



Etude de la régulation de l'expression génique par une approche multi-omique dans deux modèles de mélanome uvéal agressif

David Gentien

► To cite this version:

David Gentien. Etude de la régulation de l'expression génique par une approche multi-omique dans deux modèles de mélanome uvéal agressif. Génétique humaine. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL056 . tel-03829188

HAL Id: tel-03829188

<https://theses.hal.science/tel-03829188>

Submitted on 25 Oct 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.

Etude de la régulation de l'expression génique par une approche multi-omique dans deux modèles de mélanome uvéal agressif

*Gene expression regulation analysis by a multiomics approach in two
models of aggressive uveal melanoma*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 582 : Cancérologie : biologie, médecine, santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Graduate School: Life sciences and health
Réfèrent: Faculté de médecine

Thèse préparée dans le **département de recherche translationnelle**,
Au sein du Centre de recherche de l'**Institut Curie**,
Sous la direction de **Sergio ROMAN ROMAN**, directeur de thèse

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 10 octobre 2022, par

David GENTIE

Composition du Jury

Pr Stéphane LE CROM Professeur, UMR 7238 CNRS, Sorbonne Université	Président
Dr Sabine COLNOT DR2 Inserm, Inserm UMRS1138	Rapporteuse & Examinatrice
Dr Robert BALLOTTI DRE Inserm, Inserm U1065	Rapporteur & Examinateur
Dr Laila EL KHATTABI MCUPH, Sorbonne Université, Institut du Cerveau	Examinatrice
Pr Stéphane LE CROM Professeur, HDR, UMR 7238 CNRS	Examineur
Dr Sergio ROMAN ROMAN HDR, Institut Curie	Directeur de thèse

Titre : Etude de la régulation de l'expression génique par une approche multi-omique dans deux modèles de mélanome uvéal agressif.

Mots clés : Mélanome Uveal, Analyse multi-omique, Instabilité génomique, Topologie de l'ADN, BAP1, PRAME.

Résumé : Le mélanome uvéal (UM) est un cancer rare résultant de la transformation des mélanocytes résidant dans le tractus uvéal et est associé à un très mauvais pronostic en situation métastatique. L'analyse intégrative, comprenant les altérations du nombre de copies, la méthylation de l'ADN, les mutations récurrentes et les profils d'expression génique, a identifié quatre sous-ensembles moléculaires et cliniques dans l'UM.

Pour améliorer notre compréhension de la tumorigenèse de l'UM, nous avons effectué une caractérisation multi-omique approfondie en comparant des populations de mélanocytes purs obtenues à partir de deux modèles agressifs de xénogreffes dérivées de patients UM (PDX) avec des mélanocytes choroïdiens normaux (NM). Notre étude aborde pour la première fois dans l'UM, la cartographie optique de l'ADN, l'analyse FISH multispectrale, les modifications spécifiques des marques d'histones et l'analyse de la topologie de l'ADN par Hi-C. Les comparaisons de profils d'expression génique entre les modèles d'UM agressif et les NM suggèrent que la dérégulation de la réparation de l'ADN est une

caractéristique de l'UM. De plus, des analyses cytogénétiques à haute résolution révèlent des signes d'instabilité génomique dans les échantillons d'UM.

Notre étude a également identifié une délétion avec des limites hyper méthylées dans le promoteur du gène *BAP1* qui se traduit par l'absence d'expression de ce gène dont l'inactivation est associée à un risque élevé de métastases chez les patients UM. Les études de topologie de l'ADN révèlent des compartiments stables avec des TAD contenant la majorité des gènes exprimés de manière différentielle. Il est important de noter que les modifications de la topologie de la chromatine sont associées à une régulation à la hausse de PRAME, un biomarqueur pronostique indépendant reconnu dans l'UM et une cible thérapeutique potentielle.

En conclusion, notre étude illustre comment les approches intégratives multi-omiques peuvent améliorer la compréhension de la tumorigenèse et révèle deux nouveaux mécanismes de dérégulation de l'expression génique dans l'UM.

Title : Gene expression regulation analysis by a multi-omics approach in two models of aggressive uveal melanoma.

Keywords : Uveal Melanoma, Multiomic Analysis, Genomic instability, DNA topology, BAP1, PRAME.

Abstract : Uveal melanoma (UM) is a rare cancer resulting from transformation of melanocytes residing in the uveal tract and is associated with a very poor outcome in the metastatic setting. Integrative analysis including copy number alterations, DNA methylation, recurrent mutations, and gene expression profiles, has identified four molecular and clinical subsets in UM.

To improve our understanding of UM tumorigenesis, we performed an extensive multi-omics characterization by comparing pure melanocyte populations obtained from two aggressive UM patient-derived xenograft models (PDX) with normal choroidal melanocytes (NM). Our study addresses for the first time in UM, optical DNA mapping, multispectral FISH analysis, specific modifications of histone marks and Hi-C analysis of DNA topology.

Comparisons of gene expression profiles between aggressive UM and NM models

suggest that deregulation of DNA repair is a hallmark of UM. In addition, high-resolution cytogenetic analyses reveal evidence of genomic instability in UM samples.

Our study also identified a deletion with hypermethylated boundaries in the BAP1 gene promoter that results in the absence of expression of this gene, the inactivation of which is associated with a high risk of metastasis in UM patients. DNA topology studies reveal stable compartments with TADs containing the majority of differentially expressed genes. Importantly, changes in chromatin topology are associated with upregulation of PRAME, a recognized independent prognostic biomarker in UM and a potential therapeutic target.

In conclusion, our study illustrates how multi-omics integrative approaches can improve the understanding of tumorigenesis and reveals two novel mechanisms of gene expression dysregulation in UM.

SOMMAIRE

Remerciements.....	5
Abréviations.....	8
Figures	10
Tables.....	12
Objectifs du travail doctoral	13
Introduction.....	15
Mélanome Uvéal.....	16
A. Les mélanocytes.....	16
1. Développement embryonnaire des mélanocytes	16
2. Fonction des mélanocytes	20
3. Mélanogenèse.....	21
4. Mélanocytes de l'uvée.....	24
B. Mélanomes.....	26
1. Aspects cliniques des mélanomes	26
2. Facteurs de risques des mélanomes	27
a. Facteurs de risques des mélanomes cutanés	27
b. Facteurs de risques des mélanomes de l'uvée.....	30
3. Prise en charge clinique des mélanomes uvéaux.....	31
4. Altérations somatiques génétiques et génomiques des mélanomes.....	32
a. Charges mutationnelle et signatures mutationnelles dans les mélanomes	33
b. Altérations génétiques des mélanomes cutanés.....	37
c. Altérations génétiques des mélanomes uvéaux.....	38
d. Altérations structurales du génome, et du nombre de copies des mélanomes de l'uvée	58
e. Signature transcriptomique pour la classification des UM.....	64
f. Classification moléculaire intégrative.....	66
5. Mélanome uvéal et intérêt du système immunitaire.....	72

C. Modèles d'études des mélanomes de l'uvée.....	75
Apport des analyses multi-omiques en cancérologie.....	85
A. Etapes de cancérogenèse.....	85
B. Gènes suppresseurs de cancer et gènes activateurs.....	86
C. Altérations génomiques de grande taille.....	87
D. Transcrits de fusion	89
E. Régulation de l'expression des gènes	92
1. Modulation de l'expression des gènes par la méthylation de l'ADN.....	92
2. Modulation de l'expression des gènes selon la présence de marques d'histones	96
a. Complexes Polycomb et Trithorax.....	98
b. H3K4me3	99
c. H3K9me3 et H3K27me3	102
d. H3K27Ac.....	104
3. Modulation de l'expression des gènes selon l'organisation de la chromatine	105
Résultats.....	111
Mise en place d'outils pour l'isolement de cellules tumorales	112
A. Mise au point d'anticorps spécifiques de cellules tumorales dérivées de mélanomes uvéaux.....	112
B. Isolement et préparation de cellules pour l'analyse moléculaire	125
C. Analyse génomique.....	127
D. Analyse transcriptomique	128
1. Identification de gènes dérégulés impliqués dans les voies Gαq, ou dans les voies de réparation de dommages de l'ADN.....	128
2. Caractérisations d'altérations génomiques et transcriptomiques nouvelles.	134
E. Analyse intégrative génomique, transcriptomique et épigénétique.....	140
1. Caractérisation des régions méthylées et identification de nouvelles altérations <i>BAP1</i>	140
2. Analyse de la topologie et gènes différentiellement exprimés.....	148
a. Analyse globale	148

b. Modifications épigénétiques associées à la surexpression de PRAME	152
Discussions et Perspectives.....	209
A. Développement d'anticorps spécifiques de marqueurs de surface présents sur les cellules de mélanomes de l'uvée.	210
B. Apport de l'analyse multi-omique dans la caractérisation de modèles de mélanome de l'uvée.	211
Bibliographie	225
Rapport de soutenance du Pr Stephane Le Crom, président du jury de thèse	285

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Dr Sergio Roman-Roman, pour m'avoir encouragé à mener un travail doctoral sur le mélanome de l'uvée. Sergio est mon responsable depuis 2007, il m'a confié en 2008 la responsabilité de la plateforme de génomique. Sa reconnaissance, les missions et les latitudes données, le dynamisme de la plateforme, m'ont permis de m'engager sereinement dans un travail doctoral, passant par le choix de la thématique et l'obtention de financements. Merci sincèrement Sergio pour ta confiance et ta patience.

Je tiens ensuite à remercier la Pr Edith Heard pour sa confiance et pour avoir co-encadré durant un an ce travail de thèse. Je lui suis sincèrement reconnaissant de m'avoir permis de suivre pendant une longue période les thématiques de son équipe et me permettre de choisir les aspects épigénétiques que je souhaitais investiguer dans le cadre de ma thèse sur le mélanome uvéal. Au-delà des aspects scientifiques de haut niveau d'Edith et de son équipe, je garderai en tête les valeurs éthiques et morales qu'Edith Heard cultive et essaime. Grâce à Edith Heard, j'ai pu me former chez Job Dekker à l'UMASS près de Boston, pour pouvoir mener l'analyse de la conformation de la chromatine sur nos modèles de mélanome uvéal. Je remercie également les membres de son équipe à l'Institut Curie pour leur aide et pour les réunions de journal club si précieuses pour apprendre et avoir un regard critique.

Je tiens à remercier également chaleureusement le Dr Fariba Némati sans qui je n'aurais pas pu démarrer ce travail de thèse. En effet grâce au Laboratoire d'Investigation Préclinique (LIP) dirigé par le Dr Didier Decaudin, et au travail de Fariba et de ses collaborateurs, un bon nombre de modèles animaux a été établi pour nous permettre de disposer de modèles de mélanomes de l'uvée. Je tiens également à remercier Fariba pour sa grande générosité, le temps qu'elle m'a accordé, ses conseils et son aide qui m'ont permis d'avancer.

Je tiens à remercier le Dr Pierre de la Grange avec qui je travaille depuis plus de 10 ans, qui m'a aidé à de très nombreuses reprises pour l'analyse de données, et qui m'a insufflé des pistes de réflexions intéressantes. Grâce à son aide, mon travail a pu avancer significativement, je le remercie également chaleureusement. Merci également à son équipe efficace et réactive, Ariane Jolly, Olivier Ariste et Wail Zeitouni.

Je tiens à remercier le Dr Joshua Waterfall pour l'aide apportée sur les analyses épigénétiques, ses conseils et son écoute, en français, en anglais. Merci Josh pour avoir repris la suite des analyses multiomiques entreprises avec Edith, pour tes conseils qui

ont contribué à mener à bien ce travail de thèse. Merci également pour avoir organisé ce travail avec Sergio. Merci également à Elnaz Saberi Ansari pour son aide durant la période où nous avons pu travailler ensemble.

Je remercie également le Dr Nicolas Servant, qui a terminé sa thèse quand je l'ai démarrée, et qui m'a aidé et soutenu dans ces analyses. J'aurais aimé que l'on puisse faire plus ensemble sur ces données, mais rien n'est terminé ! Bien que très sollicité, Nicolas a participé aux avancées de ces travaux, tout comme Aurélie Teissandier et Elodie Girard. Merci à vous.

Je tiens évidemment à remercier mon équipe qui œuvre pour la plateforme de génomique et en particulier Audrey Rapinat, Cécile Reyes, Emilie Henry, Laure Villoing Gaudé, Matéo Bazire, Thomas Chenegros, Dominique Gallier, Amber Anirah mais également Angéline Duché, Caroline Hego Garnier et Aude Vieillefon qui ont quitté le labo depuis le début de cette aventure. Nous travaillons ou avons travaillé ensemble depuis de nombreuses années, et il m'a été très important et précieux de bénéficier de leur soutien, de leur bonne humeur, de leur aide sans faille et de leurs conseils. Je sais également qu'ensemble nous avons traversé des périodes parfois difficiles car tendues du fait de l'activité et des responsabilités liées à la plateforme, en parallèles de ma thèse. Merci Audrey pour ton assistance sans faille, ton aide m'a permis d'avancer sereinement pour mener ces travaux de thèse ! Un grand merci à chacune de ces personnes qui me sont chères.

Parmi les collègues qui m'ont apporté une aide dans ce travail, je tiens tout d'abord à remercier les collègues du groupe mélanome uvéal de l'Institut Curie : la Pr Nathalie Cassoux, chirurgienne, la Dr Sophie Piperno-Neumann et le Dr Manuel Rodrigues, oncologues, les pathologistes la Dr Sophie Garda et la Dr Anne Vincent Salomon, la Dr Gaëlle Pierron, biologiste. Pour les aspects scientifiques, je tiens à remercier le Dr Marc Henri Stern, la Dr Céline Vallot, la Dr Samar Alsafadi, le Dr Thierry Dubois, et leurs équipes. Par ailleurs, des collègues qui m'ont apporté des coups de mains, je remercie en particulier Virginie Maire de l'équipe de Thierry, pour sa générosité, son temps, son aide, ses conseils et sa patience en particulier pour la culture cellulaire et les western blots. Je remercie également Malcy Tarin, Estelle Fritz-dit-Leitz, de l'équipe de Samar pour leurs aides ponctuelles en culture, et Samar pour les discussions passionnantes, ses conseils, et son soutien sur ce travail. Je tiens également à remercier les collègues qui m'ont aidé par leurs encouragements, leurs conseils et leur bienveillance : le Pr Simon Saule, la Dr Nathalie Blin, le Dr Arturo Londono, le Pr Pierre Verrelle, le Dr Francois Radvanyi, le Dr Chunlong Chen, le Pr Philippe Vielh, et le Dr Georg Haase.

Je remercie également les collègues des plateformes d'anticorps recombinants : le Dr Ronan Crépin, le Dr Ario Di Marco, la Dr Sandrine Moutel, des plateformes de

cytométrie de l'Institut Curie et de l'hôpital Saint Louis à Paris, la plateforme PathExp ainsi que la plateforme de séquençage et de bio-informatique de l'Institut Curie.

Il est évident que démarrer une thèse à 38 ans pour quelqu'un qui n'a pas suivi une filière universitaire est un challenge. Je n'aurais pas pris cette décision sans le soutien, les encouragements et la patience de mon épouse, Sandrine, et de mes enfants Romain et Flavie. Je les remercie chaleureusement pour ce qu'ils m'ont donné. Charge à moi, de leur rendre maintenant. Je remercie également ma famille, ma belle-famille, et mes amis qui ont suivi cette thèse. Je tiens à remercier sincèrement, Sylvain et Maryline Guillebaud, Catherine et Dominique Brignone pour leur bienveillance, leurs encouragements sans faille! Mille mercis également à eux.

Merci également à celles et ceux que je n'ai pu citer mais qui m'ont permis de grandir au sein de l'Institut Curie depuis 1999, et à celles et ceux qui m'ont servi de modèles.

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble du jury d'avoir participé à l'examen de mon travail de thèse. Je remercie sincèrement la Dr Sabine Colnot et le Dr Robert Ballotti d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et la Dr Laila el Khattabi et le Pr Stéphane Le Crom d'en avoir été les examinateurs. Merci à chacun de vous pour votre implication et vos conseils que je m'efforcerai d'appliquer dans le futur.

ABREVIATIONS

ACP/PCA : Analyse en composante principale / Principal component analysis

BAP1 : BRCA1 Associated Protein 1

bFGF/ FGF2 : Fibroblast growth factor 2

bp : paire de base

BRCA1 : Breast Cancer Associated protein 1

CEACAM1 : Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Related Cell Adhesion Molecule 1

CHD1/CHD2 : Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1/2

ChIPseq : Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing

DMR : Differentially methylated region

EMT : Epithelial Mesenchymal Transition

ESI-05 : EPAC2 – Specific Inhibitor 05

EZH2 : Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting

FISH : Fluorescent *in situ* Hybridization

FPKM : Fragments Per Kilobase Million

GPAT4 : Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 4

Hi-C / Hi-Cseq : High throughput Chromosome Conformation Capture

IBMX : 3-Isobutyl-1-methylxanthine, inhibiteur de l'AMPc

IHC : Immunohistochimie

ICGC : International Cancer Genome Consortium

IGV : Integrative Genomics Viewer

LOH : Loss Of Heterozygosity

Mb : Megabase

NCOA7 : Nuclear Receptor Coactivator 7

NM : Normal Melanocytes, Melanocytes normaux

PDX : Patient derived xenograft

POMK : Protein O-Mannose Kinase

PLCB4 : Phospholipase C β -4

PRAME : PReferentially expressed Antigen in MElanoma

PRC1/PRC2 : Complexe Polycomb Repressif de type 1/2

RAD21 : RAD21 cohesin complex component

RAPGEF4/EPAC2 : Rap guanine nucleotide exchange factor 4 / Exchange Protein directly Activated by CAMP 2

RASGRP3 : RAS Guanyl Releasing Protein 3

RPE1 : hTERT-immortalized Retinal Pigment epithelial cells

RSPO3 : R-Spondin 3

SF3B1 : Splicing Factor 3b Subunit 1

siRNA : small interfering RNAs

SMC3 : Structural Maintenance Of Chromosomes 3

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SNV : Single Nucleotide Variant

STR: Short Tandem Repeat

TAD : Topological Associated Domains, domaines topologiques d'interactions.

TCGA : The Cancer Genome Atlas

TES : Transcription end site

TSS : Transcription start site

UM : Uveal Melanoma, Mélanome uvéal

VHH : Fragment Variable de chaines lourdes, nanobodies

ZNF280A / ZNF280B : Zinc Finger Protein 280A/B, Suppressor Of Hairy Wing Homolog 1/2

FIGURES

Figure 1: Illustration des étapes de la formation des cellules de la crête neurale.....	17
Figure 2: Schéma d'activation menant au mélanocyte différencié.....	19
Figure 3: Schéma des étapes enzymatiques conduisant à la formation de mélanine..	22
Figure 4: Mélanocytes et mélanosomes.....	24
Figure 5: Structure du globe oculaire.....	25
Figure 6: Prévalence des mutations germinales à haut risque de mélanome cutané..	28
Figure 7: Taux de mutation par megabase dans les mélanomes cutanés.	34
Figure 8: Caractéristiques des mutations identifiées par séquençage massif associées au mélanome cutané.....	35
Figure 9 : Caractérisations de la charge mutationnelle des mélanomes de l'uvéa et de la proportion de mutations observées.	36
Figure 10: Gènes mutés et voies de signalisation altérées dans le mélanome cutané.	38
Figure 11: Mutation des gènes de la voie $G\alpha q$ et activation de voies de signalisations.	41
Figure 12: Fonctions de <i>BAP1</i>	46
Figure 13: Mutations de <i>BAP1</i>	47
Figure 14: Détection de mutation dans le gène <i>BAP1</i> vs présence de <i>BAP1</i> dans le noyau.	48
Figure 15: Détection de mutations dans la machinerie d'épissage et mutations observées dans les myélodysplasies.....	50
Figure 16: Fréquence de mutation de <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>U2AF1</i> et <i>ZRSR2</i> dans les hémopathies et tumeurs solides.....	51
Figure 17: Rôle de <i>EIF1AX</i> dans l'initiation de la traduction.....	53
Figure 18: Répartition des principales mutations identifiées dans <i>EIF1AX</i>	54
Figure 19: Courbe de survie selon la présence d'altérations de <i>BAP1</i> , <i>SF3B1</i> et <i>EIF1AX</i>	55
Figure 20: Répartition des mutations <i>MBD4</i>	56
Figure 21: Charge mutationnelle des mélanomes uvéaux selon la présence de mutation de <i>MBD4</i>	57
Figure 22: Cycle cellulaire et perturbations donnant lieu à une instabilité génomique.	59
Figure 23: Altérations et signatures génomiques dans le mélanome uvéal.	63
Figure 24: Altérations somatiques associées significativement aux différents sous-groupes d'UM.....	64
Figure 25: 4 Classes moléculaires identifiées quel que soit le niveau d'analyse du TCGA UM.....	67

Figure 26: Analyse intégrative UM TCGA.....	69
Figure 27: Possibilité d'analyses multiples à partir de données transcriptomiques de cellules uniques.....	71
Figure 28: Essais cliniques basés sur une thérapie cellulaire anti PRAME.....	74
Figure 29: Caractéristiques de modèles cellulaires de mélanomes.....	76
Figure 30: Comparaison des caractéristiques de tumeurs primaires et les modèles établis de mélanomes uvéaux.....	77
Figure 31: Possibilité d'analyses de modèles d'études précliniques de cancers.....	78
Figure 32: Caractéristiques de modèles de mélanomes uvéaux mis en place à l'Institut Curie.....	80
Figure 33: Caractéristiques de modèles cellulaires dérivés de PDX mis en place à l'Institut Curie.....	81
Figure 34: Schéma d'activation de la voie YAP suite à l'activation de $G\alpha_q$	83
Figure 35: Classification de variants structuraux.....	88
Figure 36: ARN de fusion et réarrangements interchromosomiques.....	92
Figure 37: Schéma d'un nucléosome.....	97
Figure 38: Principales enzymes impliquées dans la méthylation des lysines des protéines d'histones.....	99
Figure 39: Localisation des marques d'histones méthylées et des enzymes impliquées dans leur méthylation.....	101
Figure 40: Schéma d'organisation de la chromatine à différentes échelles.....	108
Figure 41: Profils génomiques des modèles MP41 et MP46 établis par puces Affymetrix Cytoscan HD.....	126
Figure 42: Analyse des transcriptomes de MP41, MP46 et NM par RNAseq.....	128
Figure 43: Schéma de ciblage de RAPGEF4 par siRNA.....	130
Figure 44: Enrichissement des cancers testis antigens dans l'analyse transcriptomique entre MP41, MP46 vs NM.....	131
Figure 45: Dérégulation de la voie de la recombinaison homologue entre MP41 et MP46 vs NM.....	133
Figure 46: Principales altérations structurales identifiées par cartographie optique dans les modèles MP41 et MP46.....	134
Figure 47: Evaluation de l'instabilité télomérique dans les modèles MP41 et MP46.....	137
Figure 48: Exemple d'un variant structural (insertion, duplication) identifié dans MP41, associé à l'expression d'un transcrit de fusion MAPKAPK5-ACAD10.....	138
Figure 49: Complexité et hétérogénéité de variants structuraux présents dans MP41 impliquant les chromosomes 6 et 8.....	139
Figure 50: Schéma d'identification de 5mC.....	141
Figure 51: Analyse globale des régions méthylées et régulées entre MP41, MP46 et NM.....	143

Figure 52: Caractérisation du promoteur de <i>BAP1</i>	145
Figure 53: Identification de mutations <i>BAP1</i> par une approche de séquençage d'amplicons.....	147
Figure 54: Cartes de contacts obtenues pour NM, MP41 et MP46.....	149
Figure 55: Analyse des compartiments et TAD identifiés dans NM, MP41 et MP46..	151
Figure 56: Activation de <i>PRAME</i> au niveau transcriptionnel et hypo-méthylation de son promoteur dans MP41 et MP46.....	153
Figure 57: Modification de la topologie et des marques d'histones au niveau de <i>PRAME</i> et <i>ZNF280A/B</i>	155
Figure 58: Facteurs de transcription identifiés comme facteurs de transcription de <i>PRAME-ZNF280A</i> via Encode.....	157
Figure 59: Détection d'altérations de <i>BAP1</i> par séquençage ciblé.....	216
Figure 60: Complexité des contacts et des réarrangements dans MP41.....	219
Figure 61: Recherche de gènes régulés selon l'expression de <i>PRAME</i>	223
Figure 62: Conclusions et perspectives de l'analyse intégrative visant à identifier les régulations transcriptionnelles dans le mélanome uvéal.....	224

TABLES

Table 1: Cellules dérivées de la crête neurale	18
Table 2: Altérations identifiées par M-FISH.....	135
Table 3: Transcrits de fusion identifiés par RNAseq.....	136

OBJECTIFS DU TRAVAIL DOCTORAL

Le mélanome de l'uvée (UM) résulte de la transformation des mélanocytes qui résident dans le tractus uvéal qui comprend la choroïde, l'iris et le corps ciliaire (Pandiani et al. 2017). Lors des 3 dernières décennies, les recherches menées sur les mélanomes de l'uvée ont conduit à de nombreuses avancées permettant une amélioration de la prise en charge des patients par le diagnostic moléculaire de ces cancers (Robertson, Shih, et al. 2017), et l'évaluation de thérapies innovantes dans plusieurs essais cliniques. Néanmoins à ce jour, et bien que le traitement de la tumeur initiale par radiothérapie et/ou chirurgie permet un bon contrôle de la maladie, la moitié des mélanomes uvéaux vont donner lieu à des métastases principalement hépatiques qui restent associées à un diagnostic sombre.

