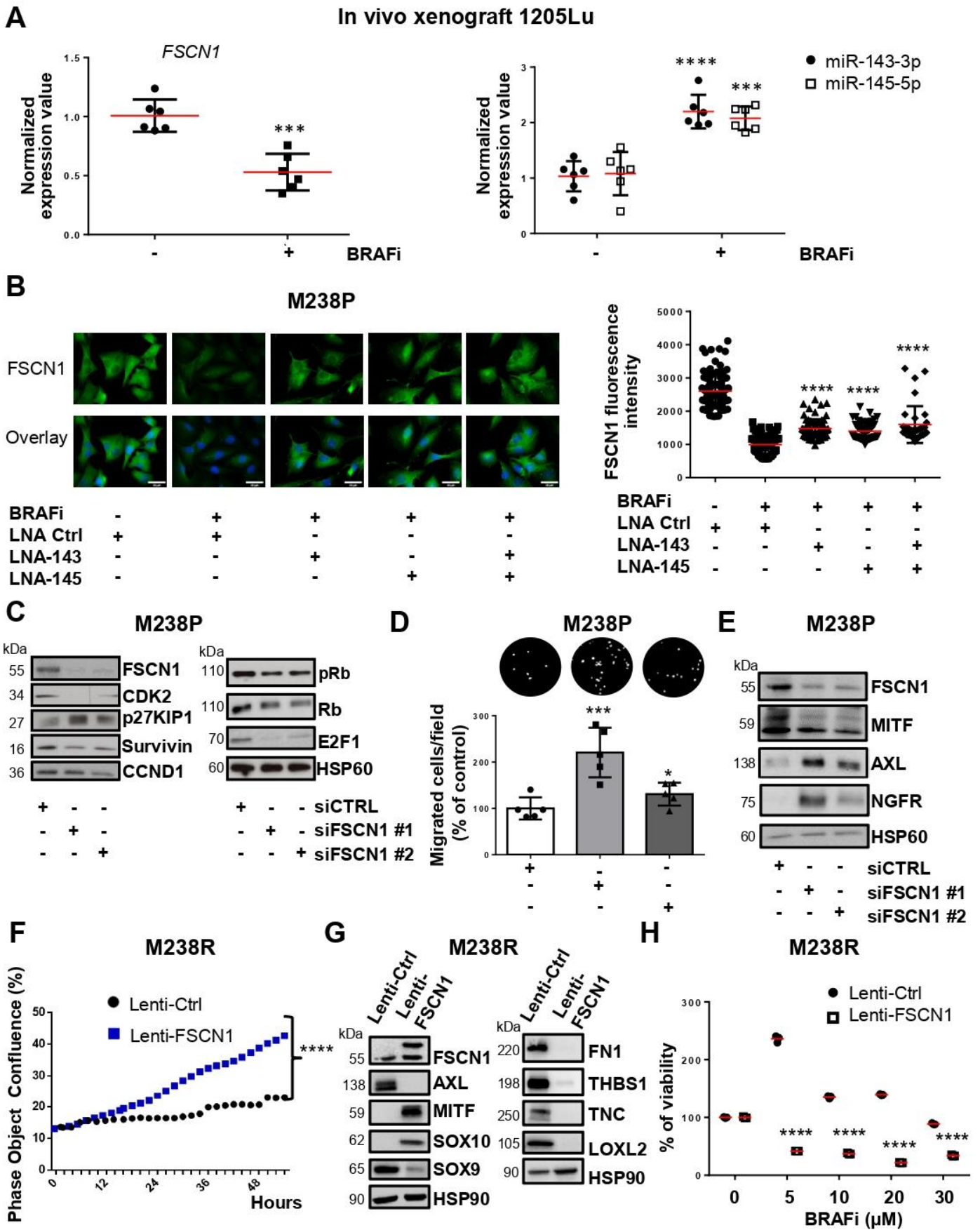


Fig. 5. FSCN1 is a functional miR-143/-145 target contributing to the phenotypic switch towards the undifferentiated/mesenchymal-like state.

(A) qPCR analysis of FSCN1, miR-143 and miR-145 expression in a 1205Lu xenograft nude mice model treated with the BRAFi Vemurafenib compared to control mice (n = 6). Paired Student t-test has been used for statistical analysis. ***P≤0.001, ****P≤0.0001. **(B)** FSCN1 immunofluorescent staining and quantification of fluorescence intensity in M238P cells treated with the different combinations of inhibitors. Mann-Whitney U test has been used for statistical analysis. ****P≤0.0001. Scale bar 40 μm. **(C-E)** M238P cells were transfected with two different sequences of siRNAs vs FSCN1 or with a control siRNA (72 h, 100 nM). **(C)** ImmunoBlot analysis of cell cycle markers on cell lysates from M238P cells cultured for 72 h following transfection with the different siRNAs. **(D)** Migration assay performed in Boyden chambers. Representative images showing migration of M238P cells treated with the indicated siRNAs. The histogram represents the quantitative determination of data obtained using ImageJ software. Paired Student t-test was used for statistical analysis. *P≤0.05, ***P≤0.001 **(E)** ImmunoBlot analysis of phenotype-switch markers on cell lysates from M238P cells transfected with the indicated siRNAs. **(F-H)** BRAFi-resistant M238R cells overexpressing FSCN1 were obtained after transduction with a FSCN1 lentiviral construct. M238R transduced with a Ctrl lentivirus were used as control. **(F)** Effect of FSCN1 overexpression on cell proliferation assessed by time-lapse analysis using the IncuCyte system. Graph shows quantification of cell confluence. Two-way ANOVA analysis was used for statistical analysis. ****P≤0.0001. **(G)** ImmunoBlot analysis of FSCN1, phenotype switch markers and ECM remodeling markers on cell lysates from control and FSCN1 overexpressing cells. **(H)** Crystal violet viability assay of M238R cells stably overexpressing FSCN1 during 6 days with the indicated doses of the BRAFi Vemurafenib. Paired Student t-test was used for statistical analysis. Data is represented as mean ± SD from a triplicate representative of at least 3 independent experiments. ****P≤0.0001.

Diazzi et al. Fig. 6

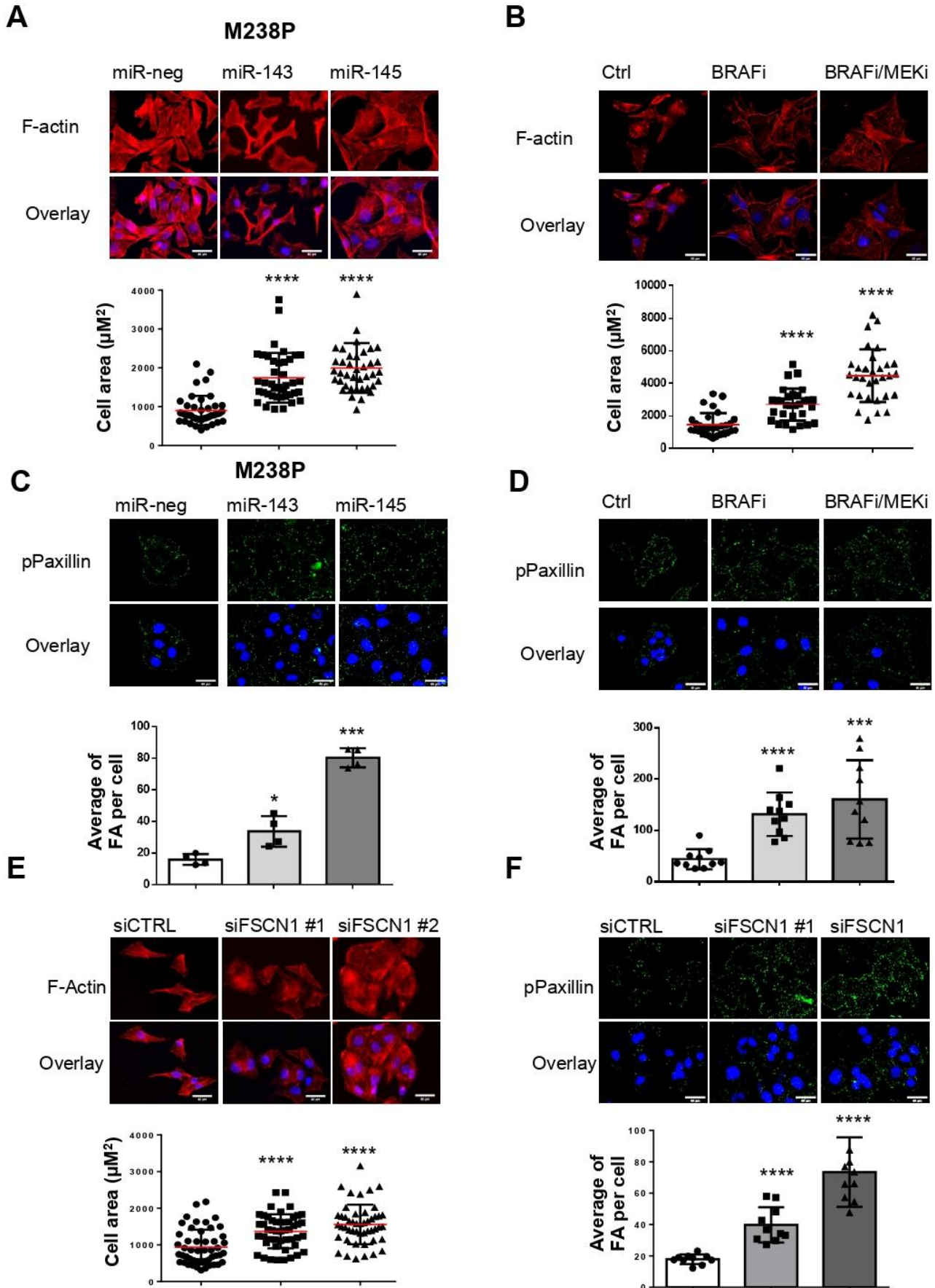


Fig. 6. Regulation of actin cytoskeleton dynamics and focal adhesions by miR-143/-145 cluster /FSCN1 axis.

(A-C) M238P cells were transfected with miR-143-3p, miR-145-5p or a control mimic (miR-neg) (72 h, 30 nM). **(B-D)** M238P cells were treated 72 h with BRAFi (Vemurafenib, 3 μ M) or a combination of BRAFi (Vemurafenib, 0.5 μ M) and MEKi (Trametinib, 1 μ M). **(A-B)** Images and quantification of cell area in cells stained for F-actin (red) and nuclei (blue). Data is represented as scatter plot with mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. **** $P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m. **(C-D)** Images and quantification of focal adhesions number in cells stained for pPaxillin (green) and nuclei (blue). Focal adhesions (FA) number is represented as mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Each point represents the average number of focal adhesions per cell calculated for each field. Paired Student t-test has been used for statistical analysis. * $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m. **(E-F)** M238P cells were transfected with two different sequences of siRNAs vs FSCN1 or with a control siRNA (72 h, 100 nM). **(E)** Images and quantification of cell area in cells stained for F-actin (red) and nuclei (blue). Data is represented as scatter plot with mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. **** $P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m. **(F)** Images and quantification of focal adhesions (FA) number in cells stained for pPaxillin (green) and nuclei (blue). Focal adhesions number is represented as mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Each point represents the average number of focal adhesions per cell calculated for each field. Paired Student t-test has been used for statistical analysis. **** $P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m.

Diazzi et al. Fig. 7

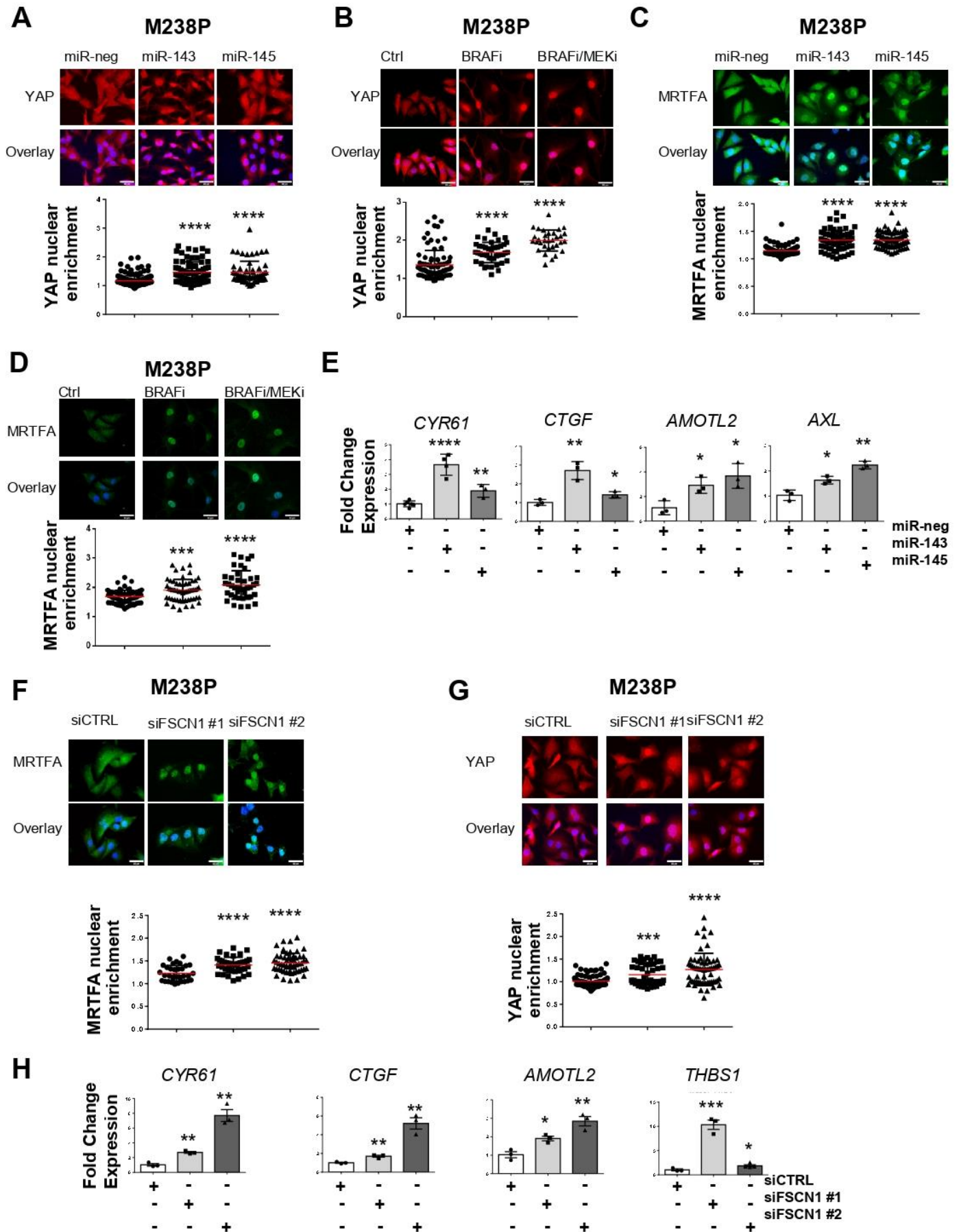


Fig. 7. Regulation of mechanosensitive transcriptional coactivators YAP and MRTF by the miR-143/-145 cluster / FSCN1 axis.