La caractérisation d'une série d'UM par le consortium TCGA (exome, aberrations chromosomiques, transcriptome et méthylome) a mis en évidence 4 groupes moléculaires associés à différents pronostics (Robertson, Shih, et al. 2017), reposant principalement sur la présence d'anomalies chromosomiques spécifiques connues (monosomie du chromosome 3, gain du bras court du chromosome 6, gain du bras long du chromosome 8 (Trolet et al. 2009; Cassoux et al. 2014), la présence de mutations de la voie Gαq, et la présence de mutations mutuellement exclusives des gènes tels que *BAP1*, *SF3B1* et *EIF1AX* (*BSE*) (Royer-Bertrand et al. 2016). Environ 20% des mélanomes de l'uvée ne présentent pas de mutation dans ces gènes clés tels que *BAP1*, *SF3B1* ou *EIF1AX*, et il est nécessaire de poursuivre les caractérisations pour mieux comprendre l'oncogenèse de ces cancers. Enfin, l'inactivation bi-allélique du gène *BAP1* dans les mélanomes de l'uvée identifiée en 2010 (Harbour et al. 2010) et plus précisément les fonctions du gène *BAP1*, nous ont conduit à engager des analyses épigénétiques. En effet, *BAP1* est une déubiquitineuse qui joue un rôle dans le complexe Polycomb et régule l'ubiquitination des histones, et *in fine* la compaction de la chromatine. Certains mélanomes de l'uvée à haut risque métastatique avec des anomalies récurrentes tels que la perte du chromosome 3 et le gain du bras long du chromosome 8 sont dépourvus de mutations de *BAP1*. Bien qu'un bon nombre de gènes semblent dérégulés au niveau transcriptionnel, et que plusieurs voies aient été proposées comme pertinentes, nous avons entrepris de tester si une analyse intégrative à large échelle pouvait nous apporter des éléments nouveaux dans la compréhension des mécanismes de l'oncogenèse de mélanomes de l'uvée agressifs. C'est dans ce contexte que ce travail de thèse vise à caractériser plusieurs niveaux de régulations de l'expression des gènes.

Nous avons ainsi décidé de mener une étude multi-omique sur deux modèles de mélanome uvéal agressif, l'un exprimant BAP1 et l'autre déficient en BAP1. Des cultures primaires de mélanocytes uvéaux normaux ont été analysées comme tissu contrôle. Les modèles étudiés correspondent à des tumeurs obtenues par greffe d'échantillons humains chez la souris immunodéficiente (Patient-derived xenografts ou PDXs).

Le développement de modèles animaux, et en particulier de xénogreffes de mélanomes de l'uvée humains chez des souris a montré l'intérêt de ces outils pour étudier les mélanomes uvéaux agressifs (C. Laurent et al. 2013; Amirouchene-Angelozzi et al. 2015). Pour mon travail de thèse, nous avons sélectionné deux modèles PDX développés à partir d'échantillons de patients qui sont décédés de leur maladie dont un dépourvu de mutations génétiques de type BSE (modèle MP41) et l'autre présentant une déficience de BAP1 (modèle MP46). Par ailleurs, l'usage de mélanocytes normaux de la choroïde humaine maintenus en culture nous a permis de conduire l'analyse de manière unique et originale.

L'analyse intégrative multi-omique menée pour ce travail de thèse, a consisté à caractériser puis à comparer 1- les altérations génomiques, 2-l'organisation tridimensionnelle du génome connue comme régulant l'activité transcriptionnelle (Dixon et al. 2012; S. S. P. Rao et al. 2014), 3- la méthylation de l'ADN et 4 -le positionnement de marques épigénétiques activatrices ou inhibitrices de l'activité transcriptionnelle selon les régulations transcriptionnelles observées entre des cellules normales de choroïde et des cellules tumorales fraîchement isolées de modèles agressifs de mélanome de l'uvée.

La mise en place d'outils pour l'isolement de cellules tumorales ainsi que d'outils d'analyse de l'organisation tridimensionnelle de l'ADN ont constitué des étapes importantes dans l'avancée de ces travaux.

INTRODUCTION

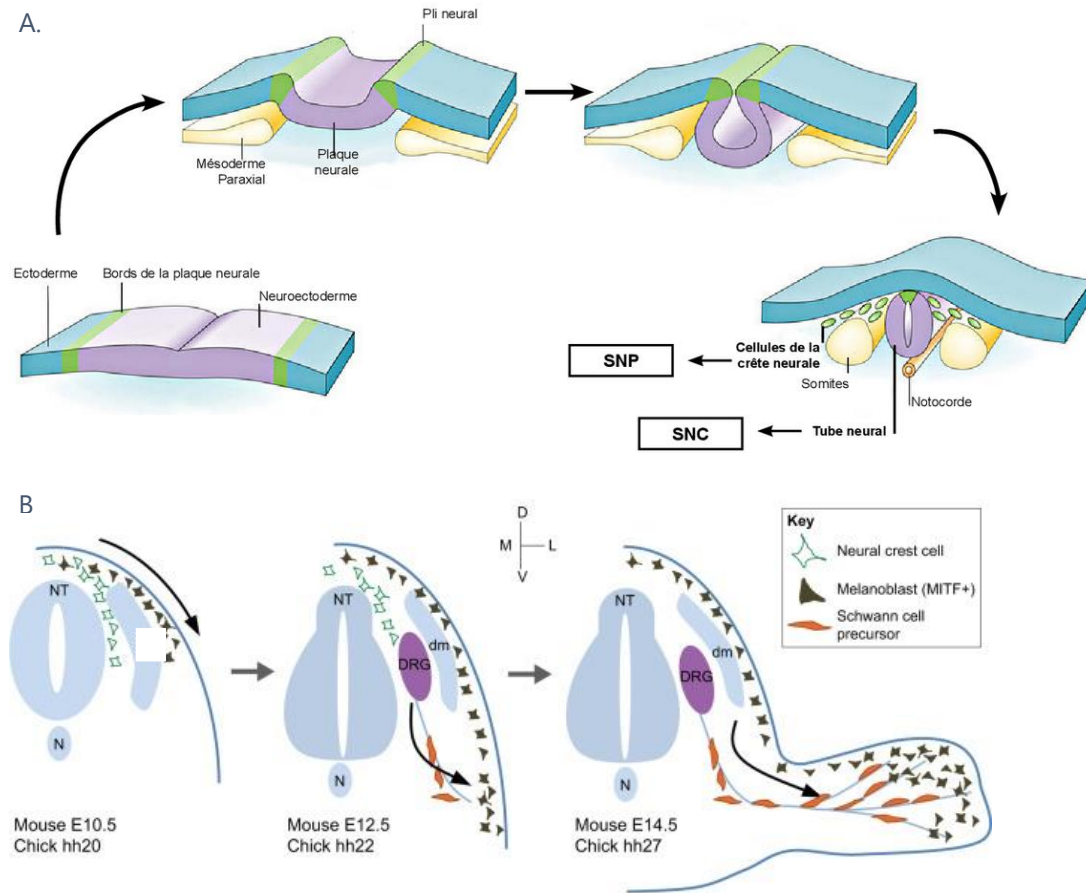
A. LES MELANOCYTES

1. Développement embryonnaire des mélanocytes

Les mélanocytes ont pour origine embryonnaire les cellules transitoires de la crête neurale. Après l'étape de la gastrulation, étape donnant lieu aux différents feuillets embryonnaires, et après la formation du neuroectoderme dans la partie dorsale de l'embryon, ce feuillet se replie et les cellules à la surface de la crête neurale se différencient sous l'induction du notochorde durant la phase de neurulation (Figure 1) (Cichorek, Wachulska, et Stasiewicz 2013; O'Rahilly et Müller 2007; Harris et Erickson 2007). La différenciation du neuroectoderme donne le tube neural, futur système nerveux central, et les cellules de la crête neurale, de par leur localisation, se différencient d'un phénotype de cellule neuro-épithéliale à un phénotype mésenchymateux faisant alors partie de l'ectoderme (4^e semaine *in utero*, pour l'embryon humain). Les cellules de la crête neurale sont caractérisées par l'expression de facteurs de transcription comme Snail2 (Slug), Sox10, FoxD3, Sox9 leur permettant de réaliser la transition épithelio-mésenchymateuse, de quitter le tube neural, de migrer et de se différencier (Bronner et LeDouarin 2012; Thiery et al. 2009).

Figure 1: Illustration des étapes de la formation des cellules de la crête neurale.

Extrait de Mort R. et al. 2015



A) Etapes de la neurulation durant laquelle la plaque neurale se replie et donne naissance au tube neural, et les cellules transitoires pluripotentes de la crête neurale initient leur migration (extrait de la thèse d'Alexandre Jourdon, 2015). B) les cellules de la crête neurale migrent selon deux axes : dorso-latéral donnant naissance au précurseur de mélanoblastes, dorso-ventral, poursuivant leur différenciation et donnant naissance aux précurseurs de cellules de Schwann et mélanocytes.

Selon la localisation des cellules de crêtes neurales et durant leur migration sur l'axe antéro-postérieur et selon les molécules de la matrice extracellulaire présentes, certaines voies de signalisation seront activées, donnant lieu à des cellules gliales, des neurones, des cellules mésenchymateuses et des mélanocytes (Etchevers, Dupin, et Le Douarin 2018; J. Y. Lin et Fisher 2007; D'Mello et al. 2016; Scholl et al. 2001; S.-J. He et al. 2005) (Table 1). L'apparition et la différenciation des mélanoblastes humains, précurseurs des mélanocytes restent à préciser. Pax3 joue un rôle crucial dans le développement des cellules de la crête neurale en régulant la transition des mélanoblastes vers les mélanocytes matures (Scholl et al. 2001; S.-J. He et al. 2005; Boudjadi et al. 2018). La régulation transcriptionnelle de SOX10 comme SOX9 jouent

un rôle important dans la différenciation des neurones en mélanoblastes puis en mélanocytes (Greenhill et al. 2011).

Table 1: Cellules dérivées de la crête neurale

(extrait de la revue Etchevers H, Dupin E, Le Douarin, 2019).

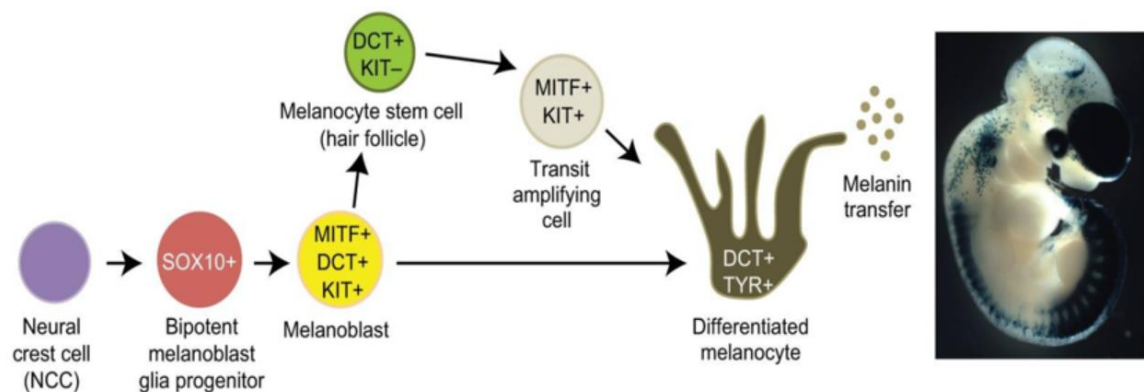
	Cell types			
	Neurons and Glial cells	Pigment cells	Endocrine cells	Mesenchymal cells
Cephalic neural crest	Sensory cranial ganglionic neurons Parasympathetic (eg., ciliary) ganglionic neurons Schwann cells along PNS nerves Satellite glial cells in PNS ganglia Enteric lia Olfactory ensheathing cells	Skin melanocytes Inner ear and choroid melanocytes Other extra-cutaneous melanocytes (ingums, meninges, heart...)	Carotid body glomus cells Calcitonin-producing cells of the ultimobranchial body	Cranio-facial skeleton: Dermal bone osteocytes Endochondral osteocytes Chondrocytes Other mesectodermal head and neck derivatives: Odontoblasts, cells of periodontal ligament and tooth papillae Connective cells of glands, muscle and tendons, Facial demris and adipocytes Myofibroblasts, smooth muscle cells and pericytes (cardiac outflow tract and pharyngeal arch-derived blood vessels) Meninges (forebrain) Cornea endothelial and stroma cells Ciliary muscles /anterior segment of the eye
Trunk neural crest	Sensory (dorsal root) ganglionic neurons Sympathetic ganglionic neurons Parasympathetic ganglionic neurons Satellite glial cells in PNS ganglia	Skin melanocytes	Adrenal medullary cells	

	Schwann cells along PNS nerves			
--	-----------------------------------	--	--	--

La transcription de *MITF* (microphthalmia-associated transcription factor) induite par PAX3/SOX10 permet aux mélanoblastes de proliférer et de migrer entre le dermomyotome et l'ectoderme selon un axe dorso latéral. *DCT* (*TYRP2*) et *cKIT* sont alors spécifiquement exprimés dans les mélanoblastes (Figure 2) et permettront la migration.

Figure 2: Schéma d'activation menant au mélanocyte différencié.

Extracted from Mort et al, 2015.



Chez les mammifères, les mélanoblastes dérivent de cellules de la crête neurale (CCN) par l'intermédiaire de progéniteurs gliaux SOX10-positif ou mélanoblastes bipotents. L'expression de SOX10 reste activée dans ces deux lignées. Les mélanoblastes se spécialisent ensuite et acquièrent l'expression de MITF, DCT et KIT. Après avoir colonisé les follicules pileux embryonnaires en développement, certains mélanoblastes se différencient en mélanocytes et produisent la mélanine comme pigment qui colore le premier cycle pileux. Un sous-ensemble de mélanoblastes se dédifférencie (en perdant l'expression de MITF et KIT mais pas celle de DCT) pour former des cellules souches mélanocytaires dans le renflement du follicule pileux, qui renouvelle les mélanocytes différenciés par l'intermédiaire d'une cellule de transit, rapidement amplifiée dans les cycles pileux suivants. L'image à l'extrême droite est celle d'un embryon de souris transgénique exprimant lacZ sous le contrôle du promoteur des mélanoblastes Dct. La coloration X-Gal révèle des mélanoblastes colorés en bleu, en particulier ceux migrant de la crête neurale cervicale et dans la tête. Le télencéphale, les ganglions de la racine dorsale (DRG) et l'épithélium pigmenté de la rétine de l'œil sont également colorés.

Le récepteur de type B à l'endothéline (*ENDRB*, récepteur associé au protéine G) et son ligand l'endothéline 3 sont nécessaires pour la migration des mélanocytes (H.-O. Lee, Levorse, et Shin 2003; Shin et al. 1999). Les récepteurs tels que les *ephrin receptors* (EpHR), l'*endothelin receptor* EdnRB2, le récepteur tyrosine kynase cKit, ainsi que les co-récepteurs de Wnt Frizzleds sont nécessaires à la différenciation des mélanocytes (H.-

O. Lee, Levorse, et Shin 2003; Hirobe 2011; Cooper et Raible 2009; Sommer 2011; Hari et al. 2012; Geissler, Ryan, et Housman 1988; Parichy et al. 1999).

Les interactions entre les progéniteurs de mélanocytes avec les cellules environnantes, en particulier dans l'œil, restent très peu décrites. Les échanges conduisant à la maturation des mélanocytes dans l'épiderme et le derme montrent qu'un sous ensemble de cellules souches mélanocytaires reste présente dans les follicules pileux chez la souris, ou dans la couche basale l'épiderme chez l'humain (Toma et al. 2005; Gleason, Crum, et Murphy 2008; Davids et al. 2009; Mull, Zolekar, et Wang 2015).

Les mutations dans les gènes clés de la différenciation des cellules de la crête neurale en mélanocytes (*PAX3*, *SOX10*, *MITF*), ont mis en évidence des défauts de pigmentations sévères (comme par exemple dans les syndromes de Waardenburg Hirschsprung, (S. Huang et al. 2021)).

2. Fonction des mélanocytes

La principale étape dans la différenciation des mélanocytes est l'activation de la mélanogénèse conduisant à la formation de mélanosomes : vésicules cytoplasmiques contenant de la mélanine. Les mélanosomes s'apparentent aux organites de type lysosomes (« lysosomes related organelles », LROs) du fait de leur composition en enzymes qui jouent un rôle dans la maturation des mélanosomes. Les mélanosomes servent de cargo entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique des mélanocytes. Les mélanosomes sont ensuite accumulés dans les dendrites des mélanocytes, puis transférées aux kératinocytes de l'épiderme où ils jouent un rôle photo-protecteur. Un mélanocyte de l'épiderme, peut contacter environ quarante kératinocytes grâce à ses projections dendritiques (Fitzpatrick et Breathnach 1963).

Hormis le fait que les mélanocytes produisent de la mélanine, elles sont également des cellules immunocompétentes comme cellules présentatrices d'antigènes (Lu et al. 2002; Le Poole et al. 1993) (expression de *CD40*), et jouent un rôle d'immuno-modulateurs par la sécrétion de cytokines. Les mélanocytes sécrètent également une série de neurotransmetteurs et d'hormones (Slominski 2009). Ces fonctions ont été montrées soit dans des modèles *in vitro*, soit *in vivo* pour des mélanocytes cutanés. Des défauts de ces fonctions ont été identifiés dans des pathologies telles que le vitiligo, ou la surdité. Néanmoins les fonctions des mélanocytes de l'uvée, des méninges, de l'oreille interne, ou du muscle cardiaque restent à approfondir. Les mélanocytes de la cochlée sont impliqués dans l'ouïe et dans l'équilibre (Tachibana 1999). Les mélanocytes des méninges sont associés aux fonctions neuroendocriniennes

et de réponse au stress oxydatif (Zecca et al. 2008). Les mélanocytes du muscle cardiaque sont impliqués dans l'arythmie et de fibrillation atriale (via DCT, (Levin et al. 2009)). Les mélanocytes oculaires restent quiescents et en contact du tissu environnant composé de fibroblastes, de cellules endothéliales, de cellules musculaires, de neurones. La localisation des mélanocytes dans la face antérieure de l'iris exposée à la lumière aux radiations UV a un effet photo-protecteur sur les cellules rétinienne pigmentées (RPE), en revanche cet effet est probablement moins important dans les cellules postérieures, de la choroïde (Hu, Simon, et Sarna 2008). Les autres fonctions associées aux mélanocytes et à la mélanine sont de bloquer les ions métal et ROS (Hu, Simon, et Sarna 2008; Hu 2005). Du fait de la vascularisation importante de la choroïde, les mélanocytes protègent du stress oxydatif (Weidmann et al. 2017). Il a également été rapporté que les cellules pigmentées de l'œil constituaient un réservoir ionique (Ca^{2+} , (van der Werf, Baljet, et Otto 1992)).

3. Mélanogenèse

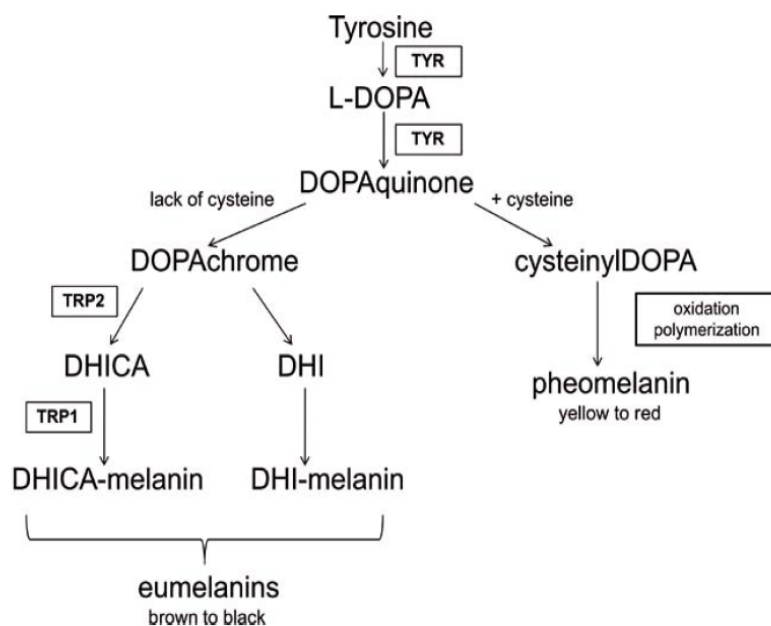
La synthèse de mélanine est associée à l'étape finale de maturation des mélanocytes et intervient dans les mélanosomes. Deux types de mélanines peuvent être produits : l'eumélanine (pigments marron-noir), phéomélanine (jaune-rouge) (Figure 3). Un même mélanocyte peut produire à la fois de l'eumélanine et de la phéomélanine dans des mélanosomes différents. Le ratio d'eumélanine et phéomélanine définit la couleur des cheveux, de la peau ou des yeux, ainsi que la protection aux UV, les propriétés anti-oxydantes ou le stockage en ions. La synthèse de mélanine est un processus enzymatique en 4 phases distinctes, associant des réactions enzymatiques et recourt à des protéines de structure nécessaires à l'échafaudage des mélanosomes et leur trafficking intracellulaire.

La première étape de synthèse de mélanine consiste en l'hydroxylation de la tyrosine par la tyrosinase (TYR) donnant lieu à la 3-4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) puis son oxydation en Dopaquinone. Selon la présence ou non de L-cystéine, la dopaquinone sera transformée en 3 ou 5 -cystinyl DOPA qui après oxydation et polymérisation donnera lieu à la phéomélanine. En absence de L-cystéine, la Dopaquinone sera rapidement transformée en dopachrome. La présence de DCT (Dopachrome tautomérase, ou précédemment Tyrosinase-related protein 2, TRP-2/TYRP2) et TYRP1 (Tyrosinase Related Protein 1) aboutira à la formation de DHICA mélanine (marron clair). En l'absence de TRP2/ion métal/TRP1, la dopachrome sera décarboxylée (DHI), puis oxydée et polymérisée pour former la DHI-mélanine (noire/marron foncé).

La synthèse de mélanine dépend d'une cascade initiée par l'hormone α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone ou mélanocortine) produite par les kératinocytes voisins, par les mélanocytes eux-mêmes. Les UV activent la production d' α -MSH (Nhu T. et David E. 2019). L' α -MSH active le récepteur au mélanocortine de type 1 (MC1R, melanocortin-1-receptor) à la surface membranaire des mélanocytes. MC1R, est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G. La liaison du récepteur MC1R à son ligand, active l'adenyl cyclase, induisant la production d'AMP cyclique ce qui conduit à la phosphorylation de CREB (cAMP responsive-element-binding proteins). Cette voie induit l'expression de *MITF*, facteur de transcription qui joue un rôle clé dans la pigmentation, la survie, et la différenciation de mélanocytes (Herraiz et al. 2017). Les tyrosinase related proteins 1 et 2 (TYRP1 et TRP2/DCT) sont activées, ainsi que PMEL (pre melanosome protein 1, une glycoprotéine de 100kDa, gp100), nécessaire à la formation des pré-mélanosomes. L'adrenocorticotrop hormone (ACTH) est un agoniste de MC1R, dont l'interaction conduit à l'élévation d'AMPc et la production d'eumélanine.

Figure 3: Schéma des étapes enzymatiques conduisant à la formation de mélanine.

Extrait de Cichorek et al. 2013.



La synthèse de mélanine donnant lieu à des agents cytotoxiques (quinones), se déroule dans une structure close, le mélanosome. La synthèse de mélanosome se déroule en 4 étapes et varie selon la mélanine produite. Les phases précoces I et II se distinguent

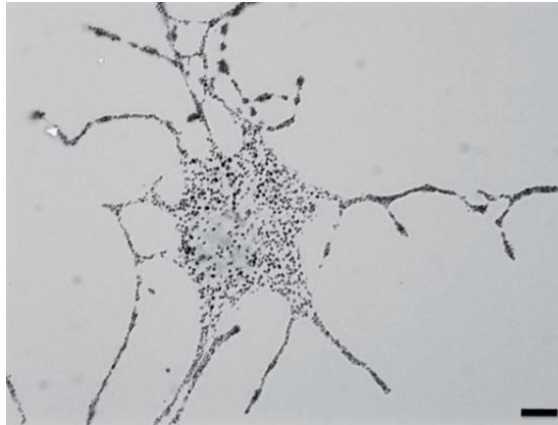
des étapes tardives III et IV (Figure 4) (Hurbain et al. 2008). La première phase de maturation des mélanosomes est associée à l'utilisation de vésicule sphéroïde creuse provenant du recyclage d'un endosome issu de la membrane cytoplasmique par endocytose. La glycoprotéine transmembranaire PMEL17 associée à la membrane est clivée par plusieurs enzymes. La maturation du mélanosome de stade I en stade II s'accompagne de l'accumulation progressive de ces fibres intraluminales (G. Raposo et al. 2001; Graça Raposo et Marks 2007). La phase II est caractérisée par la présence de matrice fibrillaire composée des glycoprotéines PMEL17, MART-1, et de tyrosinase. Une fois clivé PMEL17 se polymérise pour former des feuillets amyloïdes. Durant la phase III, la mélanine est produite et s'accumule dans le mélanosome. Les enzymes nécessaires à la synthèse de mélanine sont transportées via Adaptor Protein-1 (AP-1) (Theos et al. 2005). La phase IV est caractérisée par le fait que le mélanosome est rempli de mélanine. Les eumélanosomes et les phéomélanosomes ont des formes et tailles spécifiques. Les eumélanosomes sont larges, elliptiques et contiennent une matrice fibrillaire, alors que les phéomélanosomes sont petites, sphériques, associées à une matrice moins dense. Le trafic intracellulaire fait intervenir les kinesine-1 pour le transfert des mélanosomes vers les dendrites le long des microtubules. Les cellules pigmentées de l'œil (mélanocytes de la choroïde, du corps ciliaire, de l'iris, ainsi que les cellules pigmentées de la rétine ou RPE) sont en contact entre elles, et n'interagissent pas avec des kératinocytes, et ne transfèrent pas leurs mélanosomes. Les mélanocytes oculaires restent quiescents et en contact du tissu environnant composé de fibroblastes, de cellules endothéliales, de cellules musculaires, et de neurones (van der Werf, Baljet, et Otto 1992).

Des polymorphismes de *MC1R* ont été associés à des modulations d'activation de *MITF*. Des mutations perte de fonction dans les gènes clés comme la tyrosinase, *TRP1*, *TRP2*, *MITF*, mais également *PAX3*, *SOK10*, *KIT*, *EDN3*, *EDNRB* ont été identifiés dans le syndrome de Waardenburg-Shas (WS)- Hirschsprung où plusieurs phénotypes sévères sont associés et liés à des défauts de migration de cellules de la crête neurale et de différenciation des mélanoblastes et mélanocytes et des défauts de pigmentation (yeux clairs, polioses, albinisme, surdité). Des mutations gains de fonctions sur *KIT* (dont la voie de signalisation active *MITF*) ont été identifiées dans les mélanomes de la peau (Phung et al. 2017).

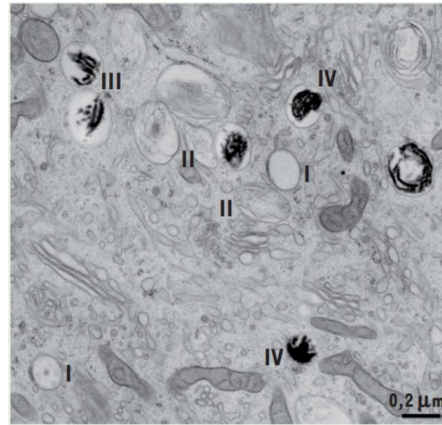
Figure 4: Mélanocytes et mélanosomes.

Extrait de Hurbain et al. 2008.

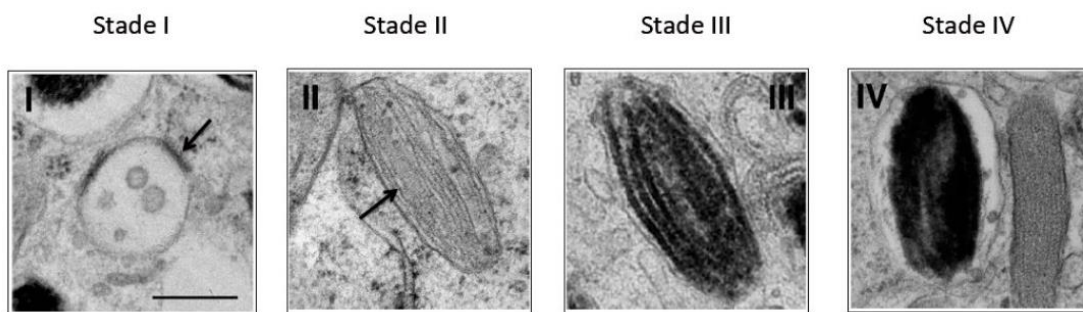
A.



B.



C.

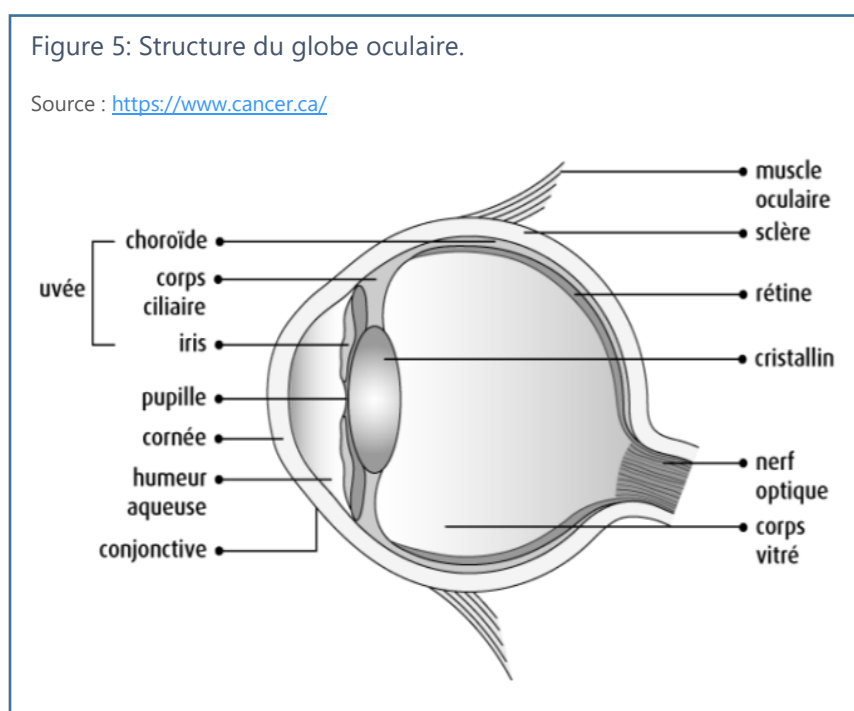


A) Les mélanocytes isolés, observés en microscopie optique présentent de nombreuses extensions cellulaires (dendrites) où s'accumulent les mélanosomes. B) les observations faites par microscopie électronique dans le cytoplasme des mélanocytes (droite) révèlent non seulement des mélanosomes noirs contenant la mélanine (mélanosomes matures **IV**), mais également des organites non pigmentés (pré-mélanosomes, compartiments précurseurs des mélanosomes : **I-II**). Les dépôts de mélanine, noirs en raison de leur densité électronique, sont visibles dans les mélanosomes de stades III et IV. Échelle microscopie optique : 10 µm. Échelle microscopie électronique : 0,2 µm. C) Les mélanosomes de stade I se caractérisent par la présence de vésicules intra-luminales et de manteau de clathrine (flèche noire) ; les mélanosomes de stade II sont caractérisés par la présence de fibres (flèche noire) ; les mélanosomes de stades III et IV sont caractérisés par le dépôt de mélanine sur ces fibres.

4. Mélanocytes de l'uvée

Le globe oculaire est constitué de trois couches concentriques : à l'extérieur la sclère et la cornée constituent une première enveloppe fibreuse, ensuite l'uvée constitue la seconde enveloppe et la rétine tapisse la face antérieure de l'œil (Figure 5).

Les cellules pigmentées sont présentes dans le tissu rétinien, où les cellules pigmentées de la rétine forment un épithélium (RPE : Retinal Pigment Epithelium) au contact des cellules photosensibles. Les mélanosomes des cellules pigmentées de la rétine proviennent des étapes de maturation des mélanocytes durant l'embryogenèse. Les mélanocytes de l'uvée sont le deuxième type de cellules pigmentées, dont la production de mélanosomes se poursuit à l'âge adulte (Lopes et al. 2007).



L'uvée est constituée de 3 parties, la membrane choroïdienne, le corps ciliaire et l'iris. L'uvée est vascularisée, et contient un très grand nombre de cellules pigmentées. Le rôle de l'uvée est de fournir les nutriments à la rétine et à la sclère, lesquels sont dépourvus de vaisseaux sanguins. Le rôle des mélanocytes de l'uvée est probablement d'absorber la lumière et de jouer un rôle face au stress oxydatif (reactive oxygen species – ROS). L'exemple des syndromes de Waardenburg, où les défauts oculaires sont limités à une hypo-pigmentation de l'iris et de la choroïde, sans défaut majeur de la vision par exemple, renforce l'idée que le rôle des mélanocytes de la choroïde est probablement limité. Ce raccourci est sous-tendu par le peu de données sur les fonctions des mélanocytes de l'uvée.

Des cellules pigmentées sont également présentes dans la conjonctive, dont la structure de la muqueuse est très proche de l'épiderme. Contrairement aux mélanocytes de l'uvée qui sont plutôt des cellules rondes, les cellules pigmentées dans la conjonctive disposent de dendrites leur permettant d'avoir des contacts entre elles et avec les cellules épithéliales (L. H. Mikkelsen 2020). Les fonctions de ces cellules restent à préciser.

B. MELANOMES

Les mélanomes constituent une entité tumorale variée, souvent associée à un diagnostic sombre. Le point commun entre ces tumeurs réside dans le fait qu'elles partagent un même précurseur : le mélanocyte. Selon la localisation d'origine du mélanocyte, le développement tumoral, les altérations génétiques observées et les traitements seront différents.

Le plus fréquent des mélanomes est le mélanome cutané (91%), suivent les mélanomes de l'uvée et de la conjonctive (5%), 1% proviennent de mélanomes des muqueuses, et 3% sont d'origine inconnue. Parmi les mélanomes oculaires, 85% sont des mélanomes de l'uvée et 15% de la conjonctive (L. H. Mikkelsen 2020). Parmi les mélanomes muqueux figurent les mélanomes de la tête et du cou (55.4%) de l'appareil génital féminin (18%), de l'anus et du rectum (23.8%) et du tract urinaire (2.8%) (A. E. Chang, Karnell, et Menck 1998). Les mélanomes muqueux proviennent des mélanocytes localisés dans les membranes du nasopharynx, genito-urinaires, anorectales et de l'œsophage. Les mélanomes de l'uvée, sur le plan clinique, figurent parmi les tumeurs rares, mais constituent l'entité tumorale la plus fréquente des tumeurs oculaires. Dans l'ensemble des mélanomes de l'uvée les mélanomes de la choroïde (85%) sont majoritaires et ceux du corps ciliaire et de l'iris représentent 5-8% et 3-5% respectivement.

1. Aspects cliniques des mélanomes

Sur le plan clinique, et d'après le rapport de l'INCA de 2018, les mélanomes cutanés ont représenté 15 513 cas soit 4.06% des cancers en France (SPF s. d.). Les mélanomes cutanés apparaissent principalement de façon spontanée mais également à partir de lésions primaires comme les naevus, ou les mélanocytoses. Les mélanomes cutanés envahissent via le système sanguins ou lymphatiques, différents organes tels que les

ganglions, le derme, les poumons, le foie, les os, le cerveau. Parmi les lésions primaires, les mélanomes cutanés peuvent également dériver de nævus bleus, qui correspondent à des proliférations mélanocytaires bleu-gris non tumorales. Ces lésions bénignes, qui peuvent être localisées à différents endroits avec des formes différentes, sont issues des défauts de migrations de cellules de la crête neurale et leur arrêt dans le derme (Griewank et al. 2017; Barnhill et al. 2010; 2008).

Les mélanomes acro-lentigineux sont un sous-type rare qui survient sur la paume des mains, plante des pieds, ou sous les ongles. Enfin il y a les mélanomes muqueux concernant les voies nasales, la bouche, la gorge (pharynx), le rectum, le canal anal, la vulve et le vagin. Les mélanomes muqueux comme les mélanomes acro-lentigineux ont des pronostics sombres (Bradford et al. 2009; Gumaste et al. 2014; A. E. Chang, Karnell, et Menck 1998; McLaughlin et al. 2005; Virgili et al. 2007).

Les mélanomes de l'uvée représentent 448 nouveaux cas parmi les 382.000 nouveaux cas de cancers en France en 2018, selon l'estimation faite par l'INCA basée sur l'analyse des données des registres Rancim –Santé Publique France (observations jusqu'en 2015 puis projections jusqu'en 2018)(SPF s. d.). L'incidence des mélanomes de l'uvée est de 3 cas et 4 cas par million respectivement chez la femme et chez l'homme. L'incidence des mélanomes de l'uvée sur la période 1990-2018 est stable voire à la baisse sur la période 2010-2018 (-1.1% et -1.3% respectivement chez la femme et chez l'homme). Des revues intégrant plus de cas ont décrit des taux similaires avec 5 cas par million d'habitants et une incidence stable.(Virgili et al. 2007; A. D. Singh, Turell, et Topham 2011; Mahendraraj et al. 2016). L'apparition de métastases survient chez 32% des patients après 5 années du diagnostic de la tumeur initiale, 50% après 15 années et 62% après 35 années. La survie globale médiane est inférieure à 1 an à l'apparition de métastases, majoritairement hépatiques (Van Raamsdonk et al. 2010; M. J. Rodrigues et al. 2013; Vivet-Noguer et al. 2019; Mallone et al. 2020)

2. Facteurs de risques des mélanomes

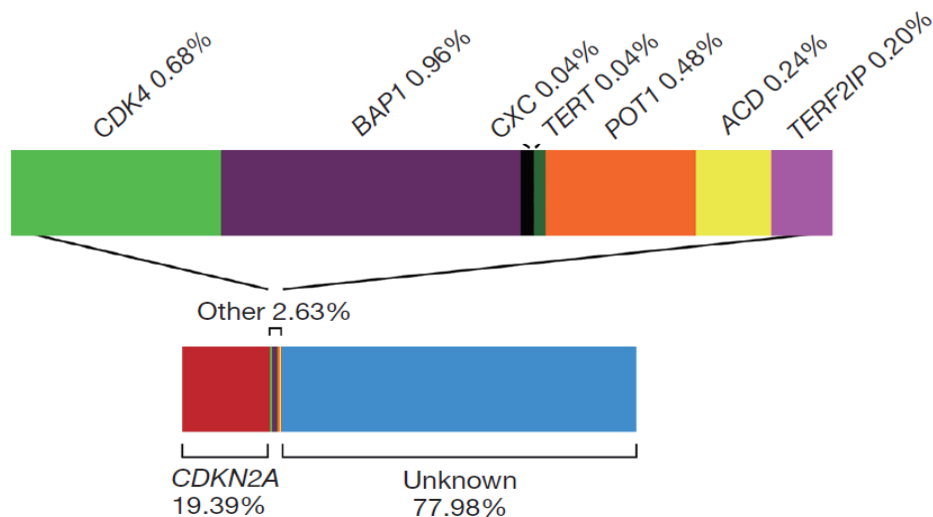
a. Facteurs de risques des mélanomes cutanés

Les facteurs de risques associés au mélanome cutané comprennent des facteurs environnementaux comme l'exposition aux UV, et de facteurs de risques individuels tels que l'âge d'exposition aux UV, la durée d'exposition et la survenue de coups de soleil, la couleur claire des cheveux (blonds, roux), la couleur claire de la peau, la présence de taches de rousseur, la présence importante de nævus (>100), ou la couleur

des yeux (bleu, vert) (Potrony et al. 2015; Gandini et al. 2005; Ali, Yousaf, et Larkin 2013). Entre 8 et 10% des mélanomes cutanés sont des formes familiales (Potrony et al. 2015). Les analyses génétiques ont mis en évidence des gènes de susceptibilités à haute pénétrance dans le mélanome cutané comme *CDKN2A*, *CDK4*, *BAP1* etc (Figure 6).

Figure 6: Prévalence des mutations germinales à haut risque de mélanome cutané.

Extrait de Potrony et al. 2015 (analyse de 2511 familles)



La prévalence des mutations dans les gènes de susceptibilité au mélanome à haut risque identifiées à ce jour dans les familles sujettes au mélanome correspond aux informations génétiques de 2 511 familles : 487 mutées pour *CDKN2A*, 17 *CDK4*, 24 *BAP1*, 1 *CXC*, 1 *TERT*, 12 *POT1*, 6 *ACD* et 5 *TERF2IP* respectivement, et 1 958 familles dont la mutation est inconnue. *CDKN2A*, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; *CDK4*, cyclin-dependent kinase 4; *BAP1*, Breast cancer 1 (*BRCA1*) associated protein 1; *TERT*, telomerase reverse transcriptase; *POT1*, protection of telomeres 1.

Le gène *CDKN2A* (cyclin dependent kinase inhibitor 2) est le gène le plus fréquemment muté au niveau germlinal dans les mélanomes cutanés (20%). Ce gène est également associé au risque de développer des cancers du pancréas (McWilliams et al. 2011), du sein (LaDuca et al. 2020) et les cancers liés au tabac (Potrony et al. 2015).

Le gène *CDKN2A* localisé sur le chromosome 9 (9p21) code pour deux protéines suppresseurs de tumeurs p14ARF et p16INK4A issues d'un épissage alternatif. La protéine p16 inhibe l'activation de CDK4 avec la cycline D. En l'absence de p16, CDK4 associée à la cycline D phosphoryle RB, libérant E2F, lequel peut jouer son rôle de facteur de transcription, et activer des gènes cibles permettant le déroulement de la phase S du cycle cellulaire. La protéine p14ARF induit également l'arrêt du cycle cellulaire via la voie p53 et l'apoptose, en séquestrant MDM2 (J. D. Weber et al. 1999). En l'absence de p14ARF, l'inhibition est levée, et MDM2 peut jouer son rôle d'ubiquitin ligase de p53, et lever l'effet anti-prolifératif de p53 (Burri et al. 2001).

Les gènes *CDK4* (cyclin-dependant kinase 4), et *BAP1* (BRCA1 associated protein1) figurent aussi parmi les gènes de susceptibilité associés à un risque élevé de développer un mélanome cutané. L'oncogène *CDK4*, localisé sur le chromosome 12 (12q14), est impliqué dans le contrôle de l'avancée de la phase G1 du cycle cellulaire. La mutation la plus fréquemment retrouvée conférant une prédisposition pour le mélanome cutané concerne l'acide aminé en position 42 (arginine), correspondant au domaine de liaison de p16INK4. La mutation de *CDK4* empêche l'inhibition par p16INK4 et est associée à un gain de fonction qui conduit à une progression du cycle cellulaire. Les mutations du gène *BAP1* (décrit ci-après : page 30) ont été rapportées dans plusieurs cancers (mélanome uvéal, cancer du sein, mésothéliome, etc.). *BAP1* est localisé sur le chromosome 3 (3p21) et code pour une protéine ayant un rôle de suppresseur de tumeurs. *BAP1* est une désubiquitinase qui régule de nombreux processus cellulaires.

D'autres gènes de susceptibilité au mélanome cutané sont impliqués dans la maintenance des télomères : *TERT* (telomerase reverse transcriptase) et *POT1* (Protection of telomeres 1). *TERT* est localisé sur le chromosome 5 (5p15), et code pour une enzyme dont la fonction est de maintenir l'intégrité des extrémités des chromosomes, en protégeant les répétitions TTAGGG. Le complexe enzymatique évite le raccourcissement des télomères et la fusion des extrémités télomériques. L'âge et les UV sont associés aux raccourcissements des télomères et prédisposent au développement tumoral. *POT1* localisé en 7q31 joue un rôle important de chaperon dans la maintenance des télomères évitant des fusions télomériques. Dans ce complexe chaperon, figurent ACD et TERF2IP qui ont également été rapportés comme gènes de susceptibilités. *TERT*, *POT1*, *ACD* et *TERF2IP* sont mutés dans moins de 1% des formes familiales.

De manière intéressante, d'autres gènes comme *MC1R*, *MITF*, *SIP*, *TYR*, *TYRP1*, *OCA2*, *SLC45A2/MTAP*, *PAX3* impliqués dans le développement et la maturation des mélanocytes, ont été identifiés comme associés à un risque modéré de mélanome cutané. *MC1R* (Melanocortin 1 Receptor) est un des gènes clés de la pigmentation, et code pour le récepteur 1 à l' α -MSH. Les nombreux polymorphismes de *MC1R* conduisent à des défauts de signalisation de l'AMPc et des changements de ratio eumélanine / phéomélanine, et des effets sur la pigmentation de la peau et des cheveux. La présence de variants de *MC1R* donnant un phénotype cheveux roux (Red Hair Color phenotype, RHC : p.D84E, p.R142H, p.R151C, p.I155T, p.R160W, p.D294H) sont associés à un facteur de risque modéré de mélanome (Dessinioti et al. 2011; P. F. Williams et al. 2011). La présence de mutations de *CDKN2A* et de variants *MC1R* augmentent ce risque. *MITF* (Microphthalmia-associated transcription factor) décrit

précédemment est un gène clé du développement mélanocytaire et de la différenciation. Des variants génétiques dans *MITF* sont associés au développement et à la progression tumorale de mélanomes. La présence d'un variant génétique causant un changement sur l'acide aminé 318 (pE318K) intervient sur un site de SUMOylation qui régule la fonction de *MITF* (Bertolotto et al. 2011). Ce variant faiblement présent dans la population (environ 0.3% en France, Italie, Angleterre, Australie par exemple) est enrichi chez des patients atteints de mélanome cutané (1.6 à 2.8%). La protéine ASIP (Aguti signaling protein) codant pour un antagoniste de l' α -MSH, TYR et TRP1 sont eux aussi impliqués dans la mélanogenèse et la formation de mélanosome comme d'ailleurs OCA2 (Oculocutaneous albinism II, (L. P. Fernandez et al. 2009)), SLC45A2/MTAP ou PAX3 impliqués dans le développement des mélanocytes (Behrmann et al. 2003). Plusieurs gènes du système immunitaire comme les gènes codant pour les antigènes leucocytaires humains de classe II (*HLA-II*),(Planelles et al. 2006)), *IRF4* (interferon regulatory factor 4, (Potrony et al. 2017)) ont été décrits comme facteur de risques selon la présence de polymorphismes. Des gènes codants des protéines impliquées dans le métabolisme de lipides ou des sels minéraux ont été aussi décrits comme gènes de susceptibilité du mélanome cutané: *CYP2D6* (cytochrome P50 family 2, (Strange et al. 1999)), glutathion transférase (*GSTM1* *GSTT1*, *GSTP1*, (Ibarrola-Villava et al. 2012)), *FTO* (Fat mass and obesity, (Iles et al. 2013)), ou *VDR* (Vitamin D receptor). Enfin le gène *PARP1* (Poly ADP-ribose polymerase 1) codant pour une enzyme jouant un rôle crucial dans les voies de réparation des dommages de l'ADN et la stabilisation des fourches de réplifications de l'ADN a également été identifié comme gène de susceptibilité (Peña-Chilet et al. 2013).

b. Facteurs de risques des mélanomes de l'uvée

Les mélanomes de l'uvée concernent surtout les adultes (âge médian 62ans), et surviennent principalement chez des individus à peau claire (97.8%), (Pandiani et al. 2017). La peau claire et les yeux clairs (bleus ou verts) sont considérés comme facteurs de risque. L'exposition aux UV n'est pas associée au risque de mélanome uvéal. La signature mutationnelle de l'exposition aux UV n'a pas été retrouvée dans la quasi-totalité des mélanome uvéaux (transition C>T) (Furney et al. 2013; Royer-Bertrand et al. 2016; Robertson, Shih, et al. 2017). Néanmoins quelques rares cas ont montré des changements C>T, ou CC>TT évocateurs de mutations liées aux UV (Van Raamsdonk et al. 2010).

La présence de mutations constitutionnelles de *BAP1* a été rapportée dans les formes rares de cas familiaux ou de mélanomes uvéaux bilatéraux, qui représentent environ 1% des UM (Ewens et al. 2018; Wiesner et al. 2011; Njauw et al. 2012).

Récemment *MBD4* (methyl-CpG binding domain 4), localisé comme *BAP1* sur le chromosome 3 a été identifié comme gène de susceptibilité dans le mélanome uvéal. *MBD4* est impliquée dans le *DNA mismatch repair*. La mutation de *MBD4* est associée à une perte de fonction donnant lieu à un taux élevé de mutations sur les méthyl-Cytosines, CpG (CpG>TpG). L'identification de cette mutation dans le mélanome de l'uvée chez quelques patients ayant répondu à l'immunothérapie, a permis d'ajouter *MBD4* aux gènes d'intérêt du mélanome uvéal et peut constituer un marqueur de réponse à l'immunothérapie (inhibiteurs d'immuno-checkpoint). (M. Rodrigues, Mobuchon, Houy, Fiévet, et al. 2018; Bellacosa 2001; Derrien et al. 2020)

L'étude d'association pangénomique (GWAS) menée à l'Institut Curie en collaboration avec le Centre National de Génotypage (CNG-CEA) a mis en évidence trois loci de prédisposition au mélanome uvéal (Mobuchon et al. 2017; 2021). Le locus en 5p15.33 de *TERT* et *CLPTM1L* (Cisplatine résistance - relative protein 1 (rs421284: OR = 1.7) est celui qui a l'*odd ratio* le plus significatif. Cette région contient plusieurs SNP en déséquilibre de liaison, mais le principal marqueur rs452384 fixerait les facteurs de transcription NKX2.4 et GATA4 selon la présence des allèles T ou C et auraient un rôle répresseur ou activateur sur l'expression de *TERT* et *CLPTM1L* (Mobuchon et al. 2021). Deux autres loci ont été identifiés dans l'étude de Mobuchon et al : le locus *IRF4* localisé sur le chromosome 6, et le locus *OCA2/HERC2* sur le chromosome 15. Les deux gènes *IRF4* et *HERC2* sont impliqués dans la pigmentation, et leur allèle *IRF4* :rs12203592, allèle T ; *HERC2* rs12913832 allèle C sont responsables de la couleur bleue des yeux. Ces polymorphismes génétiques pourraient expliquer la prédisposition qu'ont les individus aux yeux clairs à développer un mélanome uvéal. Les travaux ont permis de montrer que bien que l'allèle à risque rs421284 de *CLPTM1L* allèle C prédispose à des UM de risques métastatiques faibles à élevés, l'allèle à risque de *IRF4* était associé aux disomies 3 ayant un faible risque métastatique. En revanche l'allèle à risque de *HERC2* est associé aux monosomies 3 et à un risque métastatique élevé.