(A-C-E) M238P cells were transfected with miR-143-3p, miR-145-5p or a control mimic (miR-neg) (72 h, 30 nM). Effect of miR-143-3p or miR-145-5p overexpression on YAP **(A)** and MRTFA **(C)** nuclear translocation by immunofluorescence. Data are represented as scatter plot with mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. **** $P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μm . **(B-D)** M238P cells were treated 72 h with BRAFi (Vemurafenib, 3 μM) or with a combination of BRAFi (Vemurafenib, 0.5 μM) and MEKi (Trametinib, 1 μM). Effect of BRAFi or BRAFi plus MEKi on YAP **(B)** and MRTFA **(D)** nuclear translocation by immunofluorescence. Data are represented as scatter plot with mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μm . **(E)** Effect of miR-143-3p or miR-145-5p overexpression on the expression of YAP/MRTF target genes assessed by RT-qPCR. Data are normalized to the expression in control cells. Data is represented as mean \pm SD from a triplicate representative of at least 3 independent experiments. Paired Student t-test was used for statistical analysis. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, **** $P \leq 0.0001$. **(F-G-H)** M238P cells were transfected with two different sequences of siRNAs vs FSCN1 or with a control siRNA (72 h, 100 nM). Effect of FSCN1 downregulation on MRTFA **(F)** and YAP1 **(G)** nuclear translocation assessed by immunofluorescence in M238P. Data are represented as scatter plot with mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μm . **(H)** RT-qPCR analysis for the expression of MRTFA/YAP target genes in M238P cells transfected with the indicated siRNAs. Data are normalized to the expression in parental cells. Data is represented as mean \pm SE from a triplicate representative of at least 3 independent experiments. Paired Student t-test has been used for statistical analysis. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Scale bar 40 μm .

Diazi et al. Fig. 8

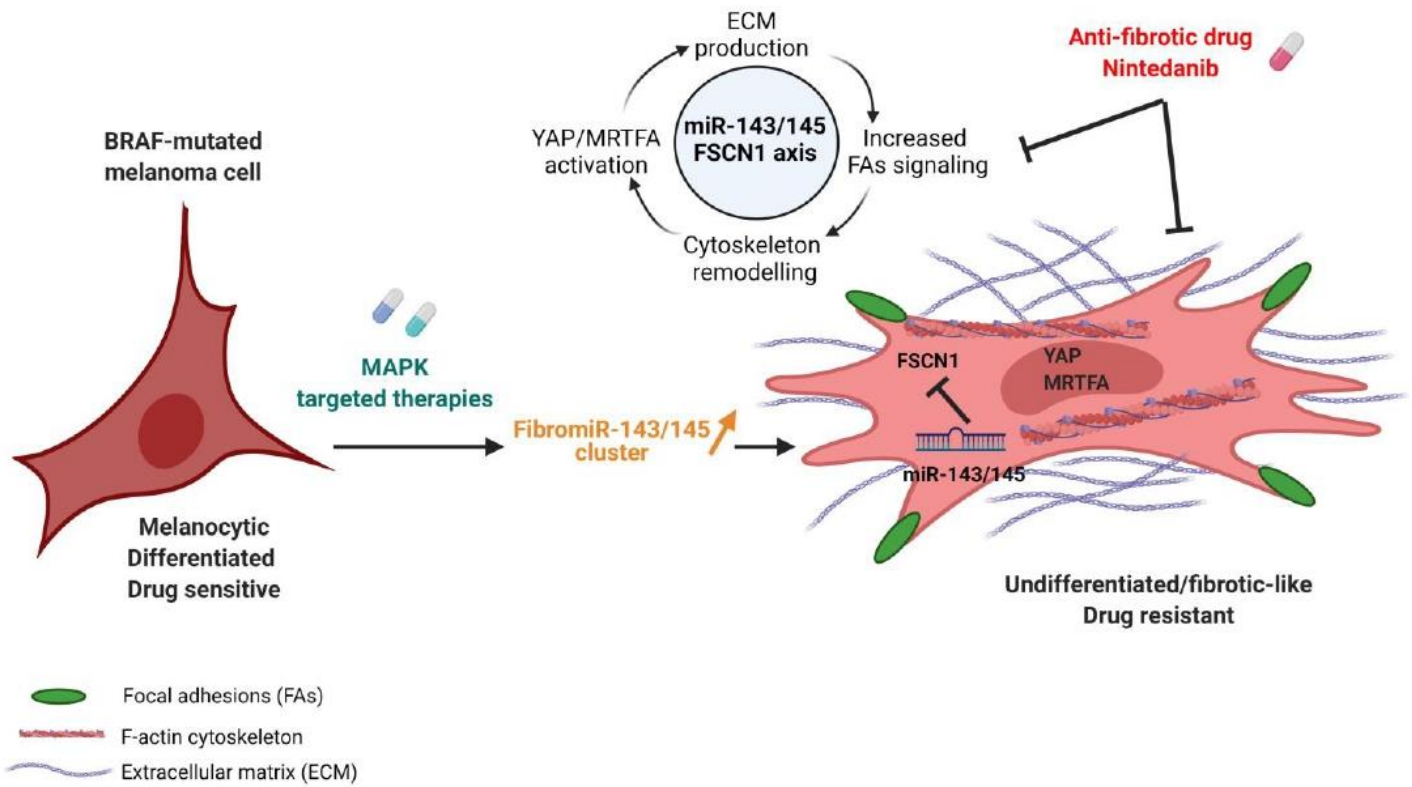


Fig. 8 Proposed model for a role of the pro-fibrotic miR-143/-145 cluster in phenotypic plasticity-driven resistance induced by MAPK-targeted therapies and its potential targeting by Nintedanib. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Annexe IV :

Invasive dedifferentiated melanoma cells inhibit JAK1-STAT3-driven actomyosin contractility of human fibroblastic reticular cells of the lymph node

- Résumé :

Le ganglion lymphatique est le lieu de prédilection pour la formation des premières métastases du mélanome. Les cellules de mélanome sécrètent des facteurs solubles qui atteignent le ganglion drainant la tumeur et entraînent une reprogrammation des cellules du ganglion pour créer une niche pré-métastatique favorable à l'établissement de métastases ganglionnaire. Dans le ganglion lymphatique, les fibroblastes résidents (FRC) sont des myofibroblastes qui contrôlent son architecture et sa dilatation lors des réponses immunitaires. Une modification architecturale peut également avoir lieu dans le cas des cancers, comme le mélanome. En revanche, le lien entre les facteurs sécrétés par les cellules de mélanome et les propriétés contractiles des FRC ne sont pas connus. Cette étude a permis de montrer que l'inhibition des propriétés contractiles des FRC est provoquée par une ou des protéines sécrétées par les cellules de mélanome de type mésenchymateux dédifférenciées mais pas les cellules mélanocytiques. Ces effets sont provoqués par l'inhibition de la voie RhoA/ROCK, JAK1/STAT3 et la voie YAP. Cette étude montre que les facteurs sécrétés par les cellules de mélanome modifient les FRC du ganglion différemment selon qu'ils sont produits par les cellules de type mésenchymateux ou les cellules mélanocytiques. Ces résultats suggèrent que ces facteurs sécrétés pourraient moduler les propriétés biomécaniques du ganglion lymphatique.

En révision à Cancer Research, publié sur BioRxiv : DOI : [10.1101/2021.03.25.436913](https://doi.org/10.1101/2021.03.25.436913)

Invasive dedifferentiated melanoma cells inhibit JAK1-STAT3-driven actomyosin contractility of human fibroblastic reticular cells of the lymph node

Christopher Rovera^{1,2}, Ilona Berestjuk^{1,2}, Margaux Lecacheur^{1,2}, Serena Diazzi^{1,2},
Aude Mallavialle^{1,2}, Jean Albregues³, Cédric Gaggioli³, Christophe Girard^{1,2}, Thierry
Passeron^{4,5}, Marcel Deckert^{1,2}, Sophie Tartare-Deckert^{1,2*}, Virginie Prod'homme^{1,2*}

¹Université Côte d'Azur, Inserm, C3M, Nice, France

²Team 11, Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer 2016, Nice, France

³Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, IRCAN, Nice, France

⁴Université Côte d'Azur, Inserm, C3M, Team 12, Nice, France

⁵Université Côte d'Azur, Department of Dermatology, CHU Nice, Nice, France

*Co-last authors

Running title: Invasive melanomas modulate LN fibroblast contractility

Keywords: fibroblastic reticular cells, contractility, lymph nodes, melanoma, phenotype plasticity

Corresponding authors:

Virginie Prod'homme, Inserm UMR1065/C3M, 151 Route de Ginestière BP2 3194,
F-06204 Nice cedex 3 France. Phone: 33 489 064313; email: prodhomme@unice.fr
Sophie Tartare-Deckert, Inserm UMR1065/C3M, 151 Route de Ginestière BP2 3194,
F-06204 Nice cedex 3 France. Phone: 33 489 064310; email: tartare@unice.fr

ABSTRACT

Fibroblastic reticular cells (FRC) are immunologically specialized fibroblasts controlling the size and microarchitecture of the lymph node (LN), partly through their contractile properties. Swelling is a hallmark of tumor-draining LN in lymphophilic cancers such as cutaneous melanoma, a very aggressive and heterogeneous tumor with high risk of early metastasis. Melanoma cells can dynamically switch between melanocytic proliferative and dedifferentiated mesenchymal-like invasive phenotypes, which are characterized by distinct transcriptional signatures. Melanoma secreted cues, such as extracellular vesicles, growth factors or proinflammatory cytokines, promote LN stroma remodeling and metastatic spreading. But how FRC integrate these pro-metastatic signals and modulate their contractile functions remains poorly characterized. Here, we show that factors secreted by dedifferentiated melanoma cells, but not by melanocytic cells, strongly inhibit FRC actomyosin-dependent contractile forces by decreasing the activity of the RHOA-ROCK pathway and the mechano-responsive transcriptional co-activator YAP, leading to a decrease in F-actin stress fibers and cell elongation. Transcriptional profiling and biochemical analyses indicate that FRC actomyosin cytoskeleton relaxation is driven by inhibition of JAK1 and its downstream transcription factor STAT3 and is associated with increased FRC proliferation and activation. Interestingly, dedifferentiated melanoma cells reduce FRC contractility *in vitro* independently of extracellular vesicle secretion. These data show that FRC are specifically modulated by proteins secreted by invasive dedifferentiated melanoma cells and suggest that melanoma-derived cues could modulate the biomechanical properties of distant LN before metastatic invasion. They also highlight that JAK1/STAT3 and YAP signaling pathways contribute to the maintenance of the spontaneous contractility of resting human FRC.

INTRODUCTION

Melanoma is a very aggressive skin cancer due to its high propensity to metastasis and pronounced intratumor heterogeneity. Four genomic subtypes of cutaneous melanoma have been defined based on the mutational pattern in BRAF, RAS, NF1, or none of these (1). During metastatic progression, melanoma cells are highly plastic and dynamically switch between proliferative and invasive phenotypes associated with distinct differentiation states ranging from melanocytic to dedifferentiated (2-5). The proliferative melanocytic state is characterized by high expression of the melanocyte lineage-specific Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) and low expression of the tyrosine kinase receptor AXL, whereas the invasive dedifferentiated state shows low expression of MITF and high expression of AXL. Dedifferentiated melanoma cells display a mesenchymal-like phenotype associated with drug resistance (6-8). Whether the melanocytic and dedifferentiated melanoma cell populations differ in their ability to communicate with the metastatic stromal host niche remains poorly understood. Cutaneous melanoma is a cancer with an inherent potential for lymph node (LN) colonization, an event contributing to systemic metastasis (9-11). Melanoma cells secrete extracellular vesicles (12,13) and soluble factors (14) migrating to the premetastatic LN and conditioning immune cells (15), lymphatic endothelial cells (14,16) and fibroblastic reticular cells (FRC) (17). This reprogramming of the LN microenvironment creates a favorable niche that supports metastatic development.

FRC are immunospecialized myofibroblasts of lymphoid organs characterized as CD31⁺Podoplanin⁺ (PDPN) mesenchymal cells. They form a network in close contact with T cells and dendritic cells (DCs) in the LN paracortical area and regulate immune cell recruitment, survival and activation (18). With a notable spontaneous contractibility (19-21) and the secretion and remodeling of a dense reticular network of conduits (18,21), FRC control the LN elasticity and microarchitecture. PDPN was shown to drive the actomyosin contractility of FRC through its binding to proteins of the ezrin, radixin and moesin (ERM) family, leading to RHOA activation (19,20,22,23). During an immune response, migratory DCs expressing high levels of C-type lectin-like receptor 2 (CLEC2) are recruited to the LN. CLEC2 binding to PDPN on FRC dismantles the PDPN-ERM interaction, inhibiting actomyosin contractility and resulting in FRC stretching allowing rapid LN expansion (19,20).

In other tissues, like the skin, quiescent fibroblasts are not spontaneously contractile but can be converted into contractile myofibroblasts by factors secreted during wound healing or tumor progression, such as TGF- β or IL-6 family cytokines (24). Factors secreted by tumor cells transform fibroblasts in the tumor vicinity into cancer associated fibroblasts (CAF) (25). CAF are characterized by a contractile phenotype and the high expression of markers like α -

SMA, ACTA2 gene), platelet derived growth factor receptor- α (PDGFR- α) and PDGFR- β , fibroblast activation protein α (FAP), fibroblast-specific protein-1 (FSP1, S100A4 gene), fibronectin (FN) and a FN isoform containing the EDA domain (EDA-FN), vimentin (VIM) or secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) (25). In CAF, actomyosin contractility is driven by RHO and RHO-kinase (ROCK) signaling, leading to an increased phosphorylation of the myosin light-chain 2 (MLC2) (26), and by the activation of the mechano-responsive yes1 associated transcriptional regulator (YAP) (27,28). Cytokines from the IL-6 family (IL-6, LIF, OSM) have been shown to induce RHO-ROCK-dependent CAF contractility through the GP130 (IL6ST)-JAK1-STAT3 pathway (29,30). TGF- β increases actomyosin contractility in fibroblasts by LIF expression, which subsequently epigenetically activates JAK-STAT signaling (31). Actomyosin contraction in CAF is associated with cell shape remodeling, increased F-actin stress fibers and drives force-mediated matrix remodeling (26,27).

Malignant LN colonization is preceded by pre-metastatic LN swelling (16,17) but it remains incompletely understood whether (and how) tumor-derived cues alter FRC specific contractile properties during pre-metastatic LN reprogramming. In this study, we characterized the modulation of the actomyosin contractility of isolated human FRC treated with factors secreted by melanocytic or dedifferentiated melanoma cells and investigated the underlying signaling pathways and the nature of the tumoral factor(s) responsible.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and culture of primary fibroblasts and CAF

Primary human LN Fibroblasts (LN-F) (#2530, ScienCell) were amplified in Fibroblast Medium (#2301, ScienCell) supplemented with 1% Fibroblast Growth Supplement (#2352, ScienCell), 10% FBS (Gibco) and 100 μ g/ml Penicillin/Streptomycin solution (P/S, Gibco). Skin Fibroblasts (Skin-F) were isolated as described previously (32). Melanoma skin or LN clinical specimens ($n = 9$) were obtained with written informed consent from patients, in accordance with the Declaration of Helsinki, and the study was approved by local ethic committees (Nice Hospital Center and University Côte d'Azur). Briefly, the sample was cut into small pieces and digested with collagenase and dispase. Following filtration of large debris, the solution was serially centrifuged and the final pellet was resuspended in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and seeded in a tissue culture dish. After 30 min, CAF have adhered to the dish whilst other cellular types in suspension were discarded. The identity of CAF was validated by the expression of classical markers by qRT-PCR and flow cytometry. Skin-F and CAF were cultured in DMEM with 100 μ g/ml P/S and 10% FBS. All fibroblasts were starved for 5 to 7 days in DMEM 0.5% FBS (control medium) before any experiment and were then

stimulated every two days with control medium or melanoma CM supplemented with 0.5% FBS. They were used until passage 10. In some experiments, cells were treated with 2 ng/ml TGF- β 1 (#11343160, ImmunoTools), 2 ng/ml LIF (#300-05, PeproTech) or 10 μ M Ruxolitinib (#S1378, Selleckchem), Y-27632 (#S1049, Selleckchem) or SB431542 (#S1067, Selleckchem).

Melanoma cell culture

Melanoma cell lines were obtained as previously described (6,33-35). Short-term cultures of patient melanoma cells MM029, MM074 and MM099 were kindly provided by J.-C. Marine and were described elsewhere (8). Patient melanoma cells MNC1 were described previously (35). Cell lines were authenticated for mutations by PCR and transcriptional profile by qRT-PCR and Immunoblotting. Cells were cultured in DMEM supplemented with 7% FBS and P/S. All cells were routinely tested for the absence of mycoplasma by PCR.

Preparation of conditioned media (CM) and mass spectrometry analysis

Melanoma cells were grown until 80% confluent in full growth medium. Then, cells were washed with PBS and cultured for 24h in medium without FBS. The culture supernatant was harvested and filtered (0.45 μ M) to eliminate cellular debris. CM prepared from 501Mel and 1205Lu melanoma cell lines were analyzed by mass spectrometry as described (35). In some experiments, EVs and EV-depleted CM were prepared by differential ultracentrifugation as described (35), CM was incubated for 5 min at 95°C, or treated with 100 μ g/ml Proteinase K (ThermoFisher) overnight to degrade proteins and then with 1 mM PMSF (Sigma) to inactivate the Proteinase K. In other experiments, CM was filtrated through different membranes with MW cut-offs of 100, 50, 30, 10 and 3 kDa (Amicon Ultra-4, Merck Millipore) to fractionate the proteins according to their size. Resulting CM, or EVs, were aliquoted and frozen at -80°C until used.

Collagen matrix remodeling assays

Fibroblasts (7.5×10^3 cells) were embedded in 30 μ l of a collagen I (#354249, Corning) - matrigel (#E1270, Sigma) mix and seeded in glass-bottom 96-well plate (#P96G-1.55-F, MatTek). Once the gel was set (1h at 37°C), it was overlaid with 100 μ l control medium or CM supplemented with 0.5% FBS (with vehicle, cytokines or inhibitors). The matrix was photographed every 1 to 3 days. The respective diameters of the well and matrix were measured using ImageJ software. The percentage of matrix contraction was calculated as followed: $100 - 100 \times (\text{matrix area} / \text{well area})$.

Proliferation assays

Proliferation was measured by a MTS conversion assay using the CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation kit (#G5421, Promega) according to the manufacturer's instructions, or by cell counting.

RNAi studies

The siRNAs targeting STAT3#1 (#HA13744330, Sigma), STAT3#2 (#HA13744332, Sigma), JAK1 (#SASI_Hs01_00174612, Sigma), JAK2 (#145131, ThermoFisher) and YAP (#HSS115942, ThermoFisher) were used with the respective control siRNAs: MISSION siRNA Universal Negative Control#1 (Sigma) and a siRNA against the Luciferase Reporter (sense: CGUACGCGGAUACUUCGATT, antisense: UCGAAGUAUUCGCGUAC GTT) (ThermoFisher). Transfection of siRNA was carried out using Lipofectamine RNAiMAX (#13778150, ThermoFisher) at a final concentration of 50 nM. Cells were assayed at 2 days post transfection.

Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted using NucleoSpin RNA Plus kit (#740984.50, MachereyNagel). Reverse transcription was performed with the High capacity cDNA Reverse Transcription kit (#4368814, Applied Biosystems). Quantitative PCR was performed using the Platinum SYBR Green qPCR Supermix (#11558656, FisherScientific) with the StepOnePlus System (Applied Biosystems). Relative mRNA levels were determined

using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and ACTB, GAPDH, HPRT and PPIA as housekeeping genes.

Microarray experiment

LN-F were cultured for 48h with control medium or 1205Lu CM. RNAs from 4 different experiments (biological quadruplicate) were extracted as described above and analyzed on SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarrays (#G4851B, Agilent Technologies) as previously described (36). Data analyses were performed using R. We used the Bioconductor package array QualityMetrics and custom R scripts for quality control. Additional analyses were done using Bioconductor package Limma. Data were normalized using the quantile method. A linear modeling approach was used to calculate log ratios, moderated t-statistics, and P-values for each comparison of interest. P-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini Hochberg method that controls the false discovery rate.

Analysis of functional enrichment in gene signatures in microarray data

After raw data processing, the 25,000 most expressed genes in LN-F (average mean expression ≥ 6) were analyzed. To identify pathways down-regulated by 1205Lu CM treatment, we selected the genes down-regulated with $\text{LogFC} \leq 0.5$ in 1205Lu-reprogrammed LN-F and submitted these genes to Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). To analyze genes involved in the regulation of the STAT3 pathway, we identified genes common to the "GO negative regulation of receptor signaling pathway via stat3 pathway, and differentially expressed with an absolute $\text{LogFC} \geq 0.4$. Results were presented in heatmaps generated with Prism 8 (Graphpad) or Phantassus (<https://genome.ifmo.ru/phantassus>) softwares.

Immunoblots

Cell lysates were prepared using RIPA buffer (#20-188, Millipore) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (#A32959, ThermoFisher). Proteins were separated by SDS-PAGE and were transferred onto PVDF membranes (GE Healthcare) for immunoblot analysis. Membranes were incubated with primary antibody overnight, washed and then incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody for 1h. The following primary antibodies were used (diluted 1/1,000) : α -SMA(#ab5694, Abcam), CD63 (#NBP2-42225, Biotechne), PDPN (#337001, Biolegend), α -Tubulin (#3873), CD9 (#13174), CD81 (#56039), PDGFR- β (#4564), ERM (#3142), P-ERM (T567/T564/T558) (#3149), P-MLC2 (S19) (#3671), STAT3 (#9139), P-STAT3 (Y705) (#9145), YAP (#4912) (Cell Signaling Technology) and FAP (#sc-100528), FN (#sc-9068), HSP60 (#sc-1722), HSP70 (#sc66048), MLC2 (#sc-15370) Blots were developed with a chemiluminescence system (ECL, #RPN2106, GE Healthcare).

RHOA assays

RHOA activity was measured on LN-F lysates using the RHOA G-LISA Activation Assay kit (#BK124, Cytoskeleton). Data are the mean \pm SEM of arbitrary units of RHOA activity.

Immunofluorescence analysis

LN-F were grown 4 days on coverslips coated with collagen or on synthetic hydrogels of 2.8 kPa or 0.2 kPa stiffness made as described (6). Then, cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in PBS 0.3% Triton for 20 min, blocked in PBS 0.1% Triton, 5% Goat Serum for 1h and stained overnight at 4°C with antibodies targeting YAP (#sc-271134, Santa Cruz Biotechnology) and P-MLC2 (S19) (#3671, Cell Signaling Technology) primary antibodies diluted 1:100 in PBS 0.1% Triton, 2% Goat Serum. Following 1h incubation with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1000, ThermoFisher) and Texas Red- or Alexa Fluor 488-conjugated Phalloidin (1:200, ThermoFisher), nuclei were stained with Hoechst (#H1399, ThermoFisher) and coverslips were mounted in ProLong diamond antifade (#P36961, ThermoFisher). Images were acquired on a wide-field microscope (Leica DM5500B, 40X magnification) or a confocal microscope (Nikon Eclipse Ti, 20X or 40X magnification). Images were analyzed with the ImageJ software to quantify

the cell shape index, the mean fluorescence per cell (Integrated density) and the nuclear/cytosolic ratio of YAP, assessed with the fluorescence intensity of nucleus (delimited by Hoechst staining) and cytosol.

Flow cytometry

Cells were washed in PBS and incubated at 4°C for 30 min in PBS 2% FBS, 2 mM EDTA with CD31-AF488 (#303109), CD35-PE (#333405) and PDPN-APC (#337021) or control isotypes antibodies (Biolegend). Then, cells were washed in PBS and analyzed with BD FACSCANTO II cytometer (BD Biosciences) and the FlowJo software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 8 (GraphPad). Unpaired two-tailed Mann-Whitney tests were used for statistical comparisons between two groups and Kruskal-Wallis tests with Dunn's post-tests or two-way analysis of variance (ANOVA) tests with Sidak's post-tests to compare three or more groups. Histogram plots and curves represent mean \pm SEM and Violin plots represent median \pm quartiles. P values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Data availability

The experimental data from microarray have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database under the series record GSE157355.

RESULTS

LN fibroblasts harbor a CAF-like phenotype associated with spontaneous cell contractility.

To investigate the interactions between melanoma cells and FRC, we employed primary fibroblasts isolated from human LN. Because several mesenchymal subsets coexist in the LN (21,37), we first characterized these primary LN fibroblasts (LN-F) using microarray profiling, qRT-PCR and flow cytometry (Supplementary Fig. S1). We found that genes expressed by LN-F were typical of FRC (PECAM1⁻, PDPN⁺, CR2⁻, MADCAM1⁺), the most abundant LN mesenchymal subset. Flow cytometry analysis further validated the expression of FRC markers (CD31⁻, PDPN⁺, CD35⁺).

FRC exhibit spontaneous contractility (19-21). When embedded in a collagen-based three-dimensional matrix, LN-F isolated from 4 different donors demonstrated basal force-mediated matrix remodeling, driven by the ROCK-actomyosin pathway and inhibited by the ROCK inhibitor Y-27632 (Fig. 1A). LN-F displayed the same high propensity to drive collagen matrix remodeling as primary CAF isolated from skin or LN melanomas (Fig. 1B). However, primary skin fibroblasts (skin-F) were not able to contract the collagen matrix unless activated with TGF- β to a CAF-like phenotype. In contrast, LN-F spontaneous contraction was not modulated by TGF- β . As for LN-F, contractile properties of TGF- β -activated skin-F and CAF were dependent of the ROCK-actomyosin pathway and inhibited by Y-27632. In agreement with the collagen matrix remodeling results, LN-F contractile activity was associated with higher basal levels of F-actin stress fibers and YAP nuclear localization compared to skin-F (Fig. 1C and D). However, in contrast to skin-F, F-actin fibers and YAP nuclear localization were not increased by TGF- β treatment in LN-F. Analysis by qRT-PCR revealed that several CAF markers like ACTA2 (α -SMA), FAP, EDA-FN or SPARC were highly expressed in LN-F compared to skin-F, suggesting that resting LN-F share many properties with CAF (Fig. 1E). Immunoblot analysis also showed TGF- β -independent high expression of FN, PDGFR- β , FAP and α -SMA in resting LN-F, to levels equivalent or higher than TGF- β -activated skin-F (Fig. 1F). This is consistent with the notion that high α -SMA expression is associated with fibroblast contractility (38). Collectively, these results validate the FRC signature of LN-F and unveil that quiescent LN-F display some phenotypic and functional properties of CAF. Our aim was then to investigate whether, and how, melanoma cells modulate fibroblast contractile properties of the LN metastatic niche.

Factors secreted by invasive dedifferentiated melanoma cells with a MITF^{low} AXL^{high} signature inhibit LN-F contractility.