3. Prise en charge clinique des mélanomes uvéaux

La prise en charge clinique de la tumeur primaire va dépendre une fois le diagnostique établi, de plusieurs paramètres. Selon la taille et l'épaisseur, la localisation de la tumeur et son impact sur la vision, une radiothérapie ou une chirurgie oculaire sera réalisée.

Parmi les approches de radiothérapie, la protonthérapie et la brachythérapie (plaque recouverte de radio-éléments, curiethérapie) pourront être utilisées sur des tumeurs de petite taille (diamètre inférieur à 15mm et épaisseur inférieure à 8 mm), permettant de préserver le globe oculaire (Mathis et al. 2018; Bilmin et al. 2021). La chirurgie concerne principalement l'énucléation lorsque la tumeur a un diamètre supérieur à 18mm et une épaisseur supérieure à 12mm.

Le suivi des patients dépend des caractéristiques cliniques, histologiques et des facteurs génomiques pronostics définis au diagnostic de la tumeur primaire. Chez les patients à haut risque métastatique, le suivi sera régulier en particulier au niveau du foie (par IRM), sachant le tropisme hépatique important de la maladie métastatique chez ces patients (M. Rodrigues, de Koning, et al. 2019; Kujala, Mäkitie, et Kivelä 2003). La détection de métastases hépatiques peut conduire à un traitement chirurgical des lors que la lésion hépatique est résécable et en l'absence d'une maladie hépatique disséminée (miliaire). La chirurgie hépatique permet de prolonger significativement la survie globale de ces patients (Mariani et al. 2009; Gomez et al. 2014). Différents traitements de chimiothérapies ont montré des bénéfices limités en termes de réponse ou de survie. Des inhibiteurs des voies altérées dans l'UM présentent actuellement des pistes thérapeutiques intéressantes en développement. L'immunothérapie par des inhibiteurs de « checkpoints » comme des anti-PD1 ne se sont pas avérés efficaces sauf dans des tumeurs mutées dans le gène MBD4 et qui présentent un nombre de mutations aussi élevés que les mélanomes cutanés (M. Rodrigues, Mobuchon, Houy, Fiévet, et al. 2018). Très récemment il a été montré que le Tebentafusp, une protéine bispécifique qui dirige les lymphocytes T CD3+ du patient contre la glycoprotéine gp100, exprimée par les cellules de la peau et les cellules tumorales de mélanomes, augmente la survie globale des patients atteints de mélanome uvéal métastatique (Nathan et al. 2021).

4. Altérations somatiques génétiques et génomiques des mélanomes

Les altérations génétiques décrites dans les mélanomes sont très variées et dépendent du type de mélanome. La description des altérations qui suit a pour objectif de montrer les différentes catégories d'altérations et les signatures actuellement utilisées pour la prise en charge de ces cancers.

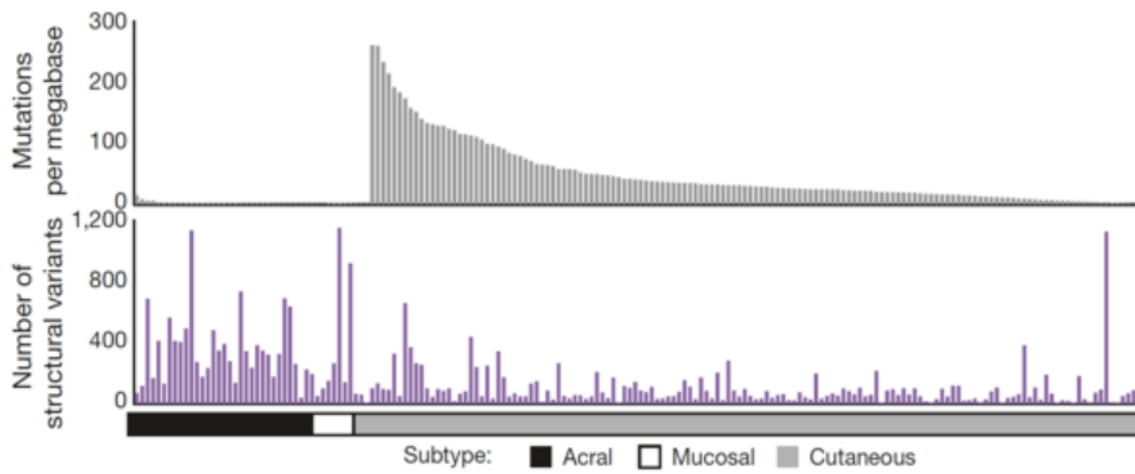
a. Charges mutationnelle et signatures mutationnelles dans les mélanomes

Les mutations ponctuelles dans la séquence codante de gènes suppresseurs de tumeurs donnant lieu à des pertes de fonction, ainsi que sur des gènes activateurs ou oncogènes, constituent la situation la plus simple pour l'initiation de l'oncogenèse. Cependant un panel d'altérations génétiques peut survenir dans des régions clés de la régulation de l'expression des gènes : des variants de nucléotides dus à des substitutions (SNV, single nucleotide variant), des insertions/délétions (indel), des variations génétiques de grande taille simples ou complexes (indel, inversion, duplication-inversion, etc) et des altérations du nombre de copies allant jusqu'à des altérations de la ploïdie ont été décrites dans les cancers (Alexandrov et al. 2013; 2020). Ces altérations conférant alors des capacités de prolifération, d'échappements aux mécanismes de rétrocontrôles et d'apoptose, de migration, de l'activation de l'angiogenèse pour l'accès aux nutriments, de l'échappement au système immunitaire ou de recrutement des cellules normales environnantes (Hanahan et Weinberg 2011; Hanahan 2022).

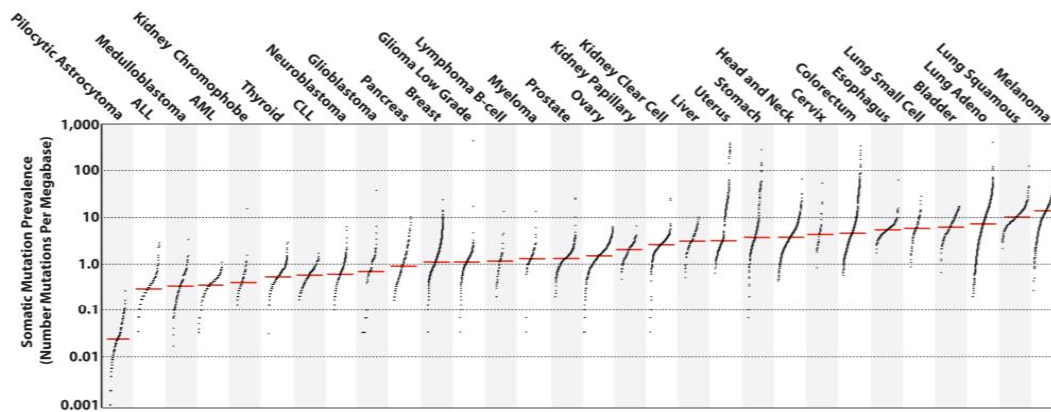
La quantification du nombre de mutations par million de paires de base (megabase) par les travaux de l'équipe de Mike Stratton pour l'International Cancer Genome Project a permis de montrer que les mélanomes de la peau sont ceux qui présentent le plus grand nombre de mutations (Figure 7). Les mutations de ces mélanomes correspondent à la signature mutationnelle 7 qui est associée aux UV (Figure 8) (Pfeifer et Besaratinia 2012; Hayward et al. 2017).

Figure 7: Taux de mutation par megabase dans les mélanomes cutanés.

A.



B.

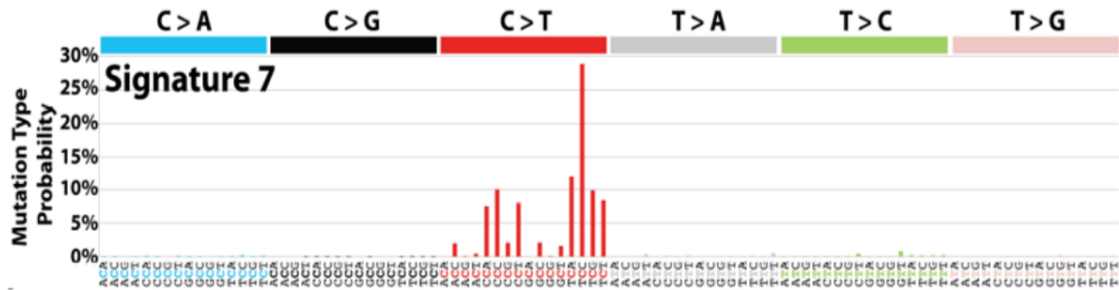


A) Taux de mutations détectés dans les mélanomes cutanés, et de type mucosal et acral extrait de Hayward, 2017. (Taux de substitution/indel (SNV, haut) et nombre de variants structuraux (bas)). B) Taux de mutations par Mb extraits de Alexandrov et al, 2013.

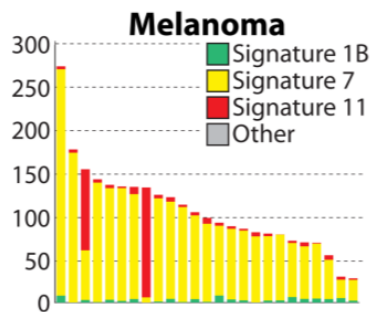
Figure 8: Caractéristiques des mutations identifiées par séquençage massif associées au mélanome cutané.

Extrait de Alexandrov et al 2013.

A.



B.

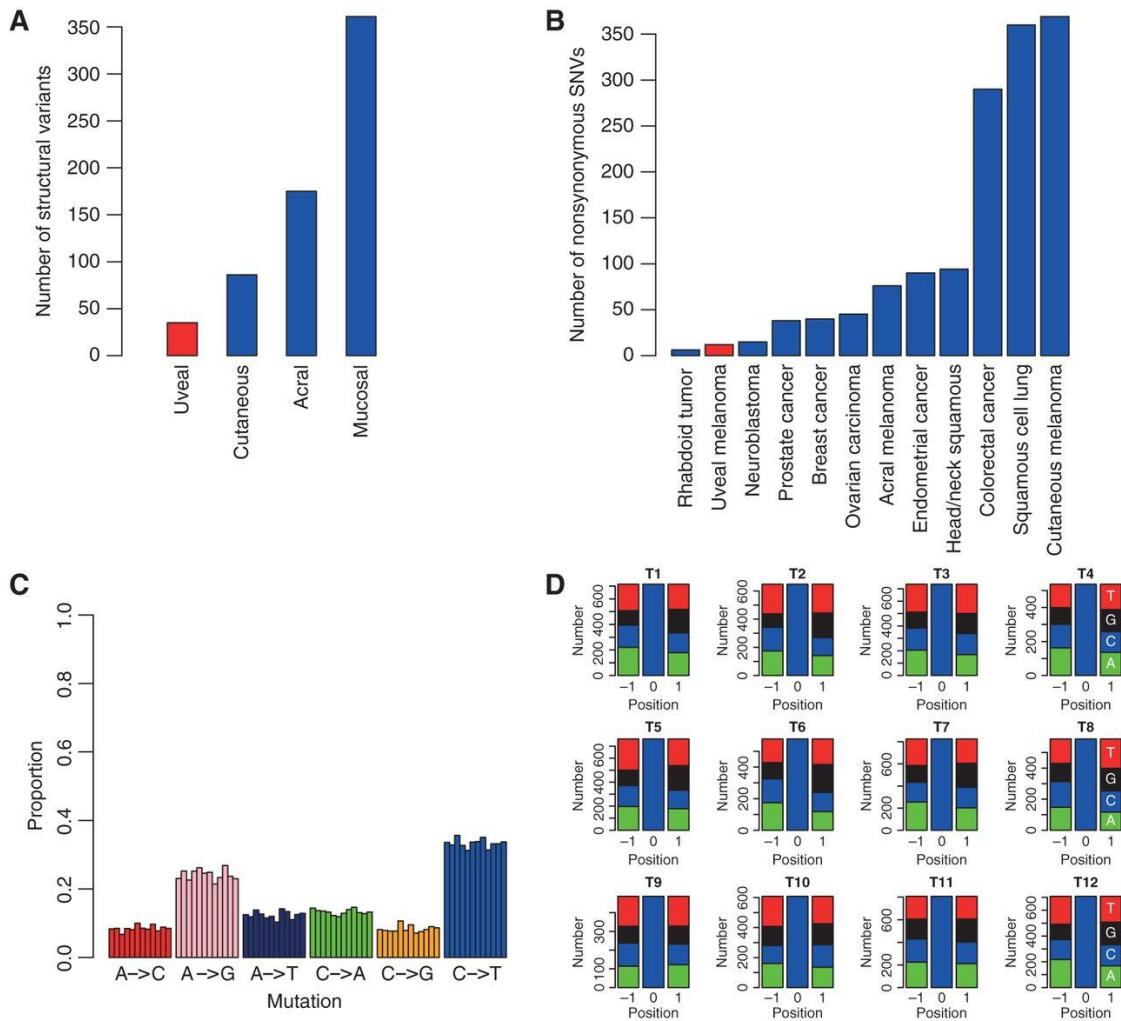


A) Signature 7 et conversion C>T principalement retrouvée dans les mélanomes cutanés. B) Dans le groupe des mélanomes cutanés la signature 7 prédomine (C>T) Chaque bar représente un individu et le nombre de mutations par Mb par signature est représenté sur l'axe des ordonnées.

Dans le mélanome de la choroïde, nous avons pu montrer que le taux de mutations par Mb dans une petite série de 12 mélanomes uvéaux était très faible (inférieur à 1 SNV/Mb) comparativement à d'autres mélanomes et à d'autres types de cancers (Figure 9A et B). Bien que des mutations aient été identifiées, elles concernent des conversions C>T et A>G mais ne correspondent pas à des mutations di ou tri nucléotidiques C>T plutôt en 3' comme observées dans la signature liée aux UV (Figure 9 C et D) (Pfeifer et Besaratinia 2012). Ces résultats ont été confirmés par les travaux du consortium TCGA UM (Robertson, Shih, et al. 2017).

Figure 9 : Caractérisations de la charge mutationnelle des mélanomes de l'uvée et de la proportion de mutations observées.

Extrait de Furney et al 2013



A) Incidence des variations structurales prédites dans le groupe des mélanomes. B) Comparaison de la charge mutationnelle des mélanomes de l'uvée avec d'autres cancers C) Proportion des mutations identifiées dans les 12 cas d'UM testés. D) La conversion C>T n'est pas associée en 3' comme sur la signature UV.

b. Altérations génétiques des mélanomes cutanés

Les mutations récurrentes identifiées dans le travail du TCGA ont permis de classer les mélanomes cutanés en 4 groupes selon la présence de mutation *BRAF*, *RAS*, *NF1* ou l'absence de ces 3 mutations (Akbari et al. 2015).

Environ la moitié des mélanomes cutanés présentent des mutations de *BRAF* (40-50%, (Davies et al. 2002) majoritairement sur le codon V600. *BRAF* est une sérine/thréonine kinase qui est normalement activée par des GTPases comme *RAS* dont l'activation fait suite à l'engagement d'un récepteur à activité tyrosine kinase par son ligand. L'activation de *BRAF* entraîne la phosphorylation de la MAPK (mitogen-activated protein) MEK, puis ERK1/2 qui à leur tour vont activer plusieurs facteurs de transcription comme MYC et JUN, qui sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. Ainsi, une mutation activatrice de *BRAF* (la plus fréquente étant V600E) conduit à une augmentation de l'activité kinase et une perturbation de la régulation du cycle cellulaire.

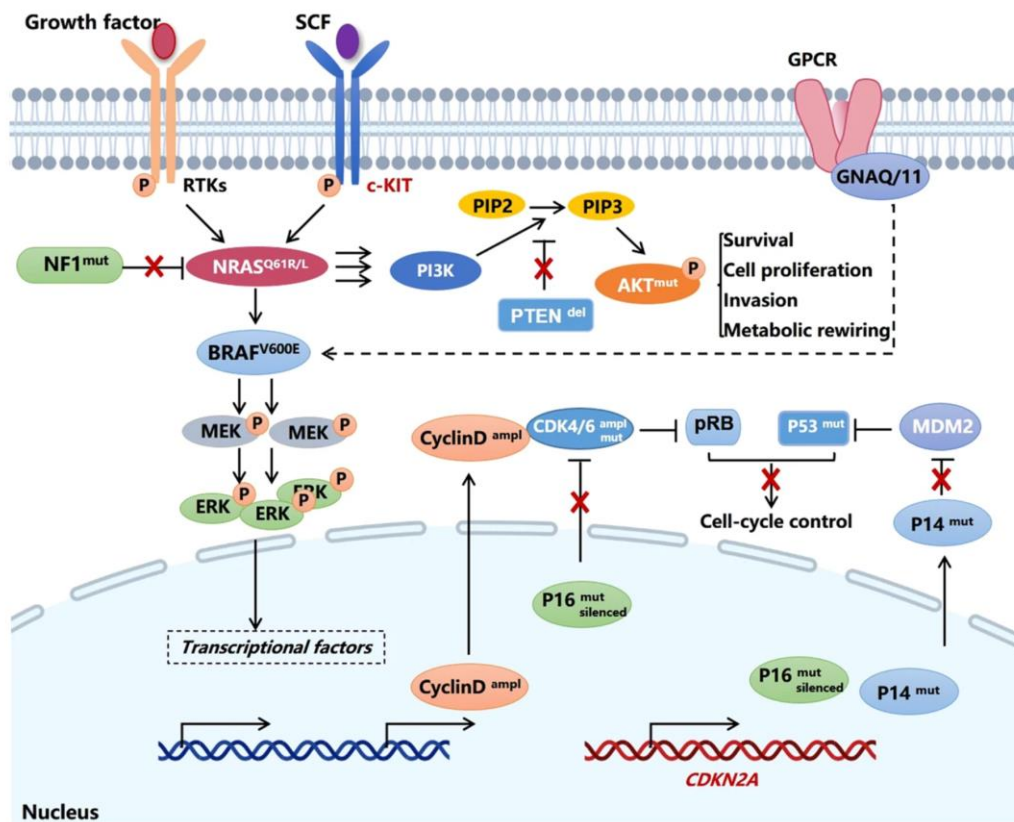
Dans la super famille des protéines G, la famille de petites protéines G monomérique (20-30KDa) *RAS* est constituée de 5 familles : les protéines Rho, Rab, Arf, Ran et Ras. Les protéines G ont une fonction de switch moléculaire et sont localisées au niveau de récepteurs transmembranaires. La liaison des protéines transmembranaires liées à des protéines G (GPCRs) par leurs ligands induit des modifications structurales favorisant le couplage du récepteur à la protéine G. Ce couplage va se suivre d'une fixation du GTP et une dissociation des 3 sous-unités constituant la protéine G et ces sous-unités dissociées activent une série d'effecteurs spécifiques.

Des mutations des protéines *HRAS*, *KRAS* et *NRAS* ont été rapportées dans 25% des cancers (Hobbs, Der, et Rossman 2016), avec *KRAS* comme le plus fréquemment muté (85%), suivi par *NRAS* (11%) et *HRAS* (4%). Dans les mélanomes cutanés, *NRAS* est le plus fréquemment muté (25%) alors que *HRAS* et *KRAS* le sont plus rarement (1-3%) (Vanni et al. 2020). Des mutations « gain de fonctions » ont lieu et sont majoritairement localisées sur les codons Q61 sinon en G12 ou G13 modifiant le site d'interaction avec l'effecteur de *RAS* (G-Exchange proteins, GEF), maintenant la forme active *RAS*-GTP, contribuant ainsi à l'activation de la voie de signalisation *RAS*-CRAF-MEK-ERK, et la voie PI3K-mTOR-cyclin D1 (Figure 10) (Randic et al. 2021).

Neurofibromin1 (*NF1*) est également muté dans environ 15% des CM. Cette mutation associée à une perte de fonction affecte la fonction de *NF1* comme régulateur négatif de *RAS*, ce qui conduit à maintenir *RAS* dans sa forme active et par cascade stimule la voie des MAPK (Vanni et al. 2020; W. Guo, Wang, et Li 2021).

Figure 10: Gènes mutés et voies de signalisation altérées dans le mélanome cutané.

Extrait de Guo, W. et al, 2021.



Amp :Amplification, CDK : cyclin-dependent kinase, Del : délétion, GPCR : G protein-coupled receptor, Mut : mutation, P : (dans un cercle rose) phosphate, p14ARF et p16INK4A : variants d'épissage codés par le gène CDKN2A, PIP2 : phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate, PIP3 : phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate, PTEN : phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase, et protéine phosphatase à double spécificité, RB : protéine associée au rétinoblastome, RTK : récepteur tyrosine kinase, SCF : cytokine, facteur de croissance de cellules souches.

c. Altérations génétiques des mélanomes uvéaux

Les mutations activatrices de la voie Gαq comme premier évènement oncogénique

Parmi les mutations les plus fréquentes dans le mélanome de l'uvée, les mutations des sous unités alpha des récepteurs aux protéines G, *GNAQ* et *GNA11*, ont été les premières décrites. Ces mutations mutuellement exclusives sont présentes dans

environ 85% des UM, et ont été décrites comme le premier évènement « *driver* » de l'oncogenèse.

Les protéines G sont les principaux effecteurs des GPCR et comprennent trois sous-unités : $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$). La superfamille des récepteurs aux protéines G est constituée de 800 protéines à 7 domaines transmembranaires dont la moitié des récepteurs est associée à des fonctions sensorielles, par la fixation de neurotransmetteurs, hormones par exemple, et l'autre moitié à d'autres fonctions de signalisation par la fixation de molécules de tailles diverses. Les récepteurs membranaires associés aux protéines G trimériques (α , β , γ) permettent d'engager une cascade de signalisation via l'hydrolyse du GTP liée à la sous-unité α .

A ce jour 23 sous-unités α ont été identifiées chez l'homme, ainsi que 5 sous-unités β et 12 sous-unités γ . Les 23 sous-unités α sont subdivisées en 4 catégories : $G\alpha_{i1/i2/i3/o/t-rod/gust/z}$, $G\alpha_s/Olf$, $G\alpha_{q/11/14/16}$, $G\alpha_{12/13}$, dont chaque catégorie a des effecteurs et des fonctions spécifiques (Simon, Strathmann, et Gautam 1991). Les sous-unités α sont composées de deux domaines principaux : un domaine de liaison à la guanine qui présente une forte homologie aux protéines GTPases comme RAS, ainsi qu'un domaine en hélice dont l'ensemble forme une poche pour la liaison de la guanine et permet l'hydrolyse du GTP en GDP. A l'état inactif la sous-unité α est liée au GDP et aux sous-unités β et γ . Lors de la fixation d'un ligand au GPCR, le GDP est remplacé par un GTP via une G exchange factor (GEF). Lorsque la sous-unité $G\alpha$ est liée au GTP, la liaison aux sous-unités β et γ est réduite en termes d'affinité, la dissociation de la sous-unité α permet l'hydrolyse du GTP en GDP, puis la réassociation de la sous-unité α aux sous-unités β et γ . La caractérisation fonctionnelle des mutations de différentes sous-unités α dans des modèles cellulaires (fibroblastes murins 3T3 principalement) a montré que ces mutations déclenchaient une transformation oncogénique. Cela a été montré pour *GNAI2* Q205L murin équivalent à la mutation Q209L humaine ; *GNAQ* Q205T murin équivalent Q209L humain (Kalinec et al. 1992) ; *GNA12 / GNA13 murin* (Xu, Voyno-Yasenetskaya, et Gutkind 1994; Xu et al. 1993), $G\alpha_z$ Q205L murin (Wong et al. 1995), *GNAI2* R179C chez le rat (Gupta et al. 1992; Pace, Wong, et Bourne 1991), ou encore *GNAO* Q205L murin (Ram, Horvath, et Iyengar 2000). Les mutations identifiées dans ces différentes sous-unités α sont plutôt associées à des gains de fonctions (*GNAQ/11*, (Van Raamsdonk et al. 2010; 2009; Moore et al. 2018)) plutôt qu'à des pertes de fonctions (*GNAS*, (Lania, Mantovani, et Spada 2006)).

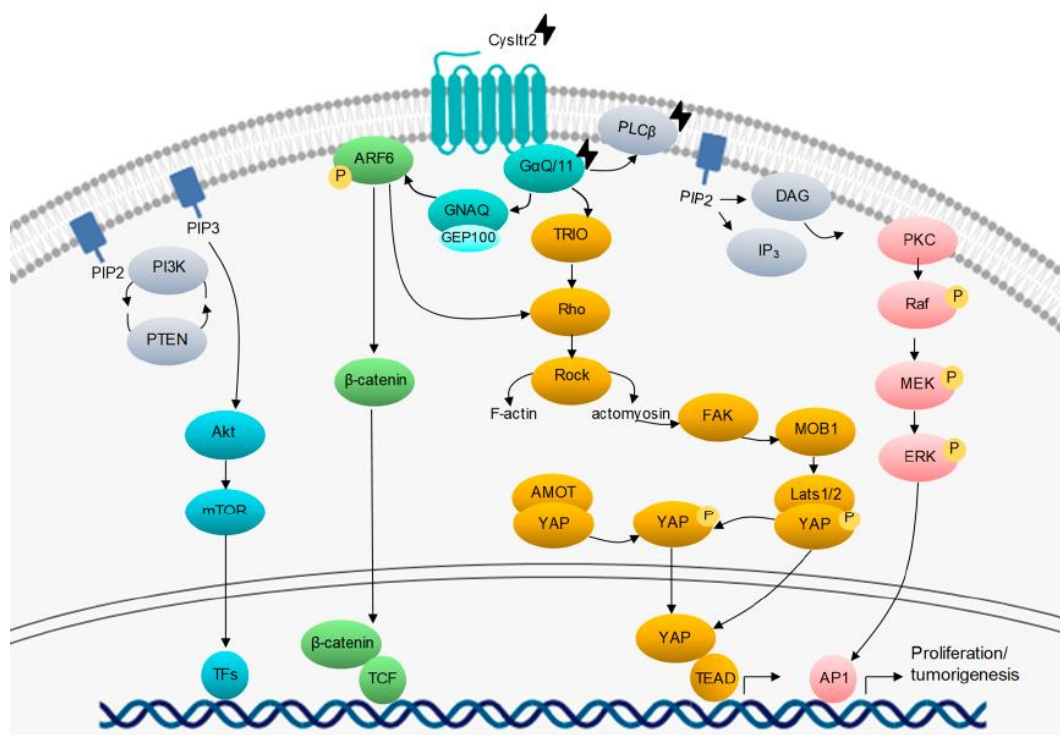
Dans le mélanome de l'uvée, les mutations les plus fréquentes pour *GNAQ* et *GNA11* concernent les codons Q209L et R183 (Van Raamsdonk et al. 2009; 2010). Comme indiqué auparavant ces mutations sont activatrices puisqu'elles maintiennent la sous-unité de *GNAQ/GNA11* liée au GTP. Ce gain de fonction se traduit par une activation de voies de signalisation telles RAF-MEK-ERK, ainsi que la voie YAP (Feng et al. 2014).