Melanoma cells harbor transcriptional states ranging from melanocytic (MITF^{high} AXL^{low}) to dedifferentiated (MITF^{low} AXL^{high}) (2-5). To compare the ability of these melanoma subpopulations to modulate LN-F contractility, we selected several melanocytic (501Mel, MeWo, SK-MEL-28, WM164) and dedifferentiated (1205Lu, WM793, WM2032, SBcl2) cell lines identified by qRT-PCR analysis of MITF and AXL gene expression (Supplementary Fig. S2A). Then, to model melanoma distant reprogramming of fibroblasts in the pre-metastatic LN, we treated LN-F with conditioned medium (CM) harvested from melanoma cell cultures and containing the factors secreted by melanoma cells. Factors secreted by tumor cells, like TGF- β are known to induce fibroblast actomyosin contraction, as during CAF differentiation (25). Strikingly, we observed that CM secreted by dedifferentiated melanoma cell lines (MITF^{low} AXL^{high}) drastically inhibited LN-F spontaneous contractility, while melanocytic melanoma cell lines (MITF^{high} AXL^{low}) showed no effect (Fig. 2A). Similar results were obtained with short-term patient melanoma cultures as CM prepared from dedifferentiated MNC1, MM029 and MM099 cells inhibited LN-F contractility. In contrast, CM from the melanocytic MM074 cells displayed no statistically inhibitory effect (Fig. 2B and supplementary S2B). Together, our results demonstrate that the ability to modulate LN-F contractility is strongly correlated to the dedifferentiated MITF^{low} signature of invasive melanoma cells (Fig. 2C). Next, we analyzed whether inhibition of contractility requires prolonged LN-F exposure to tumoral factors. After 8 days treatment, LN-F in collagen matrix settings recovered their spontaneous contractility upon 1205Lu CM withdrawal (Fig. 2D). Thus, melanoma cell-induced inhibition of LN-F contraction is a reversible process and requires the presence of factors secreted by dedifferentiated melanoma cell to be maintained.

To get a more comprehensive view of the effect of factors secreted by melanocytic or dedifferentiated melanomas on LN-F reprogramming, we carried out the study with two representative melanoma cell lines displaying the melanocytic MITF^{high} AXL^{low} phenotype (501Mel) or the dedifferentiated MITF^{low} AXL^{high} phenotype (1205Lu). During an immune challenge, FRC activation is associated with proliferation, upregulation of PDPN and other markers of fibroblast activation, and disruption of the RHOA-ROCK-mediated actomyosin cytoskeleton contraction due to CLEC2 interaction with PDPN (19,20,39). Similarly, 1205Lu-derived CM (1205Lu CM) stimulated LN-F proliferation (Fig. 2E) and increased the cell surface expression of PDPN observed by flow cytometry whereas 501Mel CM had no effect (Fig. 2F). qRT-PCR analysis showed that expression of several markers of fibroblast activation like PDPN, FAP, CXCL12, LIF and TNC was also up-regulated by 1205Lu CM while S100A4 (FSP1) and ACTA2 (α -SMA) levels were not affected by treatment with 501Mel or 1205Lu CM (Fig. 2G). Mass spectrometry (MS) analysis also revealed that 1205Lu-activated LN-F secreted more extracellular matrix proteins (TNC, FN) and cytokines (IL-6), validating the functional activation of LN-F (Fig. 2H). These results indicate that the inhibition of FRC contractility induced by dedifferentiated melanoma CM is a functional response of activated LN-F, similar to the FRC behavior observed during immunization. Importantly, our observations suggest that factors secreted by invasive dedifferentiated and proliferative melanocytic melanoma cells do not share the same abilities to reprogram LN-F.

The propensity of fibroblasts to contract a collagen matrix is regulated by forces generated by the actomyosin cytoskeleton (26,27). To learn more about the modulation of LN-F contractility by dedifferentiated melanoma CM, we examined by immunofluorescence the F-actin organization and phosphorylation of the ROCK substrate MLC2 in LN-F treated or not with 501Mel CM or 1205Lu CM. The ROCK inhibitor Y-27632 was used as a control (Fig. 3A and B). We observed similar changes related to inhibition of actomyosin contraction (27) in LN-F treated with Y-27632 or 1205Lu CM, like

decreased MLC2 S19 phosphorylation, less F-actin fibers and the remodeling of the cell morphology from a stellate to a fusiform shape.

In order to identify molecular pathways responsible for inhibition of LN-F contractility by dedifferentiated melanoma CM, we performed microarray-based gene expression profiling on LN-F cultured in control conditions or exposed to 1205Lu CM (Fig. 3C). From the 25,000 most expressed LN-F genes, we selected differentially expressed genes (DEGs) with an absolute LogFC ≥ 0.5 . We identified 1,113 DEGs up-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F and 1,110 DEGs down-regulated, validating LN-F transcriptional reprogramming by the CM from dedifferentiated melanoma cells. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of the 1,110 down-regulated genes validated the inhibition of pathways related to actin cytoskeleton polymerization, RHOA GTPase activity and pointed towards the regulation of YAP and its co-transcription factor TEAD2 in 1205Lu-reprogrammed LN-F (Fig. 3D and Supplementary Fig. S3).

1205Lu CM-mediated suppression of LN-F contractility is associated with impaired YAP activity.

To validate the inhibition of the YAP pathway identified by GSEA (Fig. 3D and 4A), we investigated the effect of melanocytic and dedifferentiated melanoma CMs on YAP nuclear localization and activation. YAP is sensitive to the cell microenvironment stiffness (28). The stiffness in the LN paracortical area was measured to 0.2 kPa by nanoindentation and was similar to the one of collagen matrices used to assess LN-F contractility (data not shown). However, in 2D cell culture conditions YAP activity is reduced in such soft hydrogel (28). Thus, we decided to examine the effect of melanoma cell CMs on stiffer hydrogels (2.8 kPa), allowing the optimal visualization of changes in YAP localization and activity.

In agreement with the inhibition of LN-F contractility induced by dedifferentiated melanoma cues, immunofluorescence analysis revealed that LN-F incubated with CM from the dedifferentiated 1205Lu, WM793 or WM2032 cells displayed an elongated shape, with more cytosolic YAP compared to control LN-F (Fig. 4B-D). On the contrary, CM prepared from melanocytic 501Mel or SK-MEL-28 cells induced no significant change on YAP nuclear localization and cell elongation. Consistently, qRTPCR analysis revealed decreased levels of YAP target genes CYR61, CTGF and SDPR induced by 1205Lu CM (Fig. 4E). We also noticed a decreased expression of genes regulated by the YAP co-transcription factor TEAD2 in LN-F treated with 1205Lu CM (Fig. 4F). Although less pronounced, results were similar in LN-F treated with 1205Lu CM on 0.2 kPa hydrogels (Supplementary Fig. S4A-C).

To address the contribution of YAP in LN-F contractility, YAP expression was silenced using a siRNA approach (Fig. 4G). The spontaneous LN-F-mediated collagen matrix remodeling was suppressed by YAP knockdown, revealing that YAP was not only a marker of cell contraction, but actually actively controlled LN-F contractility (Fig. 4H). Note that YAP depletion by siRNA had no effect on LN-F proliferation (Supplementary Fig. S5A). Together, our data suggest that relaxation of the FRC actomyosin network induced by factors secreted by dedifferentiated melanoma cells is associated with inhibition of YAP-TEAD2 transcriptional activity.

The JAK1-STAT3 pathway is inhibited by invasive dedifferentiated melanoma CM and is required for LN-F contraction.

Next, we sought to determine signaling pathways linking actomyosin cytoskeleton relaxation and YAP inhibition induced by melanoma secreted factors in LN-F. Previous studies have demonstrated that PDPN drives actomyosin contraction of FRC through binding to proteins from the ERM family, which link membrane proteins to the cytoskeleton (22,23). Binding of PDPN to its only known ligand CLEC2 dismantled the PDPN-ERM interaction and inhibited ERM phosphorylation and PDPN-driven actomyosin contraction (19,20). Our first series of data excluded the possible contribution of the CLEC2-PDPN-ERM pathway in melanoma-induced LN-F relaxation.

Indeed, expression of CLEC2 was not detected in 1205Lu cells (data not shown) and immunoblot analysis showed that ERM phosphorylation was not affected in 1205Lu CM-treated LN-F (Fig. 5A). However, 1205Lu CM increased PDPN expression, as already shown by flow cytometry in Fig. 2F, and reduced α -SMA protein levels. This is in agreement with LN-F activation and the concomitant inhibition of F-actin stress fiber formation observed in presence of 1205Lu CM (Fig. 3A and B). Because TGF- β and IL-6 family cytokines are known to regulate ROCK-mediated actomyosin contraction in myofibroblasts and CAF (25,29,30), we reasoned that the TGF- β Receptor 1 (TGF- β R1)-SMAD pathway or the GP130-JAK-STAT3 pathway could be involved in LN-F contractility. We previously identified by MS analysis that TGF- β , IL-6 and LIF were highly produced by 1205Lu cells compared to 501Mel cells (35). Indeed, STAT3 phosphorylation was strongly increased after 20 min exposure to 1205Lu CM but decreased after few hours and remained suppressed the following days (Fig. 5B). This indicates that the JAK-STAT3 pathway was specifically and consistently inhibited by factors secreted by dedifferentiated melanoma cells. On the contrary, compared with basal STAT3 phosphorylation observed in LN-F before the addition of fresh medium (time 0), STAT3 phosphorylation was decreased 20 min after the addition of control (Ctrl) medium or 501Mel CM, but returned to basal levels in 2 h. These results suggest that resting LN-F activated an autocrine JAK-STAT3 loop, which was interrupted when the LN-F supernatant was replaced by fresh medium. Indeed, we identified by MS that resting LN-F secrete basal levels of IL6 and LIF (Fig. 2H and data not shown). Sustained inhibition of STAT3 phosphorylation was also observed after 4 days treatment with CM prepared from other dedifferentiated melanoma cells, such as the WM2032 cell line or the short-term MM099 cells. In contrast, after treatment with CM from the melanocytic short-term MM074 melanoma cells, levels of STAT3 phosphorylation in LN-F were comparable to the control (Fig. 5C). We next investigated the consequences of the modulation of TGF- β R1-SMAD and GP130-JAK-STAT3 pathways on LN-F spontaneous contractility. Treatment with TGF or LIF had no effect on LN-F basal contractility (Fig. 5D), nor the inhibition of TGF-1 signaling by SB431542 (Fig. 5E). However, the JAK1/2 inhibitor Ruxolitinib strongly inhibited the spontaneous contraction of LN-F isolated from 4 different donors (Fig. 5E). Note that treatment with Ruxolitinib, SB431542 or Y-27632 had no effect on LN-F proliferation (Supplementary Fig. S5B). Importantly, immunoblot analysis revealed that Ruxolitinib inhibited both STAT3 and MLC2 phosphorylation, linking the JAK-STAT pathway to actomyosin contraction in LN-F (Fig. 5F). Indeed, similar to the effect of 1205Lu CM, Ruxolitinib inhibited RHOA activity in LN-F, suggesting that suppression of actomyosin contraction induced by 1205Lu CM was mediated through RHOA inhibition by the JAK-STAT pathway (Fig. 5G). As Ruxolitinib inhibits both JAK1 and JAK2 kinase activities, we used siRNAs against JAK1 (siJAK1) or JAK2 (siJAK2) to discriminate which JAK kinase(s) was involved in LN-F contraction. Because JAK1 depletion, but not JAK2, inhibited LN-F-mediated collagen matrix contraction, we identified JAK1 as the main JAK involved in LN-F contraction (Fig. 5H). Those results were further confirmed with the observation that STAT3 extinction by two different siRNA inhibited LN-F collagen matrix contraction, suggesting that JAK1 controls LN-F contractility through STAT3 (Fig. 5I). JAK1 or STAT3 depletion by siRNAs had no effect on LN-F proliferation (Supplementary Fig. S5A). Looking back to the GSEA analysis of genes down-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F compared to Ctrl (Fig. 3D), it seemed surprising that the JAK-STAT pathway modulation could not be identified. So we repeated the GSEA analysis with the most down-

regulated, but also up-regulated genes from the microarray (Fig. 5J). Indeed, several genes strongly upregulated in 1205Lu CM-treated LN-F were related to the negative regulation of the JAK-STAT pathway, such as the MIR146A microRNA (40), members of the SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) family (41) and the phosphatases PTPN2 (Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 2) (42) and INPP5F (Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase F) (43). Together, our results reveal the contribution of JAK1-STAT3 signaling pathway in 1205Lu-mediated suppression of LN-F contraction.

The JAK1-STAT3 pathway controls YAP activity and the actin cytoskeleton polymerization.

We next questioned whether JAK1-STAT3 inhibition impacts on YAP function and ROCK-MLC2-actomyosin cytoskeleton remodeling in LN-F. Fibroblasts were treated with the JAK1/2 inhibitor Ruxolitinib or the ROCK inhibitor Y-27632 and analyzed by fluorescence microscopy (Fig. 6A). In agreement with the role of the RHOA-ROCK pathway in YAP activity and actomyosin polymerization (28), we found that pharmacological inhibition of ROCK induced YAP cytosolic relocation (Fig. 6B), decreased F-actin stress fibers (Fig. 6C) and LN-F stretching (Fig. 6D). Similar observations were made when cells were treated with Ruxolitinib, suggesting that JAK1 is critical to maintain nuclear YAP and actomyosin network tension. Consistently, JAK1 silencing by siRNA (siJAK1) induced YAP cytosolic relocation and inhibited the formation of actin filaments (Fig. 6E-G). Interestingly, similar modifications were observed after STAT3 extinction (siSTAT3), suggesting that JAK1 effects on YAP and actomyosin are mediated by STAT3. Accordingly, expression of the YAP target genes CTGF and CYR61 was inhibited after STAT3 knockdown by siRNA (Fig. 6H).

Therefore, after deciphering the signaling pathway linking factors secreted by dedifferentiated melanoma cells to the relaxation of the LN-F actomyosin cytoskeleton, we focused our attention on the nature of these tumoral cues.

Invasive dedifferentiated melanoma cells release soluble proteins that inhibit LN-F contractility.

The CM contains all the factors secreted by melanoma cells, including soluble proteins and lipids and extracellular vesicles (EVs) such as exosomes. EVs are known to promote LN niche formation and distal metastatic tumor growth (12,13). Knowing that 1205Lu cells actually secreted more EVs than 501Mel cells (data not shown), we first investigated if EVs had any effect on LN-F contractility. The 1205Lu CM was depleted from EVs by ultracentrifugation and analyzed by immunoblot to control the enrichment of EV-specific CD9, CD63 and CD81 tetraspanins and the chaperone protein HSP70 in the EV fraction and their absence in the EV-depleted 1205Lu CM fraction (Fig. 7A). The LN-F-mediated collagen matrix contraction was inhibited to similar levels after incubation with the EV-depleted 1205Lu CM or the complete 1205Lu CM, while incubation with concentrated 1205Lu EVs (5 μ g/ml) did not modulate LN-F spontaneous contractility (Fig. 7B). These results excluding any involvement of melanoma EVs in the regulation of LN-F contractility, we turned our attention towards proteins and lipids secreted independently from EVs. Proteins are more sensitive to heat than lipids. As the 1205Lu CM heated to 95°C for 5 min partly lost its ability to inhibit LN-F cell contraction, we therefore hypothesized that proteins, rather than lipids, were responsible for the 1205Lu CM-inhibition of LN-F contractility (Fig. 7C). To validate this idea, we treated the 1205Lu CM by the broad-spectrum serine protease proteinase K (PK) to degrade proteins and then inactivated PK with the serine protease inhibitor PMSF (PhenylMethylSulfonyl Fluoride) before adding the 1205Lu CM on LN-F. The PK-treated 1205Lu CM was no longer able to decrease LN-F-mediated collagen matrix contraction, further confirming the contribution of soluble melanoma-derived proteins in suppression of LN-F contractility (Fig. 7D). Finally, to identify more precisely the set of candidate proteins mediating this effect, the 1205Lu CM was filtrated through membranes with

distinct molecular weight (MW) cut-offs ranging from 3 kDa to 100 kDa to fractionate the proteins according to their size (Fig. 7E). 1205Lu-secreted proteins selected by cut-offs below 30 kDa and above 100 kDa did not modify LN-F contractility while proteins selected by cut-offs above 30 kDa retained the ability to inhibit LN-F contraction (Fig. 7F). We thus restricted 1205Lu-secreted factors able to regulate LN-F actomyosin polymerization to EV-free proteins with a MW ranging from 30 kDa to 100 kDa.

DISCUSSION

Our study provides the first evidence that human FRC are contractile cells similar to murine FRC (19-21). Quiescent FRC display a myofibroblast-like phenotype along with high expression of PDPN, FAP and α -SMA and thus share many properties with CAF. These CAF hallmarks suggest that FRC could play a tumor supportive role in the LN metastatic microenvironment. Indeed, PDPN was identified as a CAF marker in a variety of malignancies and is associated with metastasis and poor prognosis (44,45). PDPN expression on CAF favors force-mediated matrix remodeling through the activation of the RHO-ROCK pathway and promotes cancer cell invasion (45). In a recent study in breast cancer patients, metastatic LN were shown to be enriched in a CAF subpopulation inducing cancer cell invasion and exhibiting similar markers (PDPN^{high}, FAP^{high}, α -SMA^{high}, PDGFR- β ^{high}) to FRC (46), suggesting that LN CAF mostly originated from resident FRC.

Focusing on the signaling pathway(s) driving FRC actomyosin contractility, we provide evidence that the spontaneous contractility of quiescent FRC relies on a basal level of YAP and JAK1-STAT3 activation, and not only on the PDPN-ERM pathway as previously identified in murine FRC. YAP activation was known to reflect the actomyosin contractile state of FRC (20) and CAF (27), and to regulate FRC differentiation during LN development (47). We show here that YAP is not only a marker but also controls actomyosin contractility of differentiated human FRC. YAP and the RHO-ROCK pathway are intimately linked, regulating each other and controlling the actomyosin cytoskeleton plasticity (27,28). We also disclose that inhibition of JAK1 or STAT3 reduces FRC contractility and leads to inhibition of RHOA and YAP activities. Previous studies have shown that JAK1-STAT3 signaling increases ROCK-mediated actomyosin contractility in CAF, and that ROCK signaling induces STAT3 phosphorylation and transcriptional responses. Thus, JAK1-STAT3 and RHO-ROCK are interdependent and cross-regulate each other (30). However, it is still unclear if JAK1-STAT3 controls both YAP and RHOA pathways or if it controls only YAP or RHOA, which then regulate other(s) pathway(s). Collectively, our results support the notion that the RHO-ROCK-driven contractility of human FRC is not only controlled by the PDPN-ERM pathway, but also by signaling pathways shared with CAF.

Tumor cells secrete numerous growth factors and inflammatory factors, such as TGF β or the IL-6 family cytokines that trigger fibroblast activation and CAF transformation, both processes associated with increased actomyosin contractility. Strikingly, we discover that melanoma cells with a dedifferentiated signature (MITF^{low} AXL^{high}) secrete factors drastically suppressing force-driven matrix remodeling by FRC. Factors secreted by dedifferentiated melanoma cells but not by melanocytic melanoma cells, inhibit JAK1-STAT3 signaling, which decreases RHO-ROCK-MLC2 signaling and YAP activity. These pathways are interconnected and may be regulated through feedback mechanisms. The JAK-STAT pathway is a major signaling mechanism for a wide array of cytokine and growth factor receptors. Further investigations are now required to identify the receptor(s) involved in actomyosin relaxation of FRC treated with factors secreted by dedifferentiated melanoma cells. Because CAF activation by tumoral cues is associated with the acquisition of contractile properties, the inhibition of FRC contractility by melanoma CM was unexpected. However, it is part of the FRC activation process, like during an immune challenge (19,20). Indeed, we show that FRC stimulated with CM from dedifferentiated

melanoma cells are in an activated state. They proliferate more, up-regulate some markers of activation (FAP, PDPN), and increase the secretion of extracellular matrix proteins (FN, TNC) and cytokines (IL-6). Changes in cell contractile potential alter fibroblast proliferation, and inflammation is known to trigger FRC proliferation and PDPN expression, while the specific underlying mechanisms remain unknown (19,20,39). Thus, the increased proliferation that we observe in presence of invasive melanoma secreted factors might have stemmed from dysregulated tension or be independently due to factors secreted by invasive melanoma cells. Interestingly, both BRAF-mutated (1205Lu, WM793, MM099) and NRAS-mutated (WM2032, SBcl2) melanoma dedifferentiated cells were able to inhibit FRC contractility. Melanoma cell plasticity is thought to be a key driver of melanoma progression (2-5). The phenotypic switch to a dedifferentiated MITF^{low} signature is associated with a gain in invasive and metastatic abilities. Our findings further suggest that the dedifferentiated state endows melanoma cells with reprogramming of the LN fibroblastic stroma prior metastatic dissemination. The question remains whether tumor-derived factors from other cancers that spread to the LN, such as breast cancer, have the ability to exert a similar task on FRC contractility and activation. Culture of FRC with factors secreted by dedifferentiated melanoma cells strikingly phenocopies the prevention of PDPN signaling by the provision of CLEC2, antibody blockade or genetic deficiency (19,20). It induces similar morphological changes with an elongated cell shape, decreased stress fibers, less YAP nuclear activation, but also increased proliferation and PDPN expression. So, while we have excluded the modulation of ERM phosphorylation by melanoma CM, the implication of PDPN in the inhibition of FRC contractility mediated by melanoma CM is still an open question. PDPN can activate the FRC actomyosin machinery independently of its binding to ERM proteins, by engaging a neighboring transmembrane protein (20). Our hypothesis is that this unknown transmembrane protein may drive JAK1 signaling and that binding to its ligand secreted by dedifferentiated melanoma cells could dissociate such interaction. An alternative could be that JAK1 may directly bind to the PDPN cytoplasmic tail. Indeed, JAK1 contains a FERM domain in its N-terminal portion, like ERM proteins, and this domain is responsible for direct binding to the cytoplasmic tail of integral membrane proteins (48). Indeed, PDPN controls a wide range of physiological effects, such as contractility, migration, proliferation or differentiation, probably through distinct molecular partners in diverse cell types (45). It is established that factors secreted by melanoma cells, including TGF- β , growth factors, or proinflammatory molecules promote tumorigenesis (49) and LN metastasis (14). Melanoma EVs have been particularly described as potent inducers of LN premetastatic niches (12,13). However, 1205Lu-EVs did not modulate FRC contractility in our experimental setting and we have restricted candidate factors to EV-free proteins between 30 kDa and 100 kDa. We previously identified by MS that dedifferentiated 1205Lu cells secrete higher levels of cytokines, chemokines, growth factors and matricellular proteins than melanocytic 501Mel cells (34,35,50). However, factors known to affect fibroblast contractility and secreted more abundantly by 1205Lu cells (i.e., TGF β -IL-6, LIF) did not modulate FRC contractility. In the light of the melanoma cell transcriptional signatures identified (2-5), a detailed analysis of the factors secreted by dedifferentiated and melanocytic subpopulations of melanoma cells is needed to better apprehend their interactions with the components of the tumor microenvironment and identify soluble proteins controlling FRC contractility, proliferation and activation. FRC contractile phenotype regulates LN swelling and tunes LN immunity (19,20). Factors secreted by cutaneous melanoma may therefore account for the swelling observed in melanoma draining LNs (16,17). One study has analyzed in vitro and in vivo stromal reprogramming induced by melanoma cells in tumor draining LN using the murine B16.F10 cell line (17). This

study reported an increased RHO signaling in murine FRC isolated from B16.F10-draining LN, and in contrast to our work, the enhanced capacity of FRC treated with B16.F10 CM to contract collagen matrices. At present, the reason behind this discrepancy remains unclear. One explanation would be that the murine B16.F10 melanoma cell line, which harbors neither BRAF nor NRAS oncogenic mutation, is known to express high levels of MITF despite its metastatic potential and may control FRC functions differently than MITF^{low} human melanoma cells. To this regard it would be of great importance to compare in a mouse model how melanocytic MITF^{low} and dedifferentiated MITF^{high} melanoma cells reprogram FRC in the LN metastatic niche. Together this underlines that the development of the metastatic disease is a very complex process fueled by intratumor heterogeneity and the mutational context. LNs from wild-type mice are significantly less stiff and more deformable after immunization or following antibody blockade of PDPN (20), demonstrating that FRC contractility affects LN stiffness. Microenvironment clues such as tissue stiffness might control the back-and-forth switches of melanoma cells between proliferative melanocytic and invasive dedifferentiated states to drive disease progression. We can hypothesize that a softer pre-metastatic LN microenvironment could then favor the switch of invasive dedifferentiated melanoma cells reaching the LN to proliferative melanocytic cells able to form new metastatic foci. The increased elasticity of the reticular FRC network conferred by actomyosin relaxation could also allow more LN stretching to give space for metastatic development without LN breakdown. Loss of FRC contractility also leads to significant changes in the homeostasis and spacing of FRC and T cells, with profound consequences for the LN microarchitecture and the population expansion of antigen-specific T cells following immunization. FRC control immune cell survival and proliferation through cell contacts and secretion of immunoregulatory molecules (18). Spacing of FRC and metastatic cells could also regulate tumoral development with similar mechanisms. Reprogramming the biomechanical and immune properties of the LN through loss of FRC contractility thus may be essential for the survival and development of metastatic cells in the LN niche. In conclusion, we have identified a new mechanism by which invasive melanoma cells can reprogram the function of FRC from the LN niche and deciphered the underlying intracellular signaling pathways involved in FRC cytoskeleton relaxation. Our work illustrates that FRC activation and actomyosin relaxation in LN might be a prognostic marker of the melanoma invasive capacities, suggesting that the microarchitecture of the FRC reticular network and PDPN expression could be examined in tumor-draining LN at diagnosis. Blocking the distant communication between invasive melanoma cells and FRC may inhibit the formation of a permissive biomechanical and immunological LN niche, thereby impinging on lymphatic metastasis.

Acknowledgements : We thank J.-C. Marine for short-term cultures of melanoma cells, and the "Microscopie Imagerie Côte d'Azur" (MICA) GIS IBISA platform supported by the GIS IBISA, Conseil Départemental 06 and Région Provence Alpes Côte d'Azur. We acknowledge M.Gesson and M. Irondelle from the C3M imaging facility for their helpful advice.