Plus récemment, des mutations activatrices mutuellement exclusives ont été décrites dans d'autres gènes de la voie $G\alpha q$ telles que la protéine Phospholipase C β -4 (*PLCB4*) effecteur de $G\alpha q$ (mutation sur le codon D630) et *CYSLTR2* qui est un GPCR (sur le codon L129) (P. Johansson et al. 2015; Moore et al. 2016; 2018). La mutation sur le codon D630, dans le domaine catalytique de *PLCB4* maintient la voie de l'inositol phosphate activée, en catalysant activement l'hydrolyse à la membrane du phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) (Rhee 2001) en inositol triphosphate et diacylglycerol (DAG), ce second messager permettant alors l'activation des protéines kinase C. Le récepteur 2 à l'hormone cystenil leucotriène (*CYSLTR2*) est un membre de la famille des récepteurs associés aux protéines G, dont la mutation sur le codon 129 active constitutivement $G\alpha q$ et confère un phénotype tumorigénique (Moore et al. 2016). Le travail de Moore et collaborateurs a montré que les mutations de la voie $G\alpha q$ (*CYSLTR2*, *GNAQ/GNA11*, *PLCB4*, figure 11) sont présentes dans près de 96% des UM en compilant les données du TCGA UM (80cas) et de 3 autres datasets (UNI-UDE : 22 cas, CRUK : 9 cas, QIMR : 25 cas).

Ces mutations de *GNAQ*, *GNA11*, *PLCB4*, et *CYSLTR2* ne sont pas liées au pronostic des mélanomes de l'uvée. Les mutations de *GNAQ/11* sont d'ailleurs présentes dans des lésions mélanocytaires bénignes et en particulier dans les nævus bleus (Van Raamsdonk et al. 2009; M. R. Roh et al. 2015; Bender et al. 2013) et ne peuvent donc pas être associées seules à la transformation tumorale.

Figure 11: Mutation des gènes de la voie $G\alpha q$ et activation de voies de signalisations.

Extrait de Vivet-Noguer, et al 2020.



Les mutations récurrentes dans *GNAQ*, *GNA11*, *PLCβ4* et *CYSLTR2* (éclair noir) sont mutuellement exclusives et déclenchent l'activation de la signalisation $G\alpha q$ et des voies connexes (voies Akt/mTOR, Wnt/ β -caténine, Yes-associated Protein (YAP) et MAPK) dans l'UM.

L'activation de la voie MEK/ERK dans les mélanomes de l'uvéa consécutive aux mutations de la voie $G\alpha q$, a conduit à l'évaluation d'inhibiteurs de MEK dans des modèles cellulaires (Khalili et al. 2012; Ambrosini et al. 2013) puis dans des essais cliniques. Un de ces essais a évalué l'efficacité de l'inhibiteur de MEK, le Selumetinib en combinaison avec la Décabazine comme agent de chimiothérapie versus la Décabazine seule dans un essai de phase 3 multicentrique randomisé (SUMIT) chez des patients métastatiques (Carvajal et al. 2018). Bien que la combinaison ait été bien tolérée, peu de bénéfice sur la survie sans progression a été constaté. Des travaux plus récents sur des modèles animaux ont montrés des résultats préliminaires plus intéressants en combinant deux thérapies ciblées ciblant MEK1/2 et ERK1/2 ou MEK1/2 + mTORC1/2 (Decaudin et al. 2018).

Les combinaisons ciblant les voies PI3K/AKTmTOR et PKC ainsi que la combinaison d'inhibiteur de PKC et p53/MDM2 ont montré également des résultats intéressants avec des effets additifs voire synergiques sur des modèles *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux (Carita et al. 2016). Les travaux de Carita et al, ont effectivement montré que l'inhibiteur de PKC δ , AEB071 associé à un anti p53-MDM2 (CGM-097

(Holzer et al. 2015)) avait un effet significatif sur un panel de 5 modèles d'UM, associé à une augmentation de l'apoptose. Ces travaux ont également montré que l'AEB071 associé à un anti mTORC1 (RAD001) donnait une réponse anti-tumorale importante sur 3 (2 régressions et 1 inhibition de croissance) des 5 modèles testés, supérieure à la combinaison associant l'AEB071 et un inhibiteur ciblant MEK1/2 (MEK162). La mise en évidence de la régulation par *MDM2* et *MDMX/HDMX/MDM4* de *P53* a constitué une voie thérapeutique intéressante dans les cancers surexprimant *MDM2/4* (de Lange et al. 2012; Melo et Eischen 2012). L'usage combiné d'inhibiteur de *MDMX* telle que la Nutlin3 à l'AEB071 (Sotrastaurin) (Heijkants et al. 2018) a montré des résultats encourageants sur plusieurs modèles d'UM renforçant l'intérêt des inhibitions de PKC et MDM et le développement d'inhibiteurs spécifiques (Vivet-Noguer et al. 2019).

La voie mTOR et Hippo présentent également un intérêt thérapeutique (Liang et al. 2014). En effet YAP est un effecteur de la voie Hippo (Dong et al. 2007), et normalement phosphorylé par MST1/2 LATS1/2 pour participer à cette cascade de kinases dans le cytoplasme, mais YAP peut aussi être activé via Trio-Rho-FAK (Feng et al. 2014; 2019). Il a été montré *in vitro* que les modèles cellulaires d'UM contenaient peu de YAP phosphorylé dans leur cytoplasme et que YAP était localisé majoritairement dans le noyau (F.-X. Yu et al. 2014) pouvant alors se lier, avec TAZ, aux facteurs de transcription TEAD et induire la prolifération (B. Zhao et al. 2010). Les travaux de Li et al, ont permis de mettre en évidence grâce à un modèle d'UM inductible en bloquant LATS1/2 dans le tractus uvéal, que les facteurs de transcriptions YAP/TAZ/TEAD permettaient l'activation de gènes impliqués dans la voie RAS/MAPK via RasGRP1 par exemple (H. Li et al. 2019). Dans ce travail, l'inhibition de la voie MEK et de YAP (via TEAD4) a montré des résultats encourageants comme le blocage de la migration, ou la réduction de la formation de colonies. Comme ces résultats ont montré que les UM résistants aux MEKi pouvaient être sensibles à l'inhibition de la voie YAP, il apparaît intéressant d'évaluer les inhibiteurs de cette voie dans différents contextes. Les travaux de Lee et al, ont par exemple pu mettre en évidence que dans des contextes *BAP1* déficients, la voie Hippo était dérégulée, via la ubiquitination de LATS2 par BAP1, et que les pertes de fonctions de BAP1 dans des modèles de KRAS muté contribueraient à l'activation de la voie YAP/TAZ (H.-J. Lee et al. 2020) Par ailleurs l'activation de YAP, via FAK est intéressante. Actuellement la compréhension de l'activation de la voie YAP focalise l'attention de nombreuses équipes pour le développement d'inhibiteurs.

L'activation de la voie $G\alpha_q$ passe de façon canonique par PLCB4, RASGRP3, puis ERK et MAPK (Moore et al. 2018). Néanmoins les travaux de Feng et al de 2019 (Feng et al. 2019) utilisant les données du TCGA de l'UM et du mélanome cutané ont permis l'identification du gène *PTK2* codant pour la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase), dont l'activation est indépendante de l'activation de PLCB4. De plus ces travaux ont permis

de compléter notamment leurs précédents travaux sur l'activation de la voie YAP1 et l'activation de TRIO et RHOA.

Second événement oncogénique : BSE (BAP1-SF3B1/SRSF2-EIF1AX)

Comme mentionné plus haut, l'activation de la voie $G\alpha q$ n'est pas suffisante pour la transformation des mélanocytes de l'uvéa, la progression tumorale. Dans les dernières années une série de mutations ont été décrites et montré jouer un rôle dans l'oncogenèse de l'UM.

BAP1

En 2012, William Harbour et son équipe ont décrit des mutations inactivatrices de BRCA1 Associated protein 1 (*BAP1*) dans les formes d'UM à haut risque métastatique. Ces mutations sont présentes dans 38% des tumeurs primaires et dans 84% des formes métastatiques (Harbour et al. 2010; Robertson, Shih, et al. 2017; Ewens et al. 2018). La localisation de BAP1 sur le chromosome 3 (3p21), renforce son caractère gène suppresseur de tumeurs : la perte d'un chromosome 3 (monosomie 3 ou isodisomie 3) et la présence d'une mutation inactivatrice sur l'allèle restant conduit à l'inactivation bi-allélique de la fonction de *BAP1*.

Des travaux portant sur *BAP1* en 1998 ont d'abord suggéré une fonction dans la régulation de BRCA1 (Jensen et al. 1998), suggérant ainsi un rôle de gène suppresseur de tumeurs. Ensuite des travaux chez la drosophile ont montré que *Calipso*, homologue de *BAP1*, était une déubiquitinase (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase (Nijman et al. 2005) ciblant la lysine 116 de l'histone H2A suggérant un rôle dans les complexes Polycomb et plus particulièrement dans le complexe répressif : PR-DUB (Polycomb repressive deubiquitinase) (Scheuermann et al. 2010). Les complexes polycomb PRC1 et PRC2 ont des fonctions complémentaires dans la compaction de la chromatine et la répression de l'expression des gènes. Le complexe PRC1 permet la mono-ubiquitination des histones H2A sur la lysine 119 via les enzymes E1/E2/E3, et PRC2 permet la di-triméthylation des lysines 27 des histone H3 via EZH2. Le complexe PR-DUB composé de BAP1 et des protéines ASXL1/2/3 permettrait de moduler l'activité de PRC1 en deubiquitinant la lysine 119 des histones H2A. Par ailleurs, les travaux de l'équipe du Dr Margueron ont confirmé l'interaction de BAP1 avec ASXL1/2 et montré

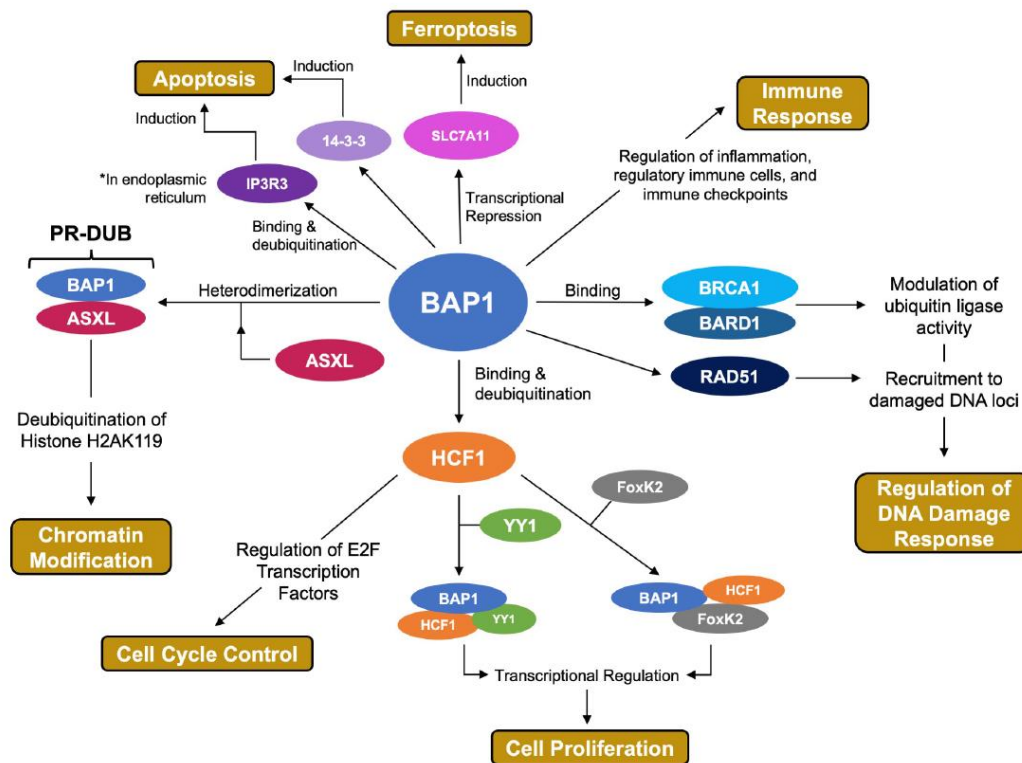
que les complexes BAP1/ASLX1 et BAP1/ASLX2 interagissaient directement, de manière transitoire, avec HCF1, FOXK1/2, MBD5/6, et KDM1B. Ce travail a démontré que ces complexes intégrant BAP1 sont essentiels à l'activité transcriptionnelle de certains gènes (impliqués dans le développement par exemple), mais que les gènes dépendant de l'activité de BAP1 n'étaient pas soumis au contrôle du complexe PRC2. En effet, les gènes dérégulés après la perte de BAP1, ne sont pas restaurés après la délétion d'EZH2. (Campagne et al. 2019) Ces résultats suggèrent donc que les complexes BAP1 jouent un rôle de co-activateurs de la transcription en opposition avec le complexe PRC1 uniquement. Par ailleurs la co-localisation de BAP1 avec la RNA polymérase II au niveau de régions inter-géniques et d'introns ainsi qu'au niveau de régions enrichies en marque H3K27Ac suggère que BAP1 joue un rôle au niveau d'éléments régulateurs à distance (enhancers).

Les principales altérations épigénétiques d'intérêt dans le mélanome uvéal sont liées à la perte de fonction de BAP1 dont les conséquences pour le complexe PR-DUB, portent sur la dé-ubiquitination des lysines des histones H2A et le contrôle de gènes cibles des complexes polycomb PRC1 et PRC2 (Conway et al. 2021). La perte de *BAP1*, en plus d'être associée à une augmentation de H2Aub sur les gènes cibles de PRC1, semble être associée à une modification des positions de H3K27me3 et leur enrichissement sur les régions intergéniques. Ces modifications pourraient conduire à des effets régulateurs sur la compaction de la chromatine et à l'inhibition des régions régulatrices à distance des promoteurs. La mise en évidence dans la cohorte TCGA d'une signature de méthylation propre au groupe 4 qui est associée à la perte de fonction de BAP1 suggère également un lien étroit entre régulation de la méthylation et perte d'expression de *BAP1* dans les formes les plus agressives d'UM. Le traitement avec un inhibiteur d'histone déacétylases (HDAC) des modèles *BAP1* déficients a montré la réactivation de gènes connus comme étant sous contrôle de BAP1 au cours du développement et de la différenciation chez le xénope (voie Wnt et Hippo) (Kuznetsov et al. 2019). Dans ces travaux, l'équipe de William Harbour a en effet montré une accumulation de H2Aub et H3K27me3 dans le promoteur de ces gènes lorsque *BAP1* est déficient, concomitante à une perte de marque H3K27Ac. L'utilisation d'inhibiteurs pan-HDAC (SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid) ou spécifique de HDAC4 (par morpholino), a permis de rétablir l'expression de ces gènes chez le xénope (*sox2*, *bra*, *msx1*, and *fzd7*). Bien qu'aucun lien direct n'ait été établi entre la perte de fonction de BAP1, l'ubiquitination de H2Aub et la localisation de H3K27ac dans ces travaux ou dans d'autres plus récents (Ishi et al. 2022), il semble intéressant d'analyser ces marques dans l'UM dans un contexte BAP1 déficient ou non. La surexpression de EZH2 dans les formes les plus agressives d'UM (Cheng et al. 2017) renforcent l'intérêt d'investiguer l'intrication des complexes Polycomb, le positionnement des marques qu'ils contrôlent, et les gènes régulés.

Il a été montré que BAP1 est impliqué non seulement dans la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN (domaines de liaisons à BARD1 et BRCA1, DNA Damage Repair, DDR), mais également dans la régulation de l'activité transcriptionnelle (via HCF1, FOXK1/2) et par extension dans la régulation du cycle cellulaire et de la prolifération, l'apoptose, mais également dans la régulation de la réponse immunitaire (Louie et Kurzrock 2020). La perturbation des mécanismes de régulation des complexes Polycomb présente un intérêt thérapeutique, et fait l'objet de développements d'inhibiteurs comme ceux ciblant les histones déacétylases (HDAC inhibitors) (Chokhachi Baradaran et al. 2020), des inhibiteurs d'EZH2, ou encore des inhibiteurs de PARP du fait de la perte de fonction de BAP1 et son rôle potentiel avec BARD1 dans la réparation des dommages à l'ADN (de Koning et al. 2019). L'évaluation de certains inhibiteurs a pu montrer des résultats intéressants dans des expériences *in vitro* sur un type tumoral, non confirmés dans d'autres modèles où BAP1 est défaillant. Les inhibiteurs d'EZH2 EPZ011989 et EPZ-6438 / Tazemetostat ont montré des résultats encourageants dans le mésothéliome (LaFave et al. 2015) mais ils n'ont pas d'effet sur les gènes cibles (HOX) ou sur la prolifération cellulaire dans des modèles de mélanomes où *BAP1* soit fonctionnel ou non (Schoumacher et al. 2016). Enfin l'association de la déficience de BAP1 à l'immuno-inflammation pourrait être utilisée pour orienter l'usage d'inhibiteurs d'immuno-checkpoint comme des anti-PDL1 ou anti CTLA4 (Danielli et al. 2012; Algazi et al. 2016; Dougall et al. 2017; van der Kooij et al. 2017).

Figure 12: Fonctions de BAP1.

Extrait de Louie, et al 2020.



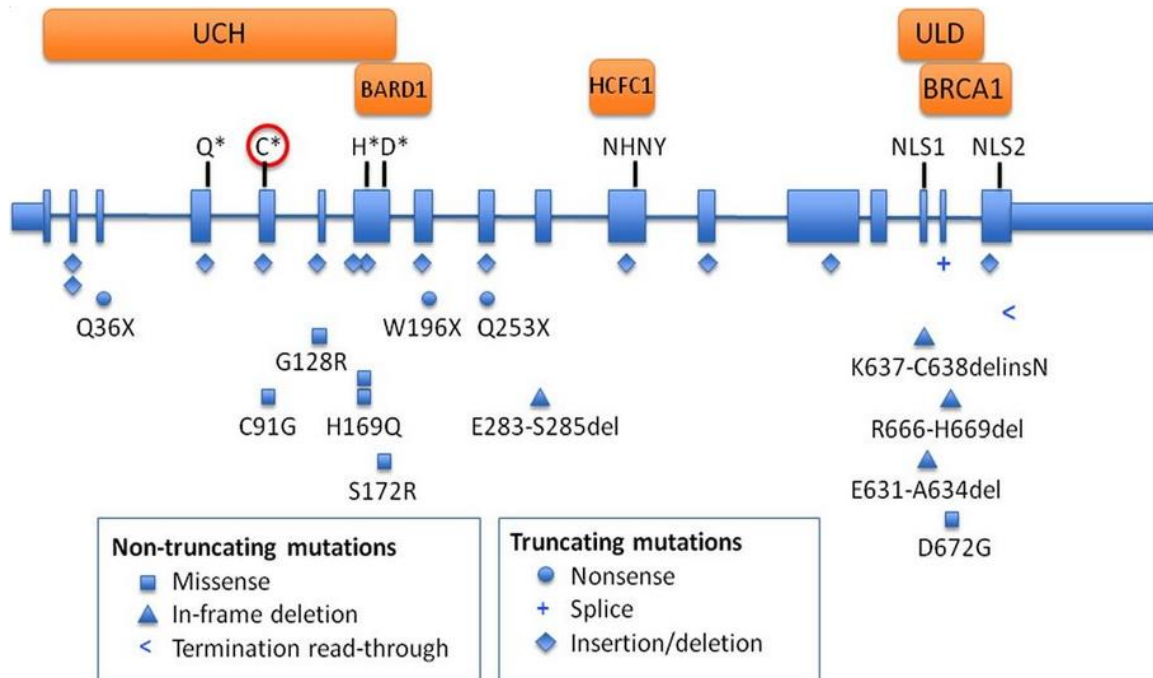
BAP1 régule la voie de réparation des dommages à l'ADN par des interactions avec BRCA1, BARD1 et RAD51. BAP1 interagit avec Host-Cell Control Factor 1 (HCF1) dans un certain nombre de processus impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire. BAP1 se lie à ASXL pour former le complexe PR-DUB, responsable de la régulation de la chromatine par la déubiquitination de l'histone H2A. La protéine BAP1 est associée à un certain nombre de voies de régulation de la mort cellulaire, l'apoptose, la ferroptose et dans la régulation immunitaire.

Des mutations de *BAP1* à l'origine d'une perte d'expression de la protéine ont été décrites dans 30 à 40% des mélanomes de l'uvée (Harbour et al. 2010; Ewens et al. 2018), mais aussi dans les cancers du sein (<1%) (Encinas et al. 2018; Murali, Wiesner, et Scolyer 2013), les mésothéliomes (Testa et al. 2011; Nasu et al. 2015; Bott et al. 2011), les mélanomes cutanés (18%) (Wadt et al. 2012) ainsi que dans les carcinomes rénaux (9%) (Peña-Llopis et al. 2012; Toussi et al. 2020). Les mutations de *BAP1* décrites sont soit des substitutions d'un nucléotide menant à des mutations faux-sens ou non-sens, à des insertions/délétions conduisant à des décalages du cadre de lecture, à des mutations sur des sites d'épissages, ainsi qu'à des délétions de régions plus larges emportant des exons codants pour des domaines clés de *BAP1* (Figure 13): domaines UCH (Ubiquitin carbocyl hydrolase), une région d'interaction avec BARD1, un domaine

de liaison à HCF1, un domaine de liaison à BRCA1, et YY1, et deux séquences de signalisation nucléaire (séquence NLS).

Figure 13: Mutations de *BAP1*.

Extrait de Harbour, et al 2010.



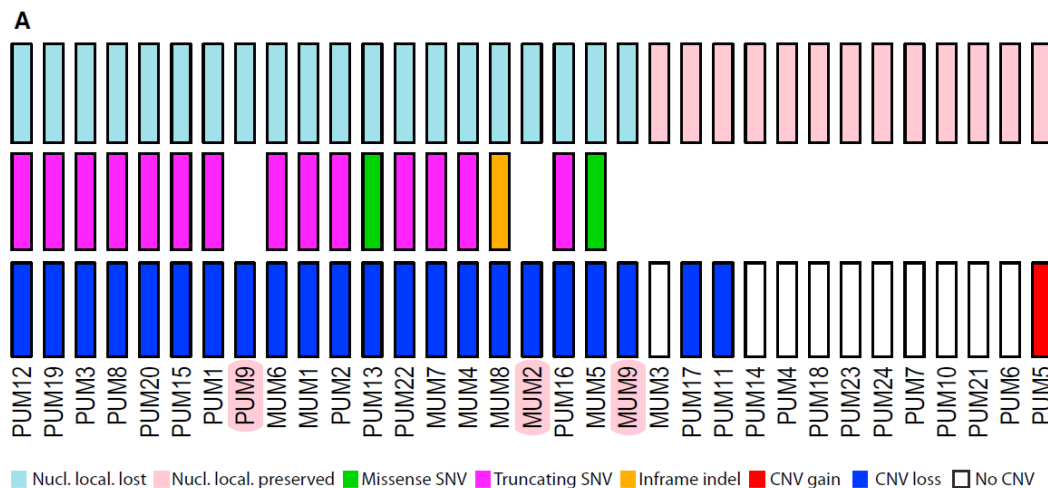
Les sites actifs de BAP1 (U, C, H, D) sont indiqués par des astérisques, dont la cystéine entourée en rouge correspond au site catalytique de débiquitination au niveau des lysines portées par les histones H2A.

La présence d'une mutation dans le gène *BAP1* peut ne pas être détectée après séquençage de l'ADN dans quelques cas (Figure 14), (Royer-Bertrand et al. 2016; Amirouchene-Angelozzi et al. 2014; Yavuzigitoglu et al. 2016), néanmoins la perte d'expression du gène peut être détectée au niveau ARN, ainsi qu'au niveau protéique par des technique d'immunohistochimie (Koopmans et al. 2014), ou par western blot (Amirouchene-Angelozzi et al. 2014). Il est à noter que bien que le niveau d'expression du gène *BAP1* soit stable au niveau ARN, il a été montré que la surexpression du miR-31 pouvait réguler la fonction de BAP1 via l'extrémité 3'-UTR du transcrit de *BAP1*, conduisant à la perte d'expression de la protéine BAP1 dans le cancer du poumon et du col (M. Yu et al. 2016; N. Wang, Li, et Zhou 2017). Le gène *BAP1* étant localisé en 3p21, la présence d'une mutation associée à la perte du chromosome 3 renforce le rôle suppresseur de tumeur de *BAP1* dans les formes d'UM à haut risque métastatique, mais aussi dans le mésothéliome ou d'autres pathologies associant une perte de la région de *BAP1* (3p21). La mise en évidence de mutations somatiques et germinales de *BAP1*

a conduit à la définition d'un syndrome BAP1 de prédisposition au cancer (BAP1-tumor predisposition syndrome, BAP1-TPDS). La présence de mutations *BAP1* germinales conduit à l'apparition de formes plus précoces et plus agressives de cancer (Rai et al. 2016).