Financial support: This work was funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Université Côte d'Azur, Cancéropôle Provence Alpes Côte d'Azur (Emergence grant to V.P.), Fondation ARC (Projet Fondation ARC to V.P.), Ligue Contre le Cancer (Equipe labellisée 2016 to S.T.-D.) and Institut National du Cancer (INCA_12673 to S.T.-D.). Fundings from National Research Agency (ANR18-CE14-0019-01 to M.D.), ITMO Cancer Aviesan within the framework of the Cancer Plan and the French Government through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX- 0028-01) are also acknowledged. I.B. is a recipient of a doctoral fellowship from Ligue Contre le Cancer and S.D. is a recipient of a doctoral fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

Conflict of interest: The authors declare no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Cancer Genome Atlas N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 2015;161(7):1681-96 doi 10.1016/j.cell.2015.05.044.
- Arozarena I, Wellbrock C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer* 2019;19(7):377-91 doi 10.1038/s41568-019-0154-4.
- Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, Schaefer L, et al. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* 2008;68(3):650-6 doi 10.1158/0008-5472.CAN-07-2491.
- Rambow F, Rogiers A, Marin-Bejar O, Aibar S, Femel J, Dewaele M, et al. Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* 2018;174(4):843-55 e19 doi 10.1016/j.cell.2018.06.025.
- Wouters J, Kalender-Atak Z, Minnoye L, Spanier KI, De Waegeneer M, Bravo Gonzalez-Blas C, et al. Robust gene expression programs underlie recurrent cell states and phenotype switching in melanoma. *Nat Cell Biol* 2020;22(8):98698 doi 10.1038/s41556-020-0547-3.
- Girard CA, Lecacheur M, Ben Jouira R, Berestjuk I, Diazzi S, Prod'homme V, et al. A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma. *Cancer Res* 2020;80(10):1927-41 doi 10.1158/0008-5472.CAN-19-2914.
- Shaffer SM, Dunagin MC, Torborg SR, Torre EA, Emert B, Krepler C, et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* 2017;546(7658):431-5 doi 10.1038/nature22794.
- 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 doi 10.1038/ncomms7683.
- Brown M, Assen FP, Leithner A, Abe J, Schachner H, Asfour G, et al. Lymph node blood vessels provide exit routes for metastatic tumor cell dissemination in mice. *Science* 2018;359(6382):1408-11 doi 10.1126/science.aal3662.
- Pereira ER, Kedrin D, Seano G, Gautier O, Meijer EFJ, Jones D, et al. Lymph node metastases can invade local blood vessels, exit the node, and colonize distant organs in mice. *Science* 2018;359(6382):1403-7 doi 10.1126/science.aal3622.
- Ubellacker JM, Tasdogan A, Ramesh V, Shen B, Mitchell EC, Martin-Sandoval MS, et al. Lymph protects metastasizing melanoma cells from ferroptosis. *Nature* 2020;585(7823):113-8 doi 10.1038/s41586-020-2623-z.
- Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* 2011;71(11):3792-801 doi 10.1158/0008-5472.CAN-10-4455.
- Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012;18(6):883-91 doi 10.1038/nm.2753.
- Olmeda D, Cerezo-Wallis D, Riveiro-Falkenbach E, Pennacchi PC, Contreras-Alcalde M, Ibarz N, et al. Whole-body imaging of lymphovascular niches identifies pre-metastatic roles of milkine. *Nature* 2017;546(7660):676-80 doi 10.1038/nature22977.
- Cochran AJ, Huang RR, Lee J, Itakura E, Leong SP, Essner R. Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2006;6(9):65970 doi 10.1038/nri1919.
- Commerford CD, Dieterich LC, He Y, Hell T, Montoya-Zegarra JA, Noerrellykke SF, et al. Mechanisms of Tumor-Induced Lymphovascular Niche Formation in Draining Lymph Nodes. *Cell Rep* 2018;25(13):3554-63 e4 doi 10.1016/j.celrep.2018.12.002.
- Riedel A, Shorthouse D, Haas L, Hall BA, Shields J. Tumor-induced stromal reprogramming drives lymph node transformation. *Nat Immunol* 2016;17(9):1118-27 doi 10.1038/ni.3492.
- Fletcher AL, Acton SE, Knoblich K. Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2015;15(6):350-61 doi 10.1038/nri3846.
- Acton SE, Farrugia AJ, Astarita JL, Mourao-Sa D, Jenkins RP, Nye E, et al. Dendritic cells control fibroblastic reticular network tension and lymph node expansion. *Nature* 2014;514(7523):498-502 doi 10.1038/nature13814.
- Astarita JL, Cremasco V, Fu J, Darnell MC, Peck JR, Nieves-Bonilla JM, et al. The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* 2015;16(1):75-84 doi 10.1038/ni.3035.
- Malhotra D, Fletcher AL, Astarita J, Lukacs-Kornek V, Tayalia P, Gonzalez SF, et al. Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol* 2012;13(5):499-510 doi 10.1038/ni.2262.
- Martin-Villar E, Megias D, Castel S, Yurrita MM, Vilaro S, Quintanilla M. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 21):4541-53 doi 10.1242/jcs.03218.
- Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 2006;9(4):261-72 doi 10.1016/j.ccr.2006.03.010.
- Diazzi S, Tartare-Deckert S, Deckert M. Bad Neighborhood: Fibrotic Stroma as a New Player in Melanoma Resistance to Targeted Therapies. *Cancers (Basel)* 2020;12(6) doi 10.3390/cancers12061364.
- Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;16(9):582-98 doi 10.1038/nrc.2016.73.
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(12):1392400 doi 10.1038/ncb1658.
- Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2013;15(6):637-46 doi 10.1038/ncb2756.
- Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 2011;474(7350):179-83 doi 10.1038/nature10137.
- Albregues J, Bourget I, Pons C, Butet V, Hofman P, Tartare-Deckert S, et al. LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep* 2014;7(5):1664-78 doi 10.1016/j.celrep.2014.04.036.
- Sanz-Moreno V, Gaggioli C, Yeo M, Albregues J, Wallberg F, Viros A, et al. ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell* 2011;20(2):229-45 doi 10.1016/j.ccr.2011.06.018.
- Albregues J, Bertero T, Grasset E, Bonan S, Maiel M, Bourget I, et al. Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun* 2015;6:10204 doi 10.1038/ncomms10204.

30. Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E, et al. SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 2006;66(15):7516-23 doi 10.1158/0008-5472.CAN05-3189.
31. Didier R, Mallavialle A, Ben Jouira R, Domdom MA, Tichet M, Auberger P, et al. Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Mol Cancer Ther* 2018;17(7):1416-29 doi 10.1158/1535-7163.MCT17-0919.
32. Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Ben Jouira R, Garcia E, et al. Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 2019;38(30):5873-89 doi 10.1038/s41388-019-0848-9.
33. Tichet M, Prod'Homme V, Fenouille N, Ambrosetti D, Mallavialle A, Cerezo M, et al. Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nature Communications* 2015;6 doi 10.1038/ncomms7993.
34. Lino Cardenas CL, Henaoui IS, Courcot E, Roderburg C, Cauffiez C, Aubert S, et al. miR-199a-5p Is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin1. *PLoS Genet* 2013;9(2):e1003291 doi 10.1371/journal.pgen.1003291.
35. Rodda LB, Lu E, Bennett ML, Sokol CL, Wang X, Luther SA, et al. Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Cells Reveals Niche-Associated Heterogeneity. *Immunity* 2018;48(5):1014-28 e6 doi 10.1016/j.immuni.2018.04.006.
36. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 2001;12(9):2730-41 doi 10.1091/mbc.12.9.2730.
37. Yang CY, Vogt TK, Favre S, Scarpellino L, Huang HY, Tacchini-Cottier F, et al. Trapping of naive lymphocytes triggers rapid growth and remodeling of the fibroblast network in reactive murine lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(1):E109-18 doi 10.1073/pnas.1312585111.
38. Ren JP, Ying RS, Cheng YQ, Wang L, El Gazzar M, Li GY, et al. HCV-induced miR146a controls SOCS1/STAT3 and cytokine expression in monocytes to promote regulatory T-cell development. *J Viral Hepat* 2016;23(10):755-66 doi 10.1111/jvh.12537.
39. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997;387(6636):917-21 doi 10.1038/43206.
40. Shields BJ, Hauser C, Bukczynska PE, Court NW, Tiganis T. DNA replication stalling attenuates tyrosine kinase signaling to suppress S phase progression. *Cancer Cell* 2008;14(2):166-79 doi 10.1016/j.ccr.2008.06.003.
41. Kim HS, Li A, Ahn S, Song H, Zhang W. Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase F (INPP5F) inhibits STAT3 activity and suppresses gliomas tumorigenicity. *Sci Rep* 2014;4:7330 doi 10.1038/srep07330.
42. Kan S, Konishi E, Arita T, Ikemoto C, Takenaka H, Yanagisawa A, et al. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts aggressive behavior in melanoma. *J Cutan Pathol* 2014;41(7):561-7 doi 10.1111/cup.12322.
43. Quintanilla M, Montero-Montero L, Renart J, Martin-Villar E. Podoplanin in Inflammation and Cancer. *Int J Mol Sci* 2019;20(3) doi 10.3390/ijms20030707.
44. Pelon F, Bourachot B, Kieffer Y, Magagna I, Mermet-Meillon F, Bonnet I, et al. Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms. *Nat Commun* 2020;11(1):404 doi 10.1038/s41467-019-14134-w.
45. Choi SY, Bae H, Jeong SH, Park I, Cho H, Hong SP, et al. YAP/TAZ direct commitment and maturation of lymph node fibroblastic reticular cells. *Nat Commun* 2020;11(1):519 doi 10.1038/s41467-020-14293-1.
46. Haan S, Margue C, Engrand A, Rolvering C, Schmitz-Van de Leur H, Heinrich PC, et al. Dual role of the Jak1 FERM and kinase domains in cytokine receptor binding and in stimulation-dependent Jak activation. *J Immunol* 2008;180(2):998-1007 doi 10.4049/jimmunol.180.2.998.
47. Melnikova VO, Bar-Eli M. Inflammation and melanoma metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009;22(3):257-67 doi 10.1111/j.1755-148X.2009.00570.x.
48. Berestjuk I, Lecacheur M, Diazi S, Rovera C, Prod'homme V, Mallavialle A et al. Targeting DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated melanoma cell adaptation to BRAF-targeted therapy. *bioRxiv* 2019 doi 10.1101/857896.

Fig 1

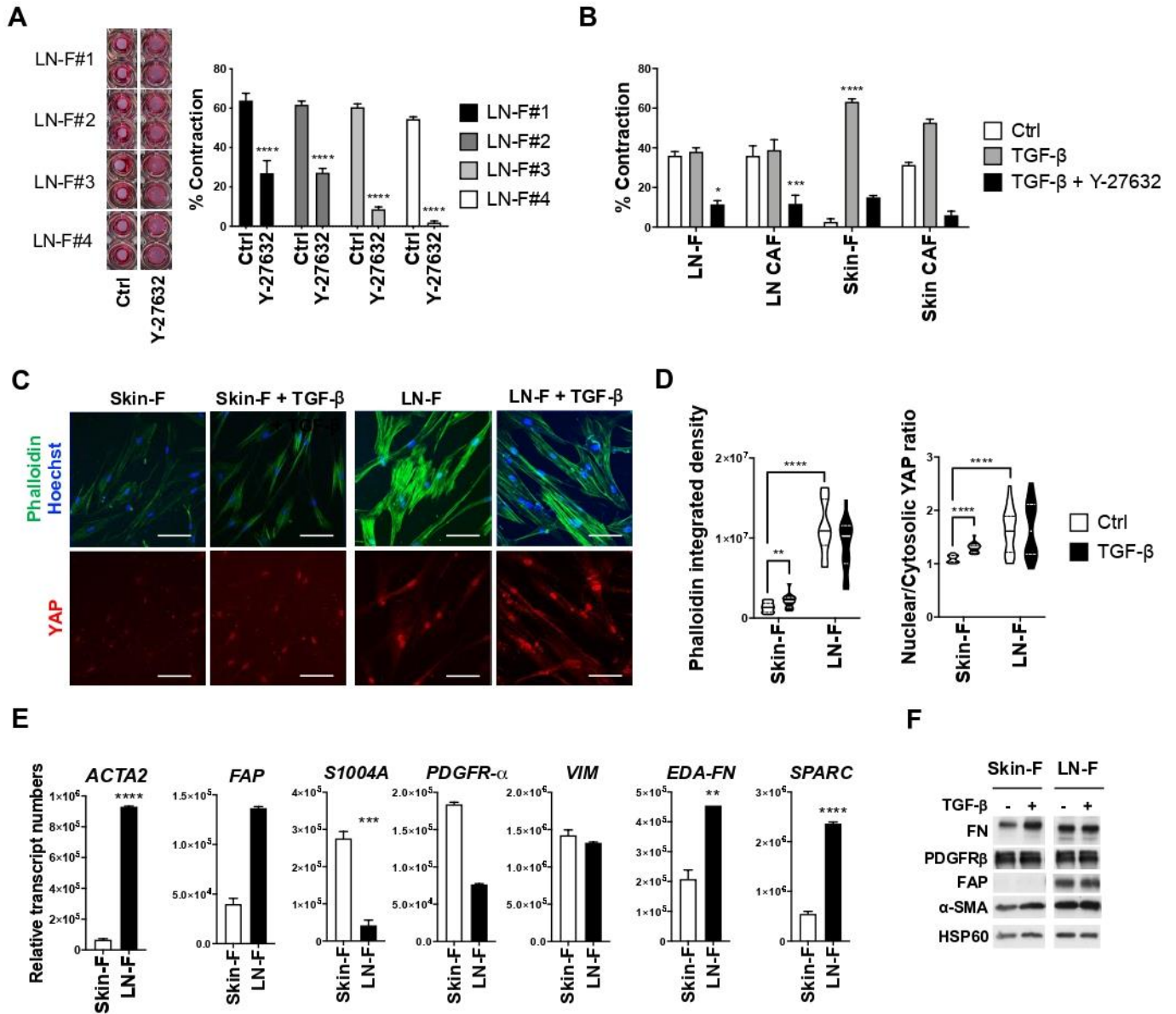


Figure 1. LN-F have a CAF-like phenotype associated with spontaneous contraction and the expression of CAF markers.

(A) Pictures of 3D collagen matrices containing LN-F from 4 donors (#1 to #4) treated with control medium (Ctrl) or the ROCK inhibitor Y-27632 (10 μ M) for 8 days (left). Quantification of the LN-F-mediated collagen matrix contraction (in quadruplicate; mean \pm SEM; p-Val (****)<0.0001) (right).

(B) Matrix contraction induced by LN-F, skin-F or CAFs isolated from skin or LN melanomas and treated with control medium (Ctrl), TGF- β (2 ng/ml) or Y-27632 (10 μ M) for 7 days (n = 2 to 7 for each cell type, in triplicate; mean \pm SEM; p-Val (*<0.05, (**<0.001, (****<0.0001).

(C) Fluorescence pictures showing F-actin stress fibers (Phalloidin), cell nuclei (Hoechst) and YAP localization in Skin-F and LN-F grown for 4 days in control medium or with TGF- β (2 ng/ml) (Scale bar = 100 μ m).

(D) Quantification of F-actin fibers (phalloidin integrated density) (n = 19 cells; median \pm quartiles) and YAP localization (n = 22 cells; median \pm quartiles); p-Val (**<0.01, (****<0.0001).

(E) Quantification by qRT-PCR of the expression of CAF markers in LN-F and skin-F (n = 2, in duplicate; mean \pm SEM; p-Val (**<0.01, (***)<0.001, (****<0.0001).

(F) Immunoblotting of CAF markers (FN, PDGFR β , FAP and α -SMA) in Skin-F and LN-F cultured for 4 days in control medium (Ctrl) or treated by TGF- β (2 ng/ml). HSP60 is used as a loading control.

Fig 2

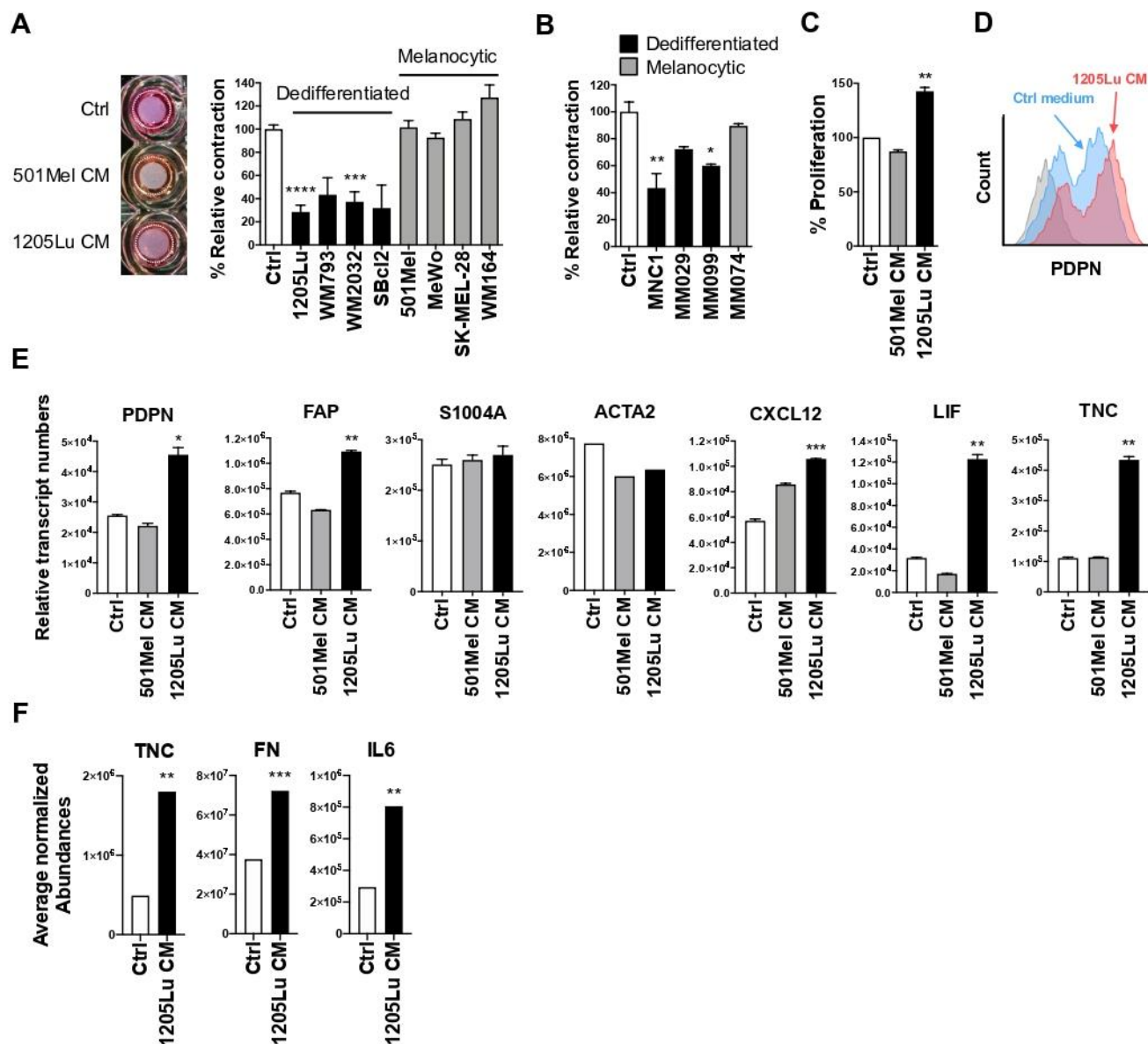


Figure 2. Factors secreted by MITF^{low} AXL^{high} dedifferentiated melanoma cells inhibit LN-F contractility and induce LN-F proliferation and activation.

(A) Representative picture (left) and quantification (right) of LN-F-mediated contraction of a collagen matrix after 7 days culture with Ctrl medium or CM from dedifferentiated MITF^{low} AXL^{high} or melanocytic MITF^{high} AXL^{low} melanoma cell lines (n = 3, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (***)<0.001, (****)<0.0001).

(B) LN-F-mediated collagen matrix contraction after 7 days incubation with CM from dedifferentiated MITF^{low} AXL^{high} or melanocytic MITF^{high} AXL^{low} short term patient melanoma cells (n = 3, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (*)<0.05, (**)<0.01).

(C) Proliferation of LN-F incubated 6 days with ctrl medium, 501Mel CM or 1205Lu CM (n = 2, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01).

(D) Representative flow cytometry analysis of PDPN surface expression on LN-F cultured for 5 days with 1205Lu CM (in red) or ctrl medium (in blue). Staining with a control isotype mAb is shown in grey (n = 4).

(E) qRT-PCR analysis of fibroblast activation markers expressed by LN-F cultured for 2 days with ctrl medium, 501Mel CM or 1205Lu CM (n = 2, in duplicate; Mean +/- SEM; p-Val (*)<0.05, (**)<0.01, (***)<0.001).

(F) Detection by mass spectrometry of TNC, FN and IL6 secreted by LN-F treated for 7 days with ctrl medium or 1205Lu CM (n = 2, in triplicate; Mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01, (***)<0.001).

Fig 3

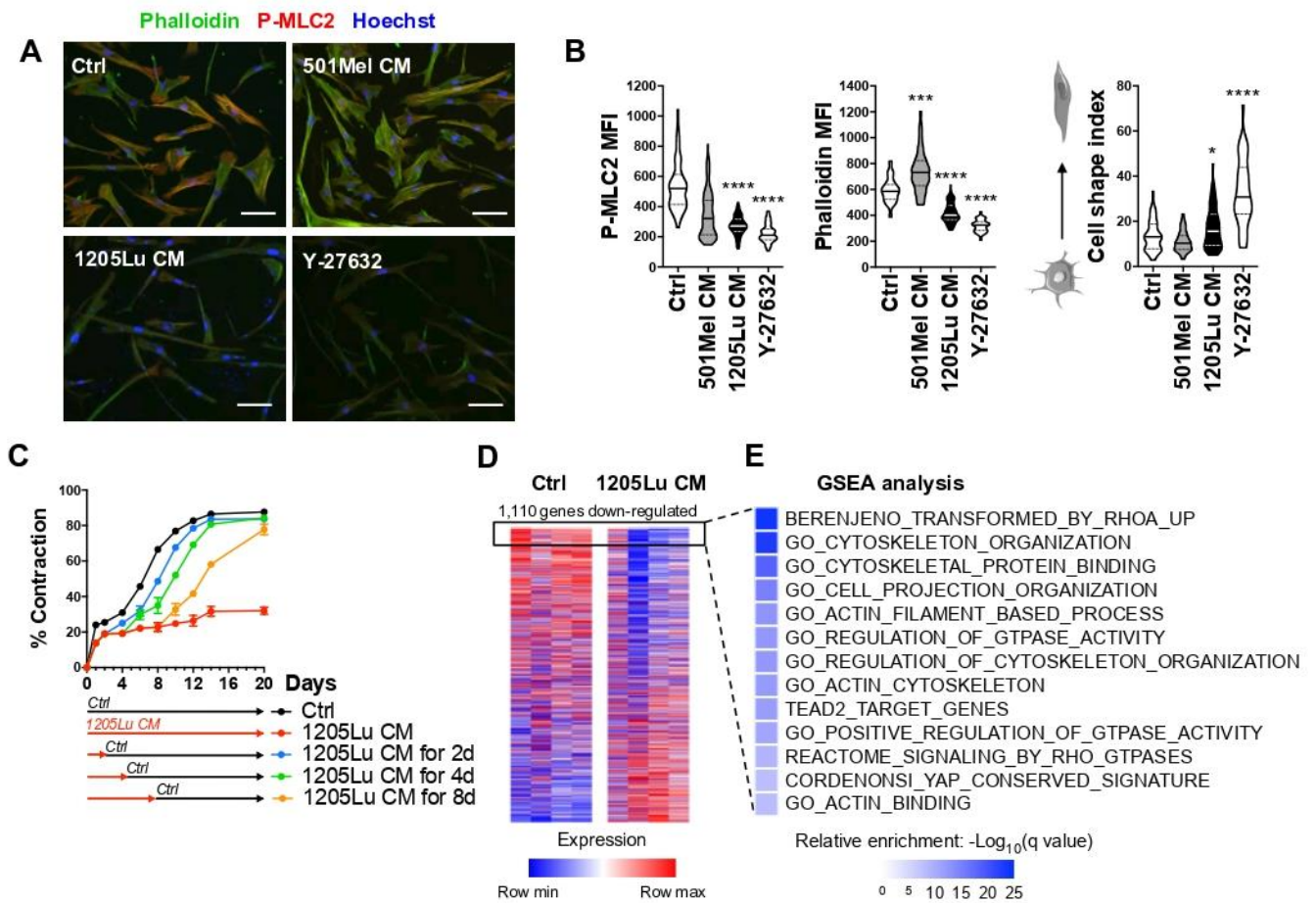


Figure 3. Factors secreted by the MITF^{low} AXL^{high} dedifferentiated 1205Lu cell line inhibit the LN-F actomyosin cytoskeleton contraction.

(A) Fluorescence staining of F-actin fibers (Phalloidin), MLC2 phosphorylation (P-MLC2) and cell nuclei (Hoechst) in LN-F grown for 7 days in Ctrl medium or with CM from the dedifferentiated 1205Lu cell line or the melanocytic 501Mel cell line (Scale bar = 100 μ m).

(B) Quantification of mean fluorescence intensities (MFI) of active pS19 MLC2 (P-MLC2), F-actin fibers (phalloidin) and the cell shape index (n = 45 cells; median +/- quartiles; p-Val (*)<0.05, (***)<0.001, (****)<0.0001).

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

(D) Microarray-based gene expression profiling in Ctrl and 1205Lu CM-treated LN-F. The 1,110 most down-regulated genes in 1205Lu-reprogrammed LN-F (with LogFC \leq - 0.5) are surrounded and submitted to Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) in (E).

Fig 4

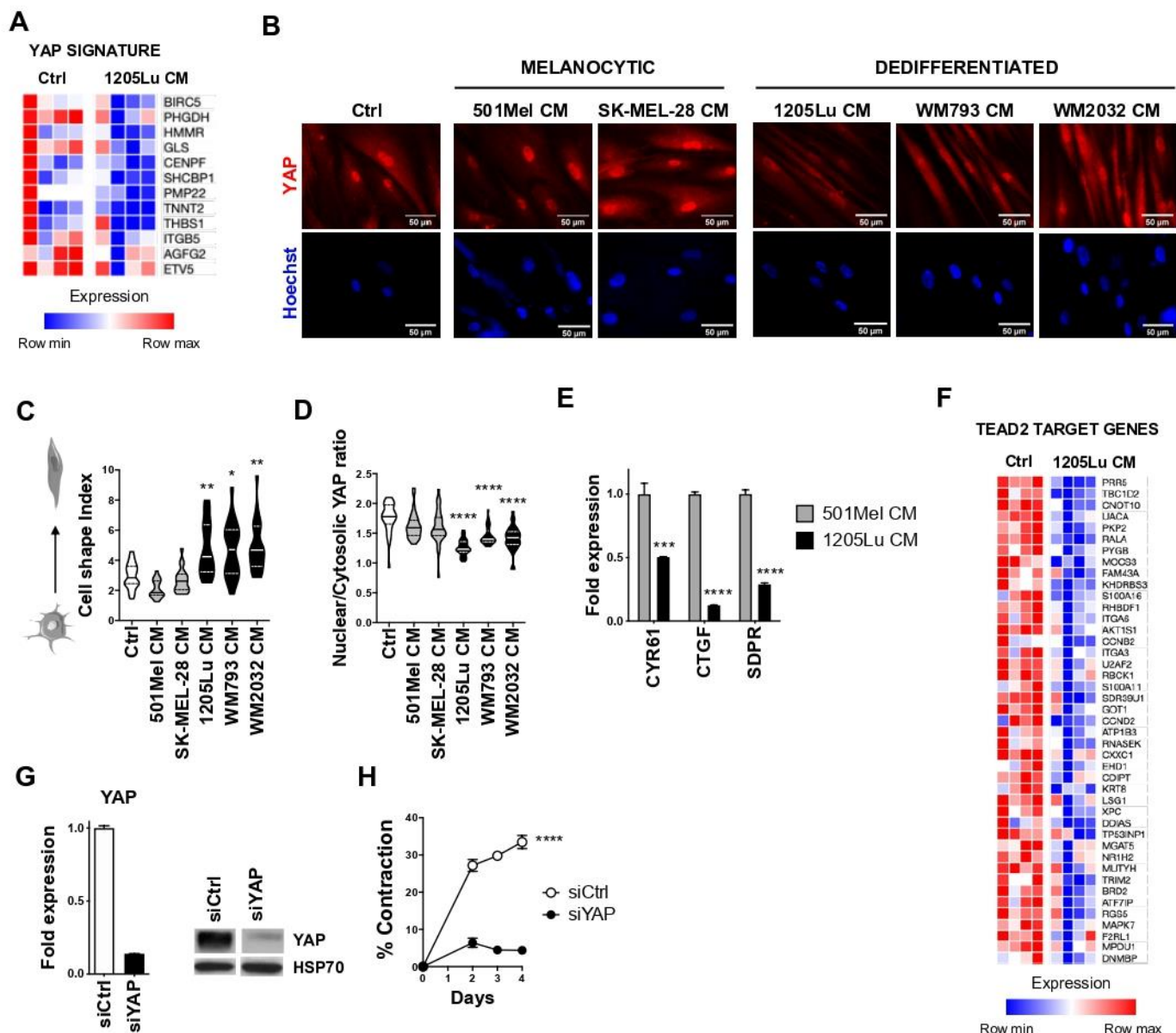


Figure 4. The inhibition of LN-F contractility induced by invasive melanoma CM is associated with decreased YAP activity.

(A) Top genes down-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F in the Cordenonsi YAP conserved Signature (LogFC ≤ -0.5).

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

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

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

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

(F) Top TEAD2 target genes down-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F (LogFC ≤ -0.5 , pVal ≤ 0.05).