Figure 14: Détection de mutation dans le gène *BAP1* vs présence de BAP1 dans le noyau.

Extrait de Royer-Bertrand, et al 2016.



L'immunohistochimie réalisée sur une tumeur primaire (PUM9) ainsi que deux métastases d'UM (MUM2 et MUM9) montrent l'absence de protéine BAP1 nucléaire alors qu'aucune mutation n'a été détectée par séquençage complet du génome des tumeurs correspondantes.

SF3B1 et autres facteurs d'épissages

Le processus complexe de maturation des ARN pré-messagers en ARN matures fonctionnels est effectué au sein de la machinerie du spliceosome, par des facteurs d'épissage tels que les protéines ribonucléiques et petits ARN nucléaires (snRNPs) pour permettre notamment l'excision de séquences introniques, ou exoniques. La machinerie d'épissage contient deux types de complexes du spliceosomes. Le principal complexe de type U2 est composé des éléments U1, U2, U4/Uu6 et U5, qui catalyse la plupart des étapes d'épissage (Figure 15A). Des mutations dans les gènes du complexe U2 : *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* (ou *U2AF35*), *U2AF2* (ou *UAF65*), *PRPF40B*, *SF3A1*, *SF1* ont été initialement décrites dans des myélodysplasies et des leucémies lymphoïdes chroniques (Figure 15B) puis dans plusieurs cancers solides (Figure 15) dont le mélanome de l'uvée (Royer-Bertrand et al. 2016; Furney et al. 2013; D. Gentien et al. 2014; Alsafadi et al. 2021). Le complexe mineur U12/U11 régule quant à lui 1% de l'épissage des introns et interagit avec certains membres de la voie canonique,

cependant le complexe U12 interagit avec ZRSR2 dont des mutations ont également été décrites dans les myélodisplasies. Les mutations qui surviennent dans *SF3B1* ou *SRSF2* par exemple modifient les fonctions d'épissage au niveau des sites de branchements, conduisant à l'usage d'un site alternatif 3' accepteur et par conséquent la présence d'une vingtaine de nucléotides supplémentaires dans l'ARNm (Alsafadi et al. 2016; Canbezdi et al. 2021). Les mutations *SF3B1* décrites interviennent dans le domaine HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, protein phosphatase 2A, Targets of rapamycin 1) correspondant aux acides aminés 622 à 781, et principalement sur les codons R625, K666 et K700 (Alsafadi et al. 2016; Canbezdi et al. 2021). *SF3B1* est muté dans environ 20% des UM et dans plus de 90% des myélodisplasies.

Les travaux de Dr Samar Alsafadi ont démontré que les mutations *SF3B1* ont pour conséquence de créer 1500 jonctions différentes soit moins de 1% des jonctions possibles. Les mutations *SRSF2*, sur le codon P95 conduisent à des anomalies au niveau d'exons cassettes qui vont être inclus/enrichis ou exclus selon la présence de séquence UCCA/UG et UGGA/UG dans les exons considérés enrichis ou exclus (J. Zhang et al. 2015; E. Kim et al. 2015). *SRSF2* est muté dans 47% des leucémies myélo-monocytaires chroniques (LLMC, (Meggendorfer et al. 2012)), dans 15% de myélodysplasies (Haferlach et al. 2014), et dans environ 4% des mélanomes de l'uvée (Robertson, Shih, et al. 2017).

Une signature transcriptomique caractéristique à *SF3B1* a permis de mettre en évidence aux travers des analyses RNAseq, des échantillons tumoraux dépourvus de mutations de *SF3B1* avec une mutation du facteur d'épissage *SUGP1* (*SF4*) associée ou non à une perte d'hétérozygotie chez des patients atteints soit de cancer du poumon, soit de carcinome hépatocellulaire, de leucémie myéloïde aigue ou de mélanome cutané (Alsafadi et al. 2021; Canbezdi et al. 2021).

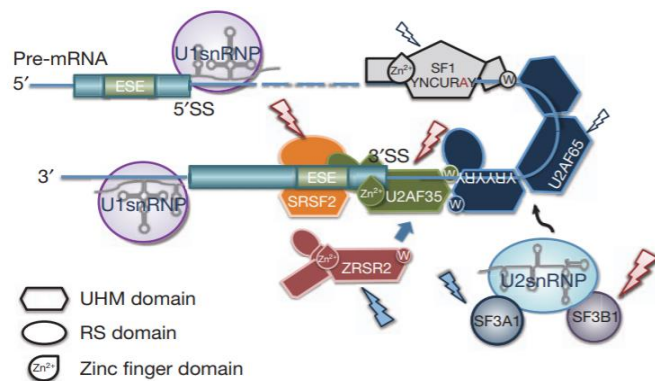
La présence de mutations des facteurs d'épissage modifiant leur fonction, conduit à des dérégulations d'épissage et des néo-transcrits aberrants. De manière très intéressante, l'étude d'associations menée par Kahles et al (Kahles et al. 2018) sur les données du TCGA a combiné une analyse de variants génétiques (SNV à partir de données de séquençage whole exome) à une analyse de variants d'épissage (néo-jonctions définies par RNAseq) dans 8705 patients présentant 32 types de cancers différents comparativement à des données de tissus normaux. Cette étude a permis d'identifier des variants génétiques connus, comme *SF3B1* et *U2AF1*, ainsi que de nouveaux variants comme *TADA1* et *PPP2R1A*, qui étaient associés spécifiquement à de nouvelles jonctions. Il est intéressant de noter que ces deux nouveaux gènes : *TADA1*, connu pour interagir avec *SF3B5*, et *PPP2R1A* impliqué notamment dans le Nonsense-mediated mRNA decay (NMD, (Kurosaki, Popp, et Maquat 2019)), s'ajoutent à la liste des facteurs d'épissages d'intérêt. Les travaux de Kahles ont également permis

de montrer que ces gènes étaient associés à de nouvelles jonctions dont une partie pouvait donner des néo-antigènes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de type 1.

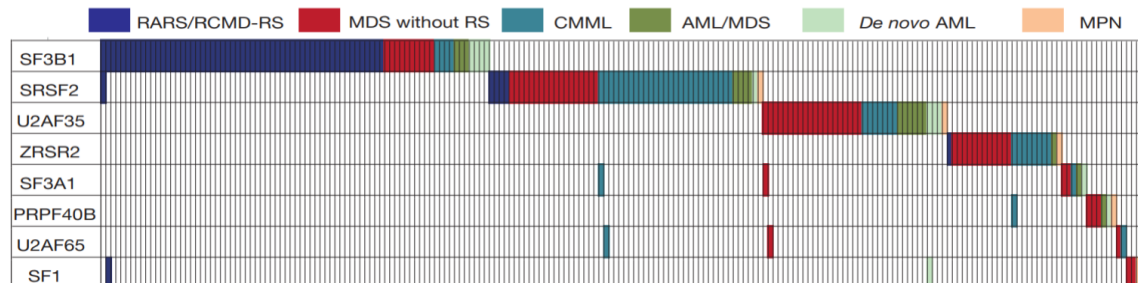
Figure 15: Détection de mutations dans la machinerie d'épissage et mutations observées dans les myélodysplasies.

Extrait de Royer-Bertrand, et al 2016.

A



B

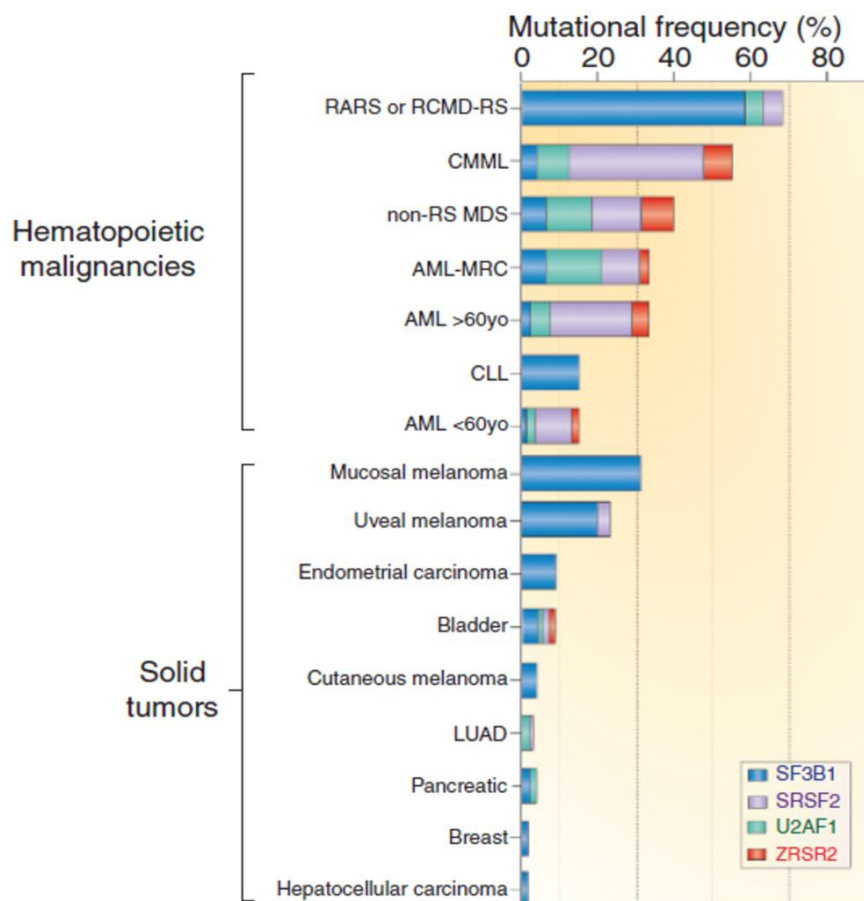


A) Eléments de la machinerie du spliceosome, tels que l'unité U1 reconnaissant les sites donneurs d'épissage, le complexe U2AF65 reconnaissant le point de branchement ainsi que le complexe U2AF35 reconnaissant le site 3' accepteur. B) Distribution des mutations dans 8 gènes du spliceosome dans des myélodysplasies (MDS), des leucémies myéloïdes chroniques (CMML), des leucémies myéloïdes aiguës (AML)/MDS, des de novo AML et néoplasies myéloprolifératives (MPN).

L'identification de ces néo-transcrits présente un intérêt thérapeutique (Slansky et Spellman 2019) dès lors qu'ils peuvent être identifiés dans le mélanome de l'uvée et utilisés pour stimuler le système immunitaire comme l'a récemment montré le travail de Dr Olivier Lantz (Bigot et al. 2021).

Figure 16: Fréquence de mutation de *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* et *ZRSR2* dans les hémopathies et tumeurs solides.

Extrait de Obeng, et al 2019.



Histogramme représentant la fréquence des mutations de *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF* et *ZRSR2* dans les hémopathies malignes et les tumeurs solides. En plus de ces quatre gènes (qui sont les plus fréquemment mutés dans les tumeurs malignes hématopoïétiques), un grand nombre de facteurs d'épissage supplémentaires affectés par des mutations de type hotspot ainsi que des mutations présumées de perte de fonction sont également mutés dans le cancer et ne sont pas représentés ici. RARS, refractory anemia with ring sideroblasts; RCMD-RS, refractory cytopenias with multilineage dysplasia and ring sideroblasts; MDS, myelodysplastic syndromes; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; AML-MRC, acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes; CLL, chronic lymphocytic leukemia.

EIF1AX

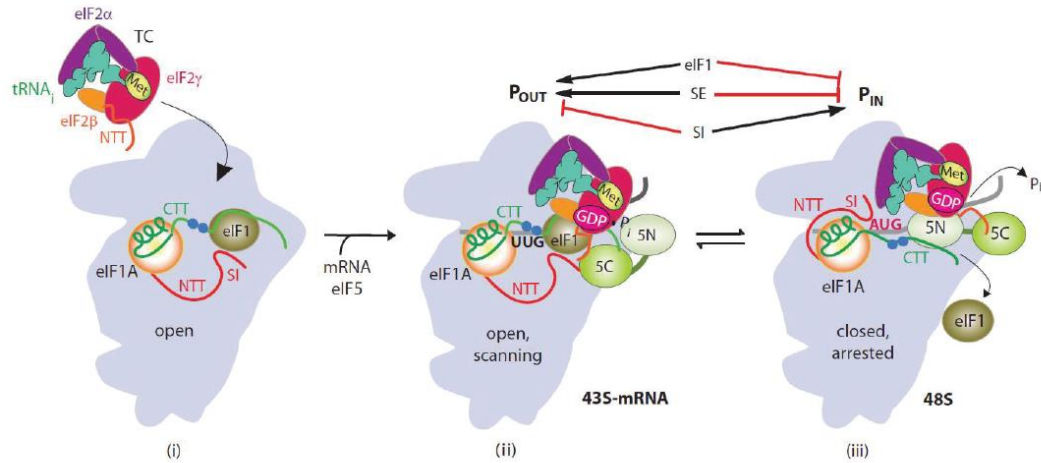
La traduction des ARNs en protéines est composée de 4 étapes : initiation, élongation, terminaison et recyclage des protéines. L'étape d'initiation est réalisée par plus d'une trentaine de facteurs d'initiation eIF1 à eIF5 (Pestova, Borukhov, et Hellen 1998; Mitchell et Lorsch 2008; Miyasaka, Endo, et Shimizu 2010; Spilka et al. 2013) dont la mise en place au niveau de l'extrémité 5' des ARN requiert au préalable l'engagement d'un complexe de pré-initiation pour que le complexe 48S assure l'initiation de la traduction des ARNs et la reconnaissance du codon AUG initiateur par eIF1 et eIF1A.

Le complexe de pré-initiation passe par le recrutement d'un complexe ternaire par EIF1 et EIF1A, pour la formation du complexe 48S avec l'ARNm (Figure 17A). L'extrémité C-terminale de EIF1AX permet avec EIF1 de maintenir ouverte la sous-unité ribosomique 40S pour fixer le complexe ternaire (TC) : ARN de transfert initiateur méthionylé (Met-tRNAi), eIF2 α , β , γ (Martin-Marcos et al., s. d.) (Figure 17 A). L'extrémité C-terminale de EIF1AX contient une séquence impliquée dans le scan de l'AUG initiateur (Scanning enhancer elements, SE) maintenant le complexe TC ouvert. Des mutations dans cette région peuvent perturber la fonction du TC et favoriser la reconnaissance d'autres sites AUG initiateur (Saini et al. 2010) (Figure 18). L'extrémité N-terminale de EIF1AX interagit avec EIF5 et EIF2 β ce qui a pour effet de limiter l'identification d'autres sites AUG pour initier la transcription, en interagissant avec le codon et l'anti-codon. L'extrémité N-terminale contient des séquences inhibitrices (SI1 et SI2) qui ont un effet antagoniste sur les séquences SE, des mutations dans ces domaines ont suggéré un « by-pass » d'un AUG en amont. Des mutations du gène EIF1AX, codant pour la protéine EIF1A (Eukaryotic translation initiation factor 1A) ont été identifiées dans 13% des mélanomes de l'uvée : substitution sur les codons G8E/R, G9D, K10E, R13C G15D (Figure 18) (Martin et al. 2013; Robertson, Shih, et al. 2017), mais aussi dans d'autres cancers comme les cancers séreux de l'ovaire (13% (Etemadmoghadam et al. 2017)) et dans les carcinomes papillaires de la thyroïde (1%, (Agrawal et al. 2014), A113_splice mutation (Karunamurthy et al. 2016; Gargano et al. 2021)). L'incidence des mutations EIF1AX comme celle de SF3B1/SRSF2 est probablement sous-estimée du fait que les tumeurs de petites tailles sont traitées par radiothérapie/proton-thérapie et ne font pas l'objet de biopsie.

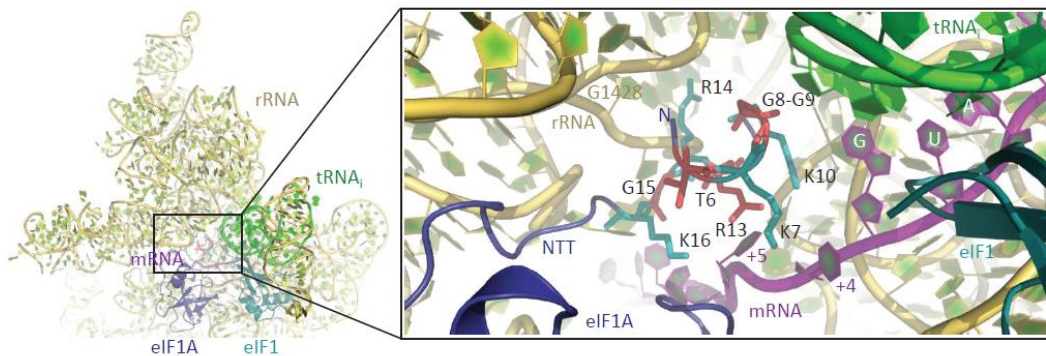
Figure 17: Rôle de EIF1AX dans l'initiation de la traduction.

Extrait de Martin-Marcos, et al 2017.

A.



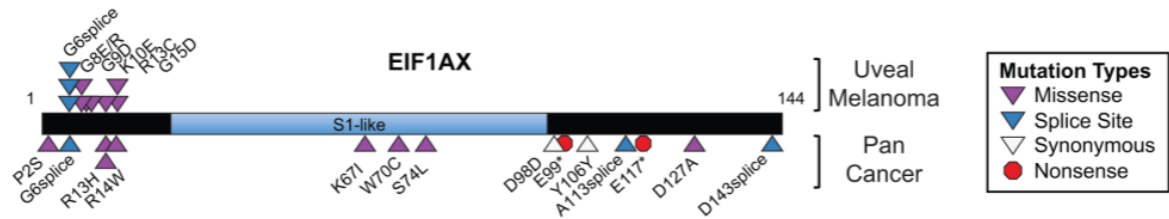
B.



Les résidus eIF1A-NTT associés à UM sont censés participer à la stabilisation de l'état P 'In' de la conformation fermée du 48S PIC. A) Modèle décrivant les réarrangements conformationnels connus du PIC (translation pre-initiation complex, complexe de pré-initiation de la traduction) pendant le balayage et la reconnaissance du codon de départ. (i) eIF1 et les éléments facilitant le scan (Scanning Enhancer elements, boules bleues) dans la queue C-terminale (CTT) de eIF1A stabilisent une conformation ouverte de la sous-unité 40S à laquelle TC se lie rapidement. (ii) La PIC 43S dans la conformation ouverte scanne l'ARNm pour le codon de départ avec Met-tRNA_i Met lié dans l'état P_{OUT}. eIF2 peut hydrolyser le GTP en GDP.Pi, mais la libération de Pi est bloquée par eIF1. La queue N-terminale (N-terminal tail, NTT) de eIF1A interagit avec le eIF5-CTD. (iii) Lors de la reconnaissance de l'AUG, le Met-tRNA_i Met passe de l'état P'_{OUT}' à P'_{IN}', entrant en collision avec eIF1 et le CTT de eIF1A, provoquant le déplacement du CTT de eIF1A du site P, la dissociation de eIF1 de la sous-unité 40S, et la libération de Pi par eIF2. Le NTT d'eIF2β interagit avec le CTD d'eIF5, et le NTT d'eIF1A, portant des éléments inhibiteurs de balayage (SI), interagit avec l'hélice codon : anticodon. (Ci-dessus) Les flèches résument qu'eIF1 et les éléments SE d'eIF1A favorisent le P 'OUT' et empêchent la transition vers l'état P 'IN', tandis que l'élément SI d'eIF1A dans le NTT stabilise l'état P 'IN'. (Adapté de (Hinnebusch, 2014). B) Partie agrandie de la structure PIC py48S (PDB 3J81) montrant les contacts établis par l'eIF1A-NTT (nuances de bleu et de cyan) dans la conformation fermée / P 'IN'. Les chaînes latérales des résidus NTT substitués dans l'UM (rouge) ou entrant directement en contact avec l'ARNr 18S (jaune), l'ARNt (vert) ou l'ARNm (violet) sont représentées par des bâtons.

Figure 18: Répartition des principales mutations identifiées dans *EIF1AX*.

Extrait de Johnson, et al 2017.

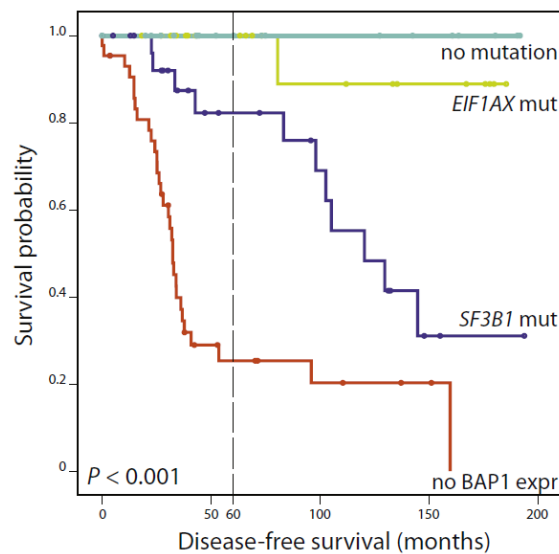


Distribution des mutations *EIF1AX* observées dans une cohorte de 52 UM en comparaison d'autres cancers (comme rapportées par <http://www.tumorportal.org>).

Contrairement aux mutations $G\alpha_q$, les mutations de *BAP1*, *SF3B1/SRSF2* et *EIF1AX* (événement BSE), sont associées à des risques métastatiques différents (Yavuziyigitoglu et al. 2016) (Figure 19). Les travaux de Yavuziyigitoglu et al, ont montré après un long suivi de près de 200 mois de 133 mélanomes uvéaux que les UM ayant perdu l'expression de *BAP1* avaient le pronostic le plus sombre (20% de décès à 60 mois). Bien que de précédentes études aient montré que les mutations *SF3B1* soient de bon pronostic après 3 ans (Harbour et al. 2013), les métastases surviennent mais effectivement plus tardivement. Les mélanomes uvéaux mutés *EIF1AX* sont corrélés à un meilleur pronostic (Yavuziyigitoglu et al. 2016).

Figure 19: Courbe de survie selon la présence d'altérations de *BAP1*, *SF3B1* et *EIF1AX*.

Extrait de Yavuziyigitoglu, et al 2016.



Courbes de Kaplan-Meier montrant la survie sans progression pour les statuts *EIF1AX*, *SF3B1* et *BAP1*. La courbe de survie pour le statut de mutation basé sur les clusters a montré des modèles de survie distincts pour chaque groupe ($P < 0,001$).

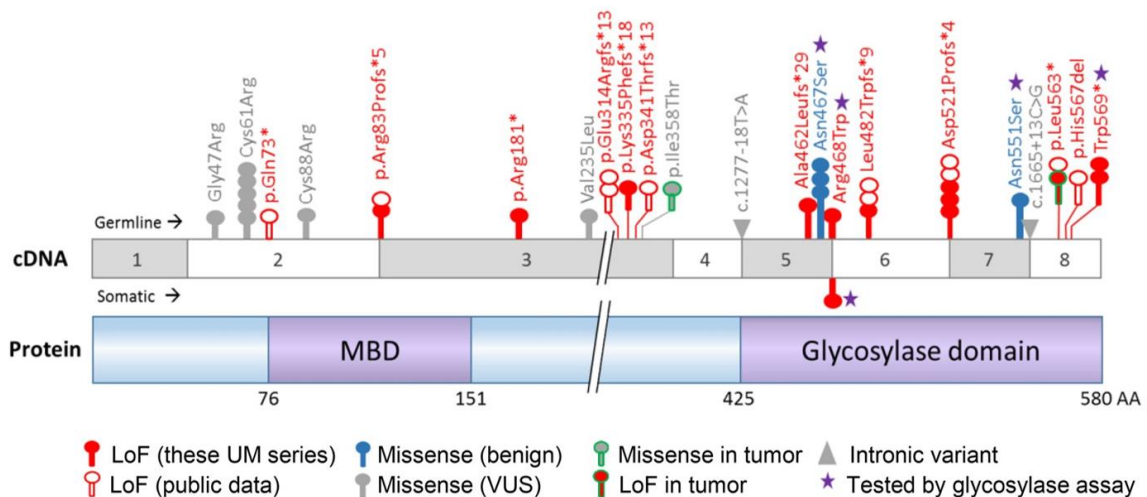
MBD4

Récemment les travaux du Dr Manuel Rodrigues ont mis en évidence des mutations du gène *MBD4* dans quelques cas de mélanomes uvéaux (M. Rodrigues, Mobuchon, Houy, Fiévet, et al. 2018). *MBD4* (précédemment appelé *MED1*), localisé sur le chromosome 3, code une ADN glycosylase impliquée dans l'étape initiale du « DNA base excision repair » (Tricarico et al. 2015). Lors de l'analyse génomique de la tumeur primaire et de la métastase d'une patiente ayant répondu à un traitement par immunothérapie (anti-PD1), les échantillons présentaient un profil hyper muté avec plus de 266 SNV, et un profil de mutations CpG>TpG. Etant donné ce profil mutationnel CpG>TpG, des altérations dans les enzymes en charge de la réparation des déaminations ont été recherchées (*TDG* et *MBD4*), et une délétion conduisant à un décalage du cadre de lecture a été identifiée dans *MBD4*. Cette délétion étant associée à une monosomie du chromosome 3, a conduit à une perte de fonction de *MBD4* dans les cellules tumorales. D'autres altérations de *MBD4* conduisant à la perte de fonction ont d'ailleurs été retrouvées dans un cas UM de la cohorte TCGA qui présente également une monosomie du chromosome 3 et un profil hyper muté. Dans ce cas, la tumeur possède une mutation sur un site d'épissage conduisant à la perte de l'exon 7 de *MBD4*.

D'autres tumeurs, comme des glioblastomes, ont été identifiées avec un profil hyper muté, avec un profil mutationnel de type CpG>TpG (M. Rodrigues, Mobuchon, Houy, Fiévet, et al. 2018; M. Rodrigues, Mobuchon, et al. 2019; M. Rodrigues, Mobuchon, Houy, Derrien, et al. 2018).

Figure 20: Répartition des mutations *MBD4*.

Extrait de Derrien, et al 2020.

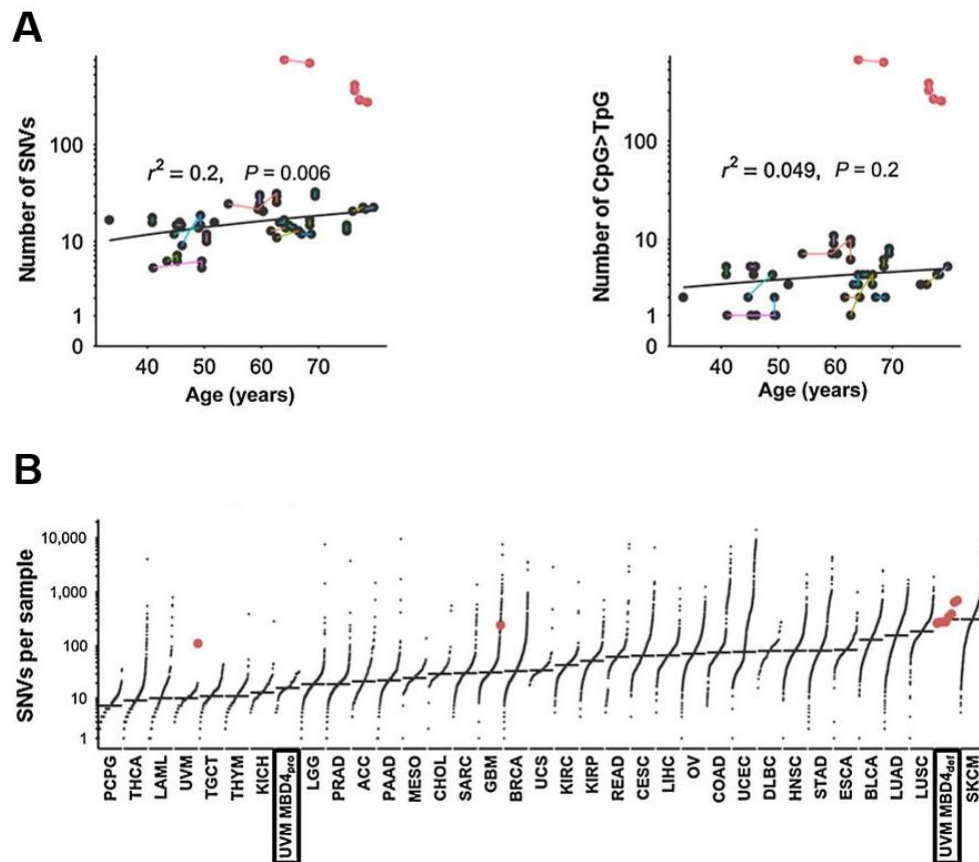


Représentation schématique des séquences de l'ADNc *MBD4* (en haut) et de la protéine (en bas). Le domaine fonctionnel de liaison au groupement méthyle (MBD) et le domaine glycosylase sont indiqués. La position de tous les variants *MBD4* identifiés dans les deux séries de mélanomes uvéaux (UM) (séries consécutives de mélanomes uvéaux germinaux et séries de tumeurs monosomiques 3 [M3]) est mise en évidence, avec les variants germinaux et somatiques au-dessus et au-dessous de la séquence d'ADNc, respectivement, et les deux variants de la cohorte de tumeurs M3 d'origine somatique ou germinale encadrés en vert. Ces variants *MBD4* comprennent des variants de type perte de fonction (LoF, en rouge), missense (soit bénignes, dans les cercles remplis de bleu, soit de signification biologique inconnue [VUS] dans les cercles remplis de gris) et introniques (triangles gris). Chaque cercle représente un patient porteur d'un variant. D'autres variants délétères germinaux *MBD4* extraits de données publiques sont également représentés (cercles rouges vides).

Bien qu'il semble que le taux de mutations par Mb comme le taux de mutations sur les CpG>TpG aient tendance à augmenter avec l'âge, les mélanomes de l'UV ont une charge mutationnelle bien plus importante lorsque *MBD4* est muté. Il est intéressant de noter que la charge mutationnelle observée dans les tumeurs primaires et leurs métastases appariées reste stable selon si *MBD4* est fonctionnel ou non (Figure 21 A). De plus, la charge mutationnelle des mélanomes uvéaux mutés *MBD4* est comparable à celle des mélanomes cutanés (Figure 21B) (M. Rodrigues, Mobuchon, et al. 2019).

Figure 21: Charge mutationnelle des mélanomes uvéaux selon la présence de mutation de *MBD4*.

Extrait de Rodrigues, et al 2019.



A) Graphiques représentant la charge mutationnelle (à gauche) et les transitions CpG>TpG (à droite) dans les mélanomes uvéaux primaires et métastatiques (axe des ordonnées) en fonction de l'âge au moment du prélèvement (axe des abscisses). Les statistiques ont été calculées en considérant un seul point moyen pour toutes les tumeurs d'un patient donné à un moment donné. B) Charge mutationnelle dans les UM *MBD4*-proficients et *MBD4*-déficients de la série par rapport à une cohorte pan-TCGA. Les échantillons de cette série sont encadrés. Les tumeurs *MBD4*-déficients de cette série et de TCGA sont représentées par des points rouges.

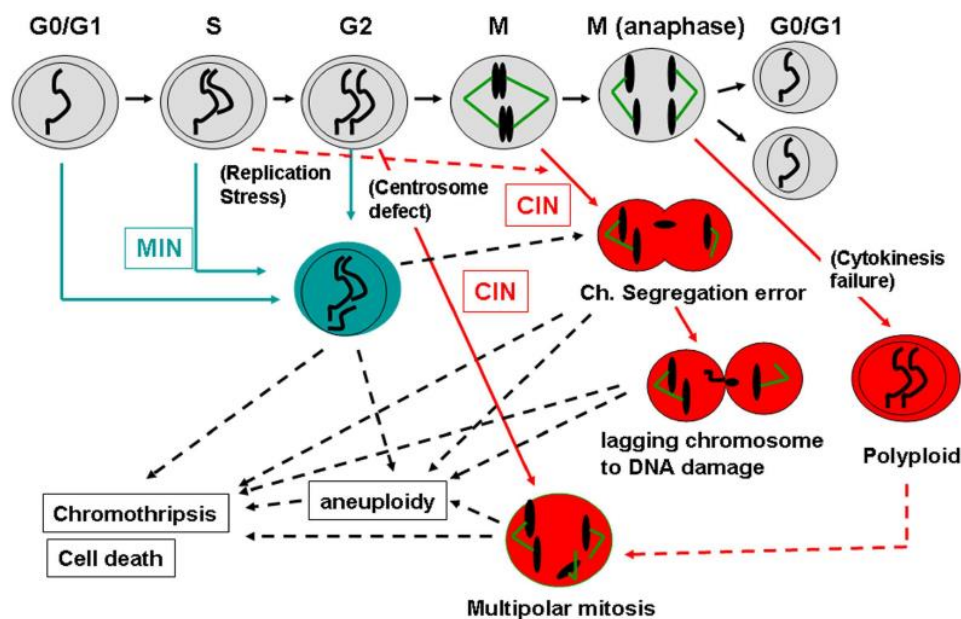
d. Altérations structurales du génome, et du nombre de copies des mélanomes de l'uvée

De façon générale, au cours des divisions cellulaires et plus particulièrement au cours de la réplication du génome et de son contrôle ou durant l'étape de ségrégation des chromosomes, des erreurs peuvent survenir donnant lieu à des réarrangements de la structure du génome (insertions, duplications, inversions, translocations), ou à des changements du nombre de copies (gains ou pertes) (Hartwell 1992; Bayani et al. 2007) (Figure 22).

Les changements structuraux du génome peuvent survenir au niveau de séquences répétées en tandem et/ou présentes à plusieurs emplacements du génome, créant de fortes régions d'homologie : répétitions de séquences riches en GC des mini/microsatellites et des séquences Alu (AGCT), séquences répétées centromériques ((GGAAT)_n), sites fragiles (104 sites fragiles dans le génome, de 50kb-1Mb, riches en GC et contenant des îlots CpG). Les réarrangements de la structure (séquence) du génome peuvent être causés par des aberrations des voies de la réparation de l'ADN telles que les voies du *nucleotide excision repair* (NER), *base excision repair* (BER), ou *mismatch repair* (MMR), par inactivation de gènes tels que *MLH1*, *MSH2* donnant lieu à une instabilité type MSI (*microsatellite instability*). Des défauts de la réparation de cassures doubles brins peuvent être dus à un dysfonctionnement du complexe MRE11, RAD50 et NBS1 (MRN) impliqué dans l'initiation de la recombinaison homologue. L'instabilité chromosomique peut être liée aussi à des défauts de maintenance des télomères donnant lieu à des associations de chromosomes et une hétérogénéité chromosomiques (présence de chromosomes dicentriques (Ta et al. 2013; Gisselsson et al. 2000; M'kacher et al. 2020)). L'organisation des chromosomes dans le noyau et leur proximité peut également causer des réarrangements associés à des changements de topologie (Parada et al. 2002). Ces changements de topologie peuvent modifier l'expression de gènes dont la fonction participe à la ségrégation des centromères, des télomères (Mai et Garini 2006) ou des chromosomes. Des changements de topologie peuvent être dus à des altérations dans le complexe cohesin formant les boucles de l'ADN (*Sgo1*, Cohesin complex) (Minchell, Keszthelyi, et Baxter 2020). Par ailleurs il a été montré que l'hypo-méthylation de certaines régions comme les transposons, ou certains gènes comme *cMYC* favorise également la recombinaison (Eden et al. 2003). Outre les défauts liés à la réplication de l'ADN, des erreurs de ségrégation durant la mitose (défaut de formations des centrioles, défauts liés à la ségrégation lors de l'anaphase, de la télophase ou de cytokinèse) peuvent conduire à des défauts du nombre de copies, correspondant à une instabilité numérique et une aneuploïdie.

Figure 22: Cycle cellulaire et perturbations donnant lieu à une instabilité génomique.

Extrait de Rao, et al 2013.



La progression normale du cycle cellulaire suit les phases G0/G1, S, G2 et M (illustrées en haut par des cellules grisées). La MIN (Micro/Mini satellite instability) est causée par un défaut de réparation et/ou de réplication de l'ADN, et a probablement lieu pendant les phases G0/G1, S ou G2 du cycle cellulaire (illustrées en bleu). L'altération chromosomique de type MIN ou ses causes sous-jacentes peuvent également entraîner des erreurs mitotiques et des CIN (Chromosome Instability, Burrell et al., 2013). La CIN est causée par un événement dans la mitose conduisant à une erreur de ségrégation chromosomique (par exemple : un défaut du kinétochore, un défaut du point de contrôle du fuseau mitotique, un défaut de cohésion chromosomique ; représenté en rouge). La CIN peut également être causée par un événement survenant dans une phase pré-mitotique et entraînant une erreur mitotique (par exemple : un stress de réplication pouvant affecter la structure chromosomique mitotique, une mauvaise régulation du centrosome entraînant une mitose multipolaire). La mauvaise ségrégation chromosomique médiée par la CIN peut conduire à des lésions de l'ADN, directement causées par la machinerie de la cytokinèse ou au cours du processus de chromothripsie (Janssen et al., 2011 ; Crasta et al., 2012). Les échecs de la cytokinèse et l'élimination subséquente de la cellule en fonction de p53 entraînent la génération d'une cellule apolyploïde. La polyploïdie peut conduire à des cellules aneuploïdes dans la descendance via une mitose multipolaire (Shi and King, 2005). Puisque p53 est impliqué dans la régulation et le regroupement des centrosomes en plus de l'élimination des cellules aneuploïdes/polyploïdes, la perte de p53 peut permettre un cycle polyploïde-multipolaire-mitose-aneuploïde, ce qui serait hautement préjudiciable à l'intégrité génomique.

Depuis de nombreuses années, il est admis que les mélanomes de l'uvée sont plutôt stables d'un point de vue génétique, et nos travaux confirmés par les données du TCGA ont montré que les UM présentent peu de mutations par Mb à l'exception de ceux qui

sont mutés dans *MBD4* (Furney et al. 2013; Robertson, Shih, et al. 2017; M. Rodrigues, Mobuchon, et al. 2019).

Les analyses génomiques d'abord menées par des analyses cytogénétiques de faible résolution soit par FISH soit par CGH puis par CGH-array, ou SNP array puis plus récemment par séquençage massif (ciblé ou génome entier) ont montré que la plupart des UM étaient diploïdes mais qu'ils comportaient des anomalies chromosomiques récurrentes : pertes totales ou partielles du chromosome 3 (monosomie 3 ou 3p-) pour environ la moitié des cas, des gains du 6p et 8q, des pertes du 6q et 8p, ainsi que des anomalies des chromosomes 1, 2, 16 et 20. Ces études ont d'abord mis en évidence l'importance du statut du chromosome 3, du fait de l'association de la monosomie du chr3 au risque métastatique élevé (Prescher et al. 1996). Dans ces travaux, la disomie du chromosome 3 correspond à deux copies distinctes du chromosome 3, la perte d'un des deux chromosomes entiers correspond à une monosomie 3. L'usage de puces interrogeant des SNP (*single nucleotide polymorphism*) pour la cartographie des altérations du nombre de copies dans l'UM, a permis d'identifier des pertes d'hétérozygotie (LOH), et qualifier la présence d'isodisomies des lors que deux copies identiques du chromosome 3 (LOH) sont présentes (Trolet et al. 2009; M. Rodrigues et al. 2020). L'inactivation bi-allélique de *BAP1* (3p21.1), perte d'un allèle suivi d'une perte de fonction sur le deuxième allèle, explique en partie le risque métastatique élevé du fait du caractère suppresseur de tumeurs de *BAP1*. Néanmoins, parmi les UM avec monosomie du chromosome 3, des cas sans mutation de *BAP1*, sont observés suggérant la présence d'autres gènes altérés sur le chromosome 3 qui expliqueraient le risque métastatique associé à la perte du chromosome 3. Il pourrait s'agir soit d'autres gènes mutés sur des régions importantes de régulations conduisant à leur modification d'expression, soit d'une haplo insuffisance conduisant à des défauts de dosage génique qui serait associée à un risque métastatique important (van Gils et al. 2008; Tschentscher et al. 2003). Hormis la présence de *BAP1*, *MBD4*, d'autres gènes présents sur le chromosome 3 ont été proposés comme impliqués dans le processus oncogénique du fait d'une LOH ou d'une dérégulation de leur expression dans des UM sans monosomie du 3, les gènes *MLH1* (3p21.1), *FANCD2* (3p25.3) impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN ou encore, *WDR48* (3p22.2), ou *XPC* (3p25.1) (Dopierala et al. 2010; Dogrusöz et al. 2019). Bien que certains gènes aient été identifiés puis utilisés pour définir une signature transcriptomique des formes à haut risque (*EIF1B*, 3p22.1 ; *LMCD1*, 3p25.3 ; *ROBO1*, 3p12.3 ; *SATB1*, 3p24.3, ou *FXR1*, 3q26.33) (Onken et al. 2004), aucun gène autre que *BAP1* et *MBDA* n'a encore été identifié sur le chromosome 3 comme jouant un rôle dans le risque métastatique de façon certaine.

Une délétion partielle du chromosome 3 a été rapportée dans une analyse récente comme présente dans 4% des UM, impliquant trois loci : 2 deux sur le bras court dont

un comprenant *BAP1* et 200 autres gènes (3p22.1-p14.2, hg18) et le second en 3pter-3p22, ainsi qu'un troisième en 3q13.2-q24. Cette étude montre que les altérations du chromosome 3 sans mutation dans *BAP1* étaient de meilleur pronostic, et que la perte de la région incluant *BAP1* et le gain du 8q sont corrélés aux risques métastatiques les plus importants (M. Rodrigues et al. 2020). La présence d'isodisomie du chromosome 3, donnant lieu à une perte d'hétérozygotie (LOH, a été identifiée comme associée à un risque métastatique intermédiaire,) (W. Lin et al. 2021; White, McNeil, et Horsman 1998; Christopher et al. 2011). Malheureusement la détection de cette anomalie est peu évaluée en routine clinique (M. Rodrigues et al. 2020; Christopher et al. 2011).

De façon intéressante, il a été également été rapporté que la perte du chromosome 3 pouvait être hétérogène. L'hétérogénéité de la monosomie 3 a été mise en évidence chez une faible fraction cellulaire ayant alors un génome triploïde et une disomie du 3 en combinant l'analyse par FISH sur du matériel frais (ponctions à l'aiguille) et sur du matériel fixé (biopsies fixées et incluses en paraffine) (Mensink et al. 2009; White, McNeil, et Horsman 1998). Bien que d'autres travaux aient montré des hétérogénéités plus importantes (Dopierala et al. 2010; M. Y. Chang et al. 2013), la monosomie du chromosome 3 présente dans au moins 30% des cellules analysées est associée à un mauvais pronostic.

Les altérations du chromosome 8, principalement la perte du bras court (Onken, Worley, et Harbour 2008) et le gain fréquent du bras long (Horsman et White 1993) sont associées au pronostic. Le gain du 8q est associé à un risque métastatique élevé et ce en particulier quand il est associé à une altération du chromosome 3 (Damato, Dopierala, et Coupland 2010; Dopierala et al. 2010; Royer-Bertrand et al. 2016). Le gain du 8q identifié dans la moitié des cas d'UM, peut-être un gain de la région terminale du 8q, mais est très souvent associé à un iso-chromosome 8q, ou une polysomie du 8. La région minimale gagnée du 8q est localisée près de la région télomérique et n'inclut pas le gène *MYC*. Cependant très souvent les gains du bras long du chromosome 8 contiennent l'oncogène *MYC* (Parrella et al. 2001), et d'autres gènes d'intérêt comme *PTPT4A3* (qui contribue très probablement à l'agressivité des UM (C. Laurent et al. 2011; Y.-X. Lian et al. 2012; Maacha et al. 2013; Duciél et al. 2019)), ou *PRKDC* (8q11.21) et *NBN/NBS1* (8q21.3) qui sont impliqués dans la réparation des cassures double brins (Dogrusöz et al. 2019; Ehlers et Harbour 2005; Syed et Tainer 2018). *DDEF1* ou *ASAP1* (8q24.21-8q24.22) ont également été montrés comme associés à un risque métastatique (Ehlers et al. 2005; Furman et al. 2002) et dont la surexpression participerait à l'activation de la voie FAK (Yunhao Liu et al. 2002), et favoriserait la motilité cellulaire (Furman et al. 2002). Enfin d'autres gènes proches de *MYC* dont l'expression est dérégulée, ont également été rapportés dans l'UM : *POU5F1B* (8q24.21) pseudogène de *POU5F1/OCT4*, impliqué dans plusieurs cancers ;

LRATD2/FAM84B (8q24.21), *TRIB1* (8q24.21), *LOC100130231/ LINC00861* (8q24.13), *LOC100507056/CCAT1* (8q24.21), and *LOC727677/CASC8* (8q24.21) (Royer-Bertrand et al. 2016).

Les altérations du chromosome 6 sont fréquentes et comprennent le gain du bras court et la perte du bras long. Le gain du 6p est globalement associé à la disomie du chromosome 3 et a un meilleur pronostic alors que la perte du 6q est associée à la monosomie du chromosome 3 et a un risque métastatique élevé. (Robertson, Shih, et al. 2017).

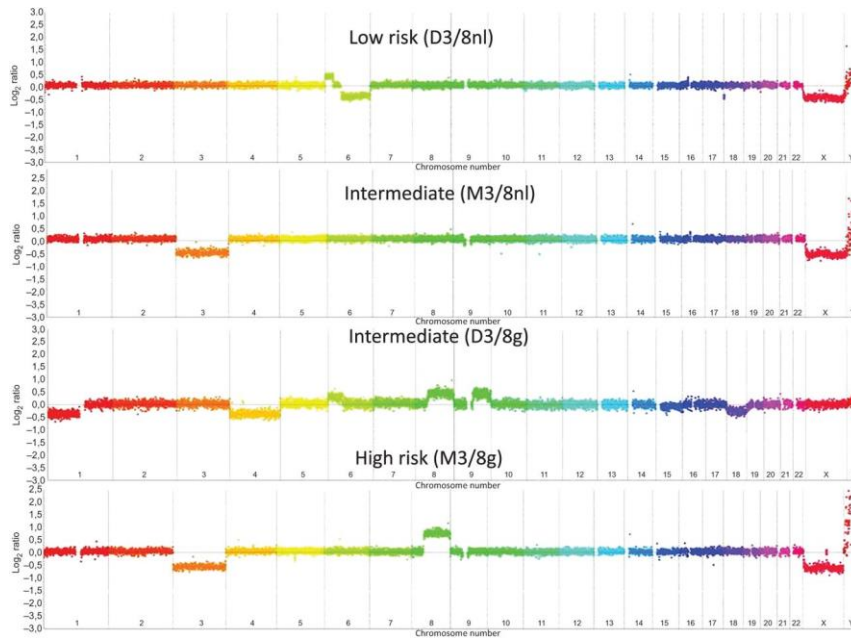
D'autres altérations du nombre de copies des chromosomes 1p-, 10, 9p-, 7q+, 11q+, 15p-, 15q-, 13, 16q-, 21-, 22p1 et chromosomes sexuels ont été décrites mais sont dans l'ensemble moins fréquentes et ne semblent pas corrélées avec la survie (Trolet et al. 2009; Royer-Bertrand et al. 2016; Scholes et al. 2001; Kilic et al. 2006).

Les caractérisations des altérations du nombre de copies ont permis de définir des signatures moléculaires basées sur les altérations du génome. Les travaux de la Pr Nathalie Cassoux (Cassoux et al. 2014) ont permis de proposer une classification des UM en 4 groupes : les formes à faible risque métastatique (disomie 3, 6p+, 6q-), deux groupes distincts de risque métastatique intermédiaire (selon la présence d'une monosomie 3 ou un gain du 8q), et un groupe à haut risque métastatique pour les UM ayant une monosomie du 3 et un gain du 8q (Figure 23A et B). L'intégration des données de mutations sur les gènes *BAP1*, *EIF1Ax*, *SF3B1*, des altérations génomiques et des risques métastatiques permet d'établir un modèle de progression tel que celui présenté en Figure 24. Plus récemment, les travaux des équipes des Drs Boris Bastian, et Marc-Henri Stern ont décrit l'évolution et l'hétérogénéité des altérations génomiques des mélanomes uvéaux en analysant une ou plusieurs régions de tumeurs primaires et une à plusieurs métastases chez 35 ou 25 patients (M. Rodrigues, Mobuchon, et al. 2019; Shain et al. 2019).

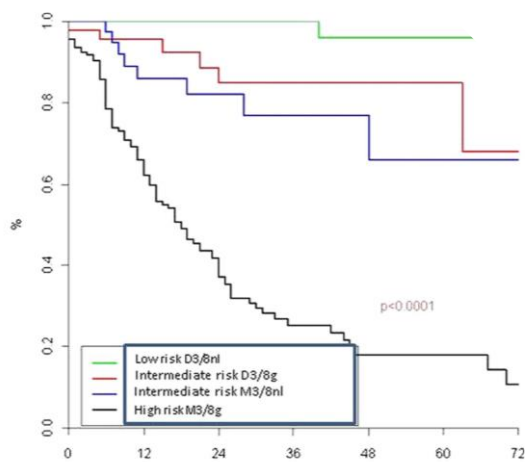
Figure 23: Altérations et signatures génomiques dans le mélanome uvéal.

Extrait Cassoux N, et al. Br J Ophthalmol. 2014.

A.



B.



A : Quatre exemples de profils d'hybridation génomique comparative Nimblegen 4×72 K (array-CGH). Du haut vers le bas : profils des groupes D3/8nl, M3/8nl, D3/8nl et M3/8 g. Dans ces profils array-CGH, chaque point représente le niveau moyen des sondes sur 400 kilobases. Les déséquilibres chromosomiques sont présentés en rapport log₂. B : Intervalle sans métastase en fonction des résultats génomiques : M3/8nl (disomie 3, ch 8 normal) ; D3/8g (disomie 3, gain ch8); M3/8nl (monosomie 3 ch.8 normal) et M3/8g (monosomie 3 et ch 8 gain).

Figure 24: Altérations somatiques associées significativement aux différents sous-groupes d'UM.

Extrait de Bakhoun, 2019.