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

(H) Quantification of matrix contraction by LN-F transfected with siCtrl or siYAP (n = 2, in quadruplicate; p-Val (****) < 0.0001).

Fig 5

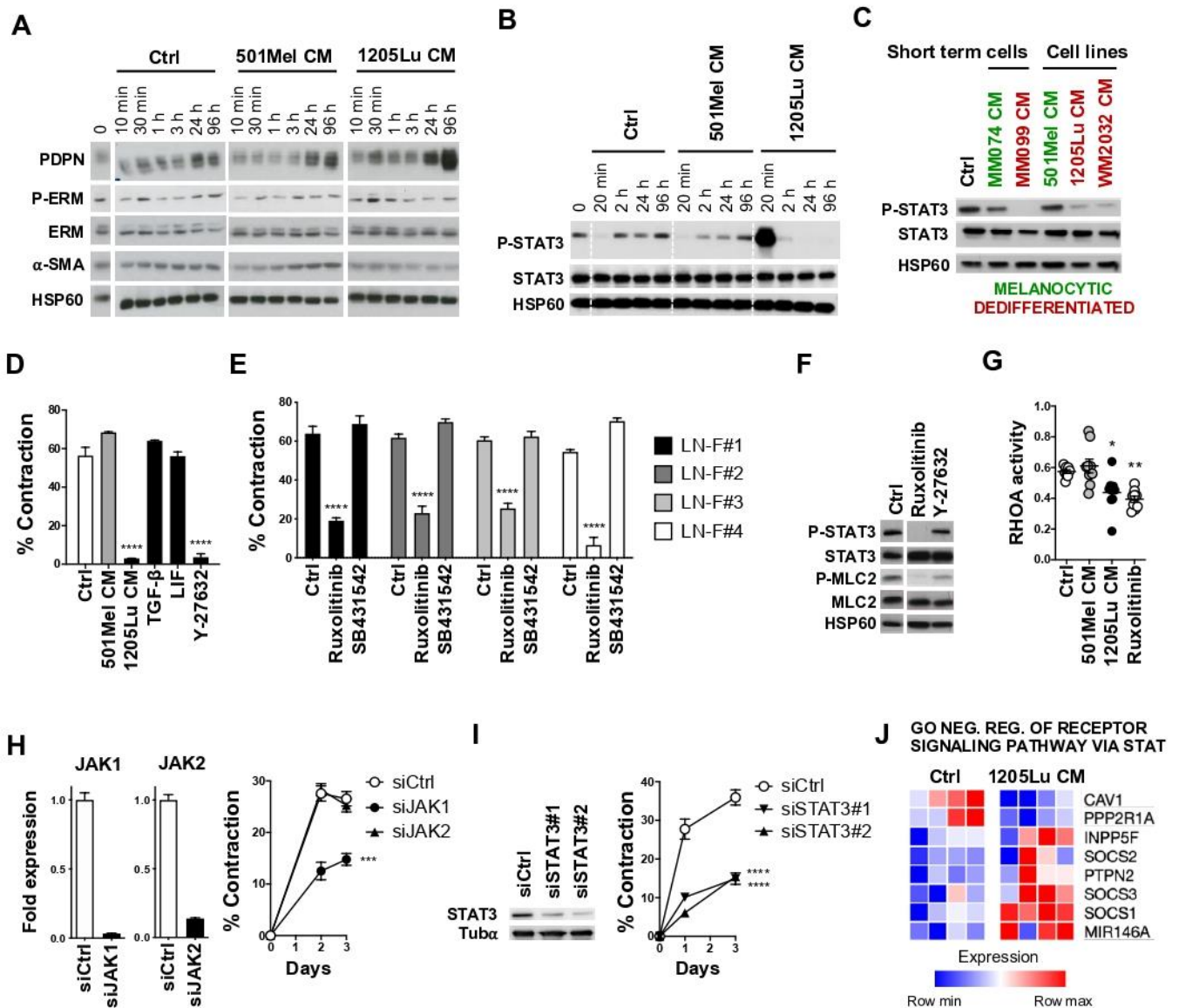


Figure 5. The JAK1-STAT3 pathway is inhibited by invasive melanoma CM and controls LN-F contraction.
 (A) Immunoblotting of PDPN, P-ERM, ERM and α -SMA in LN-F cultured in Ctrl medium, 501Mel CM or 1205Lu CM for 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 24 h and 96 h. HSP60 is used as a loading control.
 (B) Immunoblotting of P-STAT3 and STAT3 in LN-F cultured in Ctrl medium, 501Mel CM or 1205Lu CM for 20 min, 2 h, 24 h and 96 h. HSP60 is used as a loading control.
 (C) Immunoblotting of P-STAT3 and STAT3 in LN-F cultured for 96 h in Ctrl medium or CM from short term isolated melanomas (MM074 and MM099) or melanoma cell lines (501Mel, 1205Lu, WM2032). HSP60 is used as a loading control.
 (D) Matrix contraction by LN-F treated by Ctrl medium, 501Mel CM, 1205Lu CM, TGF- β 1 (2 ng/ml), LIF (2 ng/ml) or Y-27632 (10 μ M) for 6 days (n = 3, in triplicate; mean \pm SEM; p-Val (****)<0.0001).
 (E) Matrix contraction by LN-F treated by 10 μ M of TGF- β R1 inhibitor (SB431542) or Ruxolitinib for 8 days (n = 3, in quadruplicate; mean \pm SEM; p-Val (****)<0.0001).
 (F) Immunoblotting of P-STAT3, STAT3, P-MLC2 and MLC2 in LN-F treated 4 days by Ruxolitinib (10 μ M) or Y-27632 (10 μ M). HSP60 is used as a loading control.
 (G) RHOA activity measured by G-LISA assay in cell lysates of LN-F treated 4 days with 501Mel CM, 1205Lu CM or Ruxolitinib (10 μ M) (n = 3, in triplicate; mean \pm SEM; p-Val (*)<0.05, (**)<0.01).
 (H) qRT-PCR quantification of JAK1 and JAK2 silencing by siRNAs (siJAK1 and siJAK2) (n = 2, in duplicate) (left) and quantification of matrix contraction by LN-F transfected with siJAK1 or siJAK2 (n = 2, in triplicate; mean \pm SEM; p-Val (**)<0.01) (right). A ctrl siRNA (siCtrl) is used as a ctrl of transfection.
 (I) Immunoblotting of STAT3 and Tubulin- α 2 days after the extinction of STAT3 expression by 2 siRNAs (siSTAT3#1 and siSTAT3#2) (left). Quantification of LN-F-mediated matrix contraction after siRNA silencing of STAT3 (n = 2, in quadruplicate; mean \pm SEM; p-Val (****)<0.0001) (right). siCtrl is used as a control of siRNA transfection.
 (J) Differentially expressed genes between Ctrl and 1205Lu CM-treated LN-F identified in the GO negative regulation of receptor signaling pathway via STAT.

Fig 6

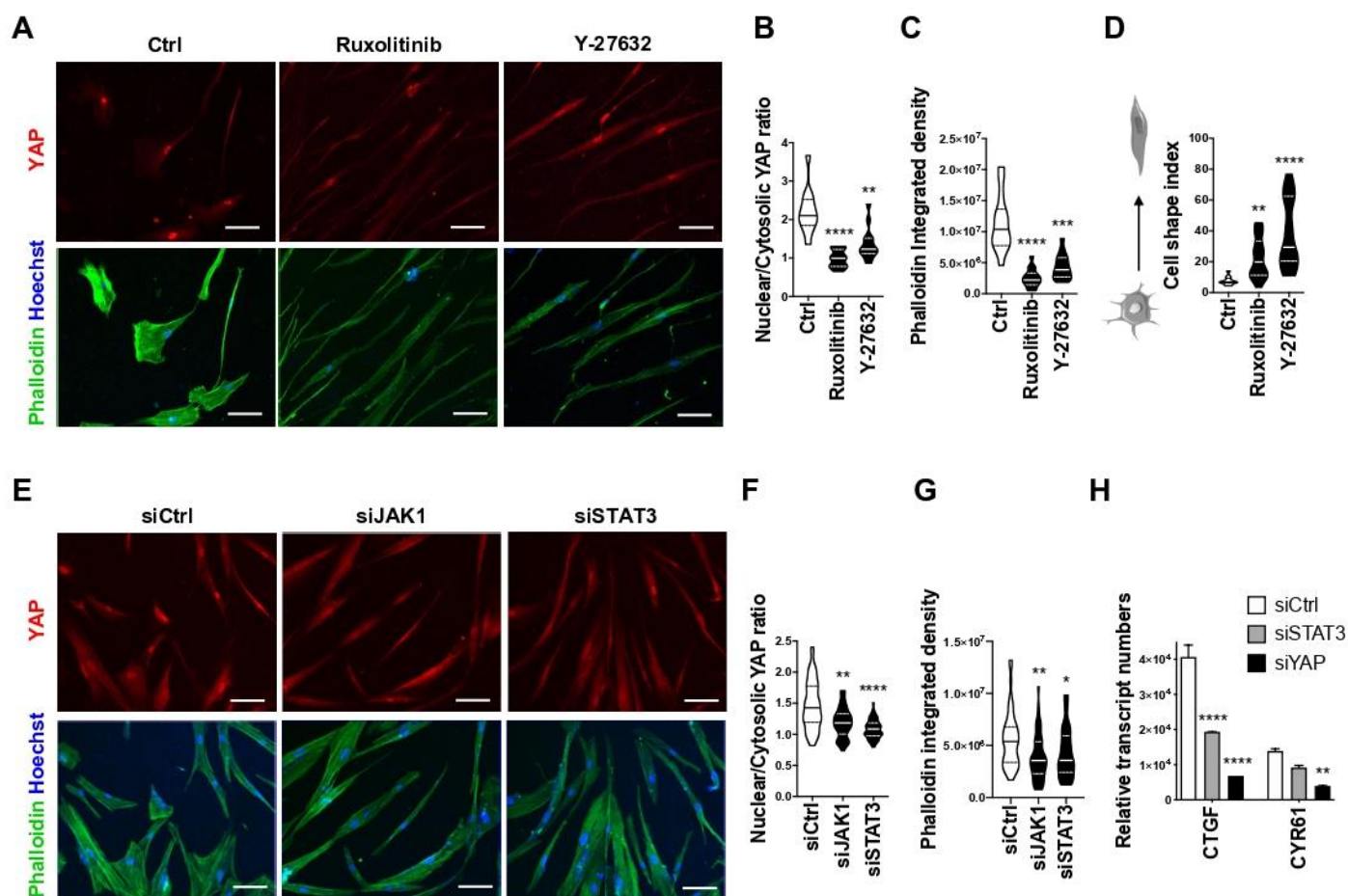


Figure 6. The JAK1-STAT3 pathway controls YAP and the polymerization of the actin cytoskeleton.

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

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

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

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

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

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

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

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

Fig 7

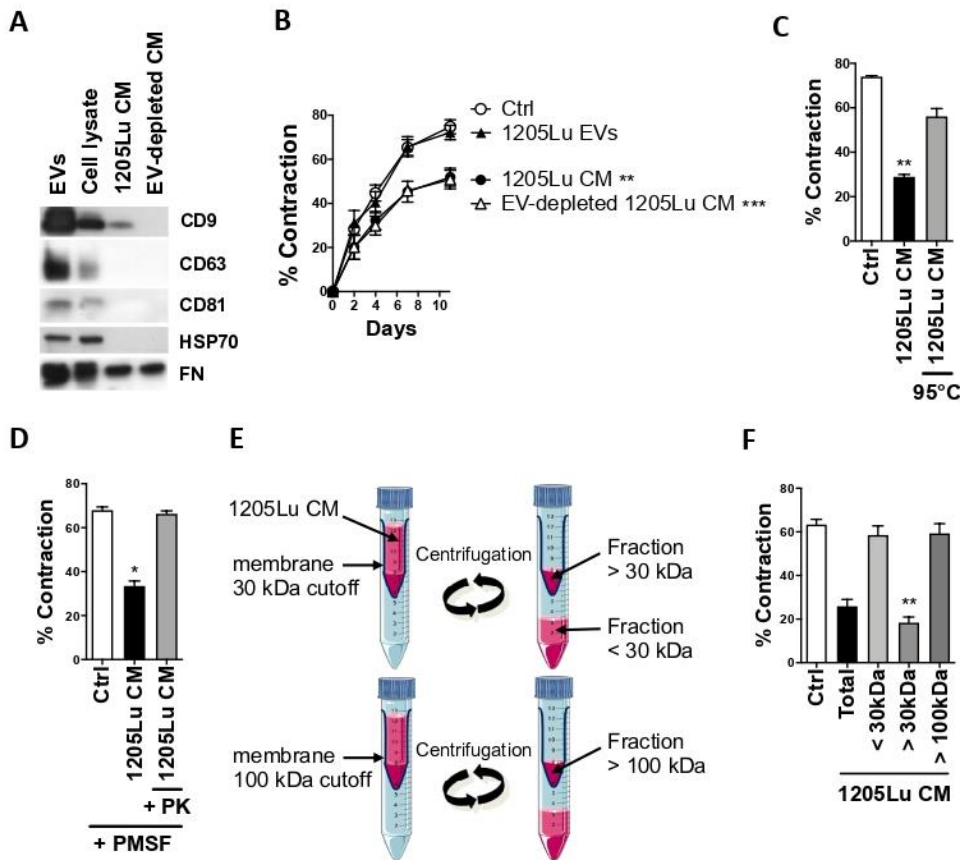


Figure 7. Soluble proteins secreted by dedifferentiated melanoma cells inhibit LN-F contractility.

(A) Immunoblot analysis of EV-specific markers CD9, CD63, CD81 and HSP70 in extravesicles (EVs) isolated from the 1205Lu CM (15 µg), in the 1205Lu cell lysate (15 µg), and in the EV-depleted 1205Lu CM. FN is used as a loading control.

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

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

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

(E) The 1205Lu CM was fractionated by centrifugation using 30 kDa or 100 kDa cut-off membranes. The 1205Lu CM fractions with 1205Lu factors below 30 kDa (< 30 kDa), above 30 kDa (> 30 kDa) and above 100 kDa (> 100 kDa) were harvested and tested in the gel contraction assay shown in F.

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