Vue d'ensemble des sous-types d'UM. Les classes pronostiques peuvent être déduites des altérations du nombre de copies somatiques (SCNA), des altérations génétiques ou de l'expression génétique. La classification A, B, C et D a été suggérée pour éviter toute confusion entre la classification numérique proposée par le TCGA et le test commercial basé sur l'expression des gènes (classification GEP, Dr W. Harbour, DecisionDx-UM, Castle Biosciences).

e. Signature transcriptomique pour la classification des UM

Les travaux de William Harbour en 2004 ont mis en évidence une signature transcriptomique d'abord composée de 65 gènes puis de 12 gènes distinguant les mélanomes uvéaux à faible risque métastatique (classe 1) des mélanomes uvéaux à haut risque métastatique (classe 2) (Onken et al. 2004; Harbour 2014; Onken, Worley, et Harbour 2010). Parmi cette signature de 12 gènes ($FC > 5$, p -value 0.001), 4 sont surexprimés et 8 sous-exprimés dans la classe 2. Parmi les gènes sous exprimés dans la classe 2, 5 sont présents sur le chromosome 3 (*EIF1B*, *FXR1*, *LMCD1*, *ROBO1* et *SATB1*), et un est sur le bras long du 8q (*MTUS1*). Cette signature a été proposée pour simplifier le diagnostic moléculaire, plus précis dans la prédiction du risque métastatique que les informations clinico-biologiques, car l'analyse cytogénétique présente des difficultés d'analyse et peut nécessiter des quantités de matériel importantes (Dopierala et al. 2010; Maat et al. 2007; Field et Harbour 2014). Actuellement, la signature basée sur le test de 12 gènes (Harbour 2014) (DecisionDX-UM (<https://myuvealmelanoma.com>)) est appliquée en routine clinique par les centres nord-américains. En 2012, la signature classe 1/2 a été enrichie d'un sous-groupe dit classe 1b intégrant la surexpression de *PRAME* (Field, Decatur, et al. 2016). *In fine*,

d'après les travaux de Harbour et al, les tumeurs « *Class 1A* » correspondent aux UM avec un faible risque métastatique, ils sont mutés *EIF1AX*, peu remaniés, et disomiques. Les tumeurs « *Class 1b* » sont de pronostics intermédiaires, sont mutées pour *SF3B1* (Yavuzytoglu et al. 2016; Harbour et al. 2013). Les tumeurs « *Class 2* » sont mutées *BAP1* ou ont perdu l'expression de *BAP1*, ont une disomie du chromosome 3 et un gain du 8q, et ils surexpriment également *PRAME*. Les UM de classe 2 présentent une aneuploïdie plus importante. A ce jour aucune cohorte constituée de mélanomes uvéaux n'a directement comparé les signatures génomiques et transcriptomiques.

PRAME (PReferentially expressed Antigen in MElanoma) a été identifié par Ikeda et al en 1997 (Ikeda et al. 1997) comme un nouveau « cancer testis antigen ». La mise en évidence en 2016 de la surexpression de *PRAME* dans l'UM par l'équipe de William Harbour (Field, Decatur, et al. 2016), est venue s'ajouter aux autres cancers, comme les cancers du sein, le neuroblastome, les leucémies ou le mélanome de la peau, dans lesquels *PRAME* a été identifié comme associé aux formes les plus agressives (neuroblastome, leucémie et mélanome uvéal) (Field, Decatur, et al. 2016; Scheffler et al. 2019; Ikeda et al. 1997; Haqq et al. 2005). Des analyses distinctes ont mis en évidence une hypo-méthylation du promoteur de *PRAME* chez des patients atteints de leucémies et de mélanomes uvéaux (Schenk et al. 2007; Field, Durante, et al. 2016).

PRAME semblerait jouer une fonction de facteur de transcription associé à l'ubiquitine ligase CUL3, sur les gènes ayant un motif CCAAT dans leur promoteur (Costessi et al. 2011). Les travaux de Dr Tino Schenk ont montré un lien direct entre l'hypo-méthylation de certains îlots CpG et la surexpression de *PRAME* (Schenk et al. 2007). Bien qu'aucun rôle oncogénique n'ait été montré pour *PRAME*, en particulier dans les formes agressives de plusieurs tumeurs, des travaux suggèrent que lorsque *PRAME*, et l'histone methyl transferase *EZH2* sont activés, ils forment un complexe avec le récepteur nucléaire à l'acide rétinoïque (RAR, comme *RARA*) en présence de son ligand, lequel complexe régulerait alors à la baisse les gènes cibles des RAR (Epping et al. 2005). Dans certains lymphomes ou par exemple *PRAME*, *EZH2* et *RARB* sont surexprimés, il n'a pas été montré de gènes sous-exprimés régulés (Steinbach et al. 2007). Dans un contexte où *EZH2* est surexprimé, l'analyse des positions de H3K27me3 présente un intérêt, ainsi que l'analyse des marques épigénétiques régulant l'expression de *PRAME*, et des gènes qui pourraient être régulés par la co-expression de *PRAME/EZH2*. De façon intéressante, un des analogues de *PRAME* *Gm12794c* a été identifié comme jouant un rôle avec *EZH2* dans la différenciation des cellules souches embryonnaires (ESCs), via la voie dépendante de l'acide rétinoïque (Napolitano et al. 2020). Bien que les interactions de *PRAME* avec *EZH2* restent à éclaircir, *PRAME* présente un intérêt de par sa reconnaissance par des lymphocytes T cytotoxiques via les molécules HLA de type I, lesquelles sont présentes chez 50% des patients métastatiques. Hormis l'expression

de *PRAME* par les cellules de Sertoli des testicules, la surexpression de *PRAME* a été montrée dans des hémopathies et des tumeurs solides autres que le mélanome de l'uvée. Il est à noter que le rôle de tumeur suppresseur ou d'oncogène de *PRAME* semble dépendre du type tumoral et reste globalement à éclaircir.

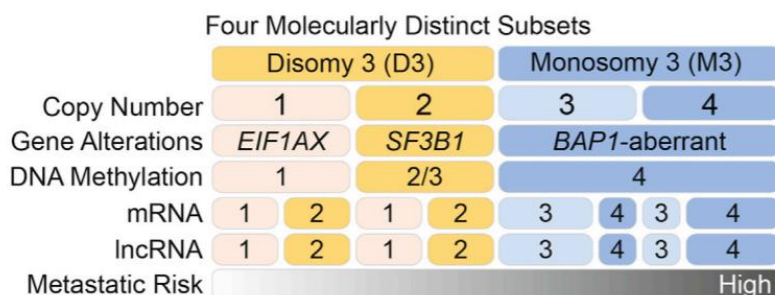
f. Classification moléculaire intégrative

Les efforts du consortium international TCGA ont eu pour objectif de mener, à partir de 2006 l'analyse de plus de 20000 tumeurs primaires pour 33 types de cancers différents, combinant des données d'analyse du génome, de son expression (ARN codant et non codant, protéines) et de sa régulation (méthylation de l'ADN, microARN, et ARN non codants) intégrées aux données cliniques. Les analyses génomiques ont porté sur : la détection de mutations par des approches de whole exome sequencing, de réarrangements structuraux par puces de génotypages (SNP array), la régulation d'ARN codants, non codants par RNAseq principalement ou par microarrays et micro ARN par miRNAseq ou par microarrays, ainsi que la méthylation par des approches de puces de méthylation ; les analyses protéiques ont été réalisées par des approches de RPPA. Le groupe du TCGA UM a mené l'analyse de 80 tumeurs primaires (Robertson, Shih, et al. 2017). Les analyses non-supervisées du nombre de copies, de la méthylation, des ARN, des microARN, des longs ARN non codants ont permis de classer les UM en 4 groupes principaux (Figure 25, Figure 26).

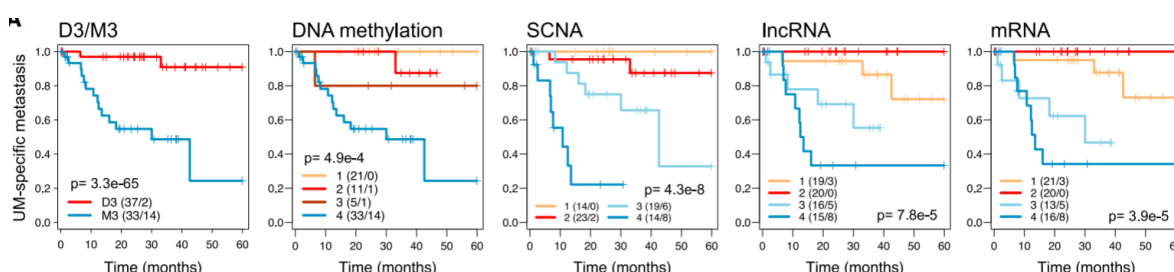
Figure 25: 4 Classes moléculaires identifiées quel que soit le niveau d'analyse du TCGA UM.

Extrait de Robertson et al, 2017.

A.



B.



A) Classification selon le type d'analyse non supervisée réalisée sur les altérations du nombre de copies, DNA méthylation, ARN long ARN non codants. B) Risque métastatique associé selon la présence ou l'absence de monosomie 3, selon la classification basée sur l'analyse de méthylation, selon les altérations structurales, selon la classification d'expression d'ARN non codant ou codant.

L'analyse de mutations a confirmé le faible taux de mutations (moyenne 1.1/Mb), l'absence de signature mutationnelle liée aux UV, l'altération de la voie Gαq dans 99% des cas (78/80) par la présence de mutations mutuellement exclusives de *GNAQ/GNA11*, mutés à 92.5%, *CYSLTR2* à 4% et *PLCB4* à 2.5%. L'étude a confirmé la présence de mutations mutuellement exclusives de *EIF1AX*, *SF3B1*, *SRSF2* et *BAP1*. L'analyse intégrative a montré que la mutation de *EIF1AX* principalement sur la partie N-terminale de la protéine (acides aminés 6 à 15) était associée à une faible aneuploïdie, marquée par soit la présence de monosomie 3 ou de de gain du 8q, et la signature de méthylation du groupe 1. La mutation *SF3B1* associée au groupe 2 de cas d'UM ayant des gains du 8q, et enrichis-en disomie du 3, ce groupe est d'ailleurs assez hétérogène au niveau des profils de méthylation puisque regroupant des profils des groupes 1, 2 et 3. Le profil de méthylation permet néanmoins de séparer les UM mutés *EIF1AX*, *BAP1* des cas *SF3B1/SRSF2*. (Figure 26).

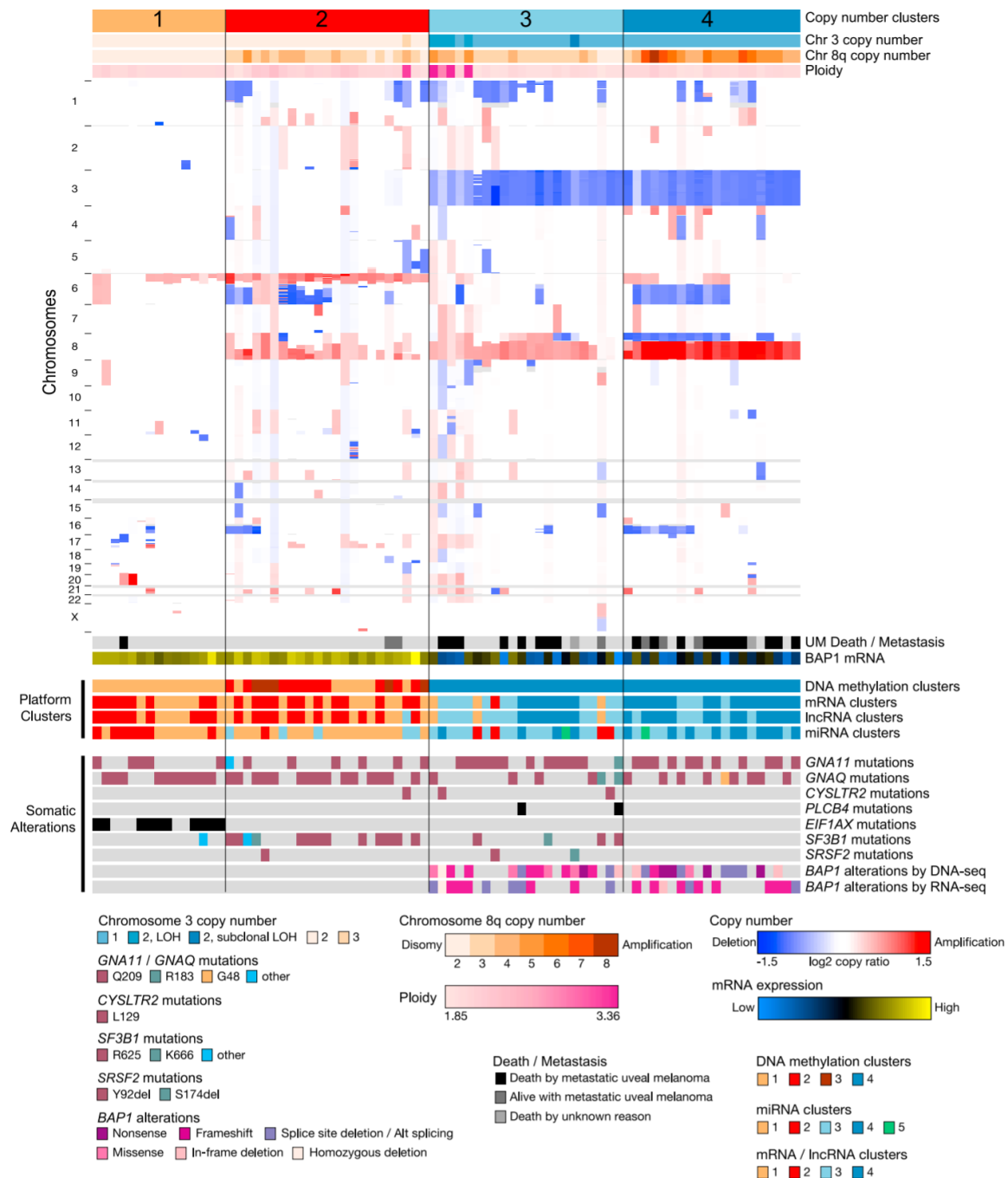
L'analyse transcriptomique menée au niveau des ARN codants, des ARN non codants et des microARN a permis de mettre en évidence 4 groupes distincts dépendant du statut du chromosome 3. L'analyse des voies de signalisation dérégulées a montré l'enrichissement de plusieurs signatures.

Un enrichissement immunitaire dans les UM ayant une monosomie 3 est associé à la surexpression de marqueurs HLA type 1, à un infiltrat immuno-inflammatoire, à la présence de marqueurs lymphocytaire T CD8, définis par l'activation de gènes impliqués dans la voie de l'interféron (*IFNG*, *IFNGR1*, et *IRF1*), de signaux chémoattracteurs (chemokine : *CXCL9*, *CXCL13*), de facteurs immunosuppresseurs (*IDO1*, *TIGIT*, *IL6*, *IL10*, *FOXP3*). La surexpression dans les UM métastatiques *BAP1* déficient, d'inhibiteurs d'immuno checkpoint comme *IDO1* et *TIGI* pourrait expliquer le fait que les lymphocytes T cytotoxiques ne soient pas efficaces comme cela a déjà été rapporté (Figueiredo et al. 2020; Durante et al. 2020). Ces résultats pourraient expliquer l'incapacité des immunothérapies utilisant des anti-CTLA4 ou anti PD1/anti PDL1 dans les formes métastatiques à améliorer la survie des patients. (Danielli et al. 2012; Algazi et al. 2016; Dougall et al. 2017; van der Kooij et al. 2017). Les travaux récents de caractérisation du microenvironnement (Durante et al. 2020) par une approche sur cellules uniques (single cell RNAseq) ont d'ailleurs confirmé que *LAG3* est exprimé par les lymphocytes CD8, plutôt que CTLA et PD1. *LAG3* constitue une cible intéressante (Andrews et al. 2017) et fait l'objet de différents ciblage, au travers d'essais cliniques de phase I à III en monothérapie ou en combo encourageants (Puhr et Ilhan-Mutlu 2019).

De façon intéressante, la surexpression de *MYC* est retrouvée dans le cluster 1 de la signature ARN, associée aux UM ayant une disomie 3 et un 8q normal, et dans le cluster 4 - monosomie 3 et gain du 8q, ce qui montre que l'activation de *MYC* n'est pas liée au gain du 8q. Le facteur de transcription et oncogène *MYC* peut conduire à l'activation ou à la répression de gènes (Napolitano et al. 2020). L'association de *MYC* à son hétérodimère *MAX* conduit à l'activation de gènes portant une séquence CACGTG dans leurs promoteurs dans des régions de la chromatine actives notamment contenues près d'îlots CpG (CGIs) (P. C. Fernandez et al. 2003; Deaton et Bird 2011; Rahl et al. 2010; Kress, Sabò, et Amati 2015). D'après l'analyse du TCGA, le cluster 1 regroupe l'activation de *MYC/MAX* et leurs cibles, alors que le cluster 4 regroupe l'activation de *MYC/MAX/MIZ1* et leurs cibles. De ce fait, le gain du 8q est corrélé à l'activation du complexe *MYC/MAX/MIZ1*.

Figure 26: Analyse intégrative UM TCGA.

Extrait de Robertson et al, 2017.



Le regroupement non supervisé des altérations du nombre de copies somatiques (SCNA) a permis de séparer 80 UM primaires en quatre groupes: 1 (n = 15), 2 (n = 23), 3 (n = 22) et 4 (n = 20), classés par instabilité chromosomique croissante. Les pistes de covariables supérieures montrent les clusters SCNA (1-4), le nombre de copies des chromosomes 3 et 8q, et le niveau de ploïdie. La carte thermique montre le rapport du nombre de copies somatiques (diploïde = 0, blanc). Les pistes de covariables inférieures montrent (i) le résultat clinique; (ii) l'expression de l'ARNm de BAP1; (iii) les clusters non supervisés selon la méthylation de l'ADN, les niveaux d'expression des ARNm, des ARNlc et les microARN; (iv) les mutations dans les gènes de signalisation Gαq, les facteurs d'épissage SF3B1/SRSF2et EIF1AX ; (v) les altérations de BAP1 qui incluent l'épissage alternatif et les réarrangements détectés par l'assemblage des données de DNA-seq et RNA-seq.

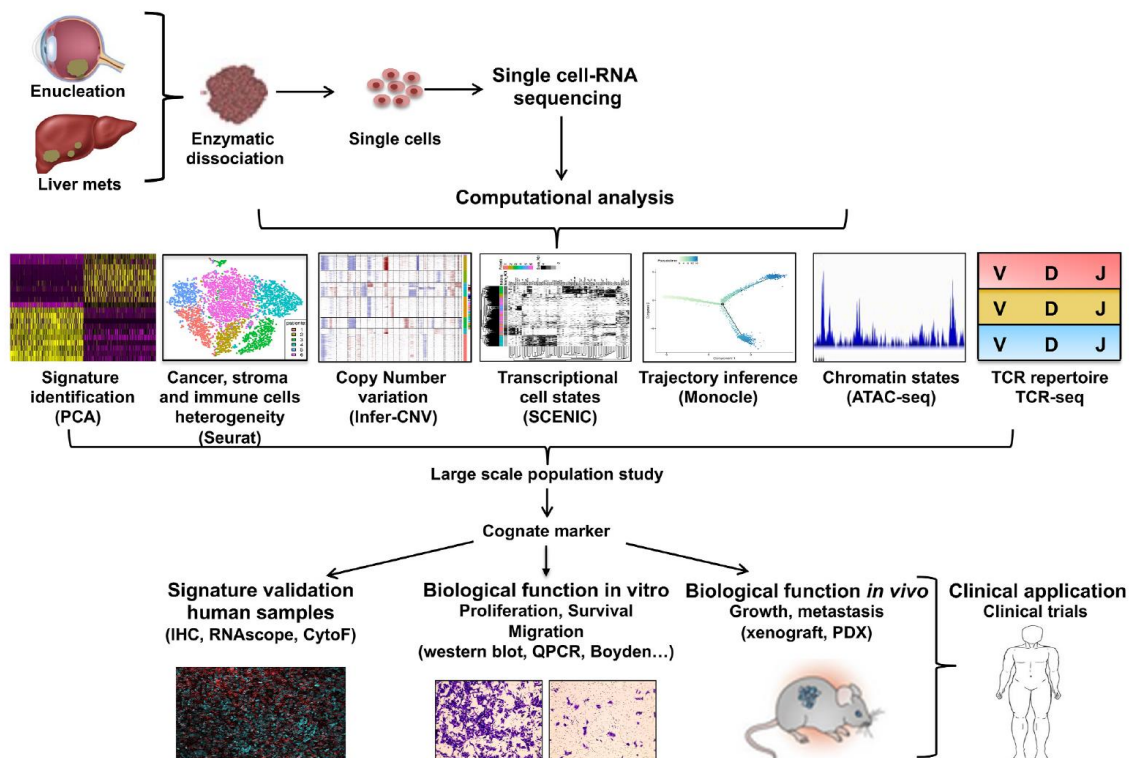
Parmi les autres voies dérégulées dans l'UM mis en évidence par les travaux du TCGA, figurent la voie MAPK/PI3K-AKT, l'hypoxie (surexpression de HIF1a), et la voie de la réparation des dommages de l'ADN (DDR). L'analyse du transcriptome et du protéome a mis en évidence la régulation des voies du DDR, une activation dans le cluster 4 comme *MYC* et *HIF1a*. La voie du DDR est peu détaillée hormis la surexpression d'*ATM*, *RAD50*, *XRCC1* et *ERCC5*. Les auteurs associent l'activation du DDR avec la monosomie 3 et la perte de fonction *BAP1* qui favoriseraient des défauts dans la réparation.

L'apport des analyses multi-omiques à partir de cellules uniques ouvre également de nouvelles opportunités pour évaluer l'hétérogénéité intra-tumorale ainsi que l'hétérogénéité entre différents UM (Figure 27). Les premiers travaux de l'équipe de William Harbour (Durante et al. 2020) ont permis d'identifier les marqueurs exprimés par les cellules immunitaires du stroma en lien avec les cellules tumorales issues de tumeurs primaires et des métastases. Ces premières analyses dans l'UM ont été menées à partir de 59 915 cellules uniques, isolées de 8 tumeurs primaires et 3 métastases. L'analyse des données de RNAseq par une approche t-SNE (*t-distributed stochastic neighbor embedding*) (Maaten et Hinton 2008) a permis d'identifier plusieurs populations cellulaires et une certaine hétérogénéité sur l'expression des gènes, notamment en comparant les tumeurs de classes 1 et 2. L'analyse transcriptomique des cellules uniques par inférence a permis de définir les altérations du nombre de copies de régions génomiques (inferCNV) et la présence de sous-clones avec des aberrations chromosomiques spécifiques, suggérant des évolutions au sein des classes 1 et 2. Cette complexité et cette hétérogénéité inter et intra-tumorales des UM a également été rapportée par l'analyse deux métastases hépatiques d'un même mélanome uvéal (W. Lin et al. 2021). Cette nouvelle étude a révélé : un environnement tumoral variable (infiltrat lymphocytaire hétérogène, infiltrat macrophagique similaire), des voies de signalisations régulées différemment, la présence d'altérations du nombre de copies partagées et la présence d'altérations spécifiques de sous clones au sein de ces 2 métastases (pertes du 1p, 6q, isodisomie 3, gains du 1q, 8q). L'application d'algorithmes pour l'identification de voies dérégulées a permis d'identifier des voies en lien avec l'hypoxie par exemple (X. Zhang et al. 2022). Cette analyse de cellules uniques de tumeurs primaires a permis l'identification de marqueurs connus dans la différenciation mélanocytaire (comme *SOX9*, *SOX10* et *MITF*), dans l'inflammation (*BCL3* ; *CEBPB*), et la dé-différenciation (*JUNB*, *JUND*, *FOS* et *FOSB*). Ces analyses ont également mis en évidence de nouveaux marqueurs, comme *HES6* pouvant être exprimé parfois par un sous-ensemble de cellules tumorales au sein d'une tumeur de bon pronostic et dont l'expression retrouvée dans les métastases est associée à un mauvais pronostic. Ces travaux ont confirmé l'hétérogénéité intra-tumorale et ont mis

en évidence un nouveau marqueur comme cible thérapeutique (Pandiani et al. 2021). Les résultats de ces travaux sont complémentaires de ceux de Dr Durante, dont le contenu en contingent immunitaire était plus variable. L'apport de l'analyse multi-omique à partir de cellules uniques devrait aider à mieux comprendre l'hétérogénéité des UM (Strub et al. 2021), la complexité génomique, et les relations entre les cellules tumorales et leur environnement (Gao et al. 2022).

Figure 27: Possibilité d'analyses multiples à partir de données transcriptomiques de cellules uniques.

Extrait de Strub et al, 2021.



Les analyses et méthodes appliquées pour comparer les données transcriptomiques de milliers de cellules individuelles (scRNAseq) permettent la mise en évidence de marqueurs potentiels et de cibles thérapeutiques puis leur validation fonctionnelle. L'analyse en composantes principales (ACP) est une technique de réduction de la dimensions pour la description graphique de l'information présente dans de grands ensembles de données. L'analyse Seurat est utilisée pour identifier les sources d'hétérogénéité (cancer, stroma et cellules immunitaires) dans les ensembles de données de RNA-seq de cellules uniques et pour identifier des groupes de cellules. InferCNV est utilisé pour explorer la variation du nombre de copies (CNV). SCENIC permet de déduire les réseaux de régulation des gènes et les types de cellules à partir de données scRNAseq. Monocle permet de déduire la trajectoire de cellules individuelles en fonction de leur progression dans un processus biologique. L'ATAC-seq est utilisé pour étudier la dynamique de la chromatine. TCR-seq permet de disséquer la complexité du répertoire des cellules T et reflète directement la diversité des réponses immunitaires. L'intégration complète des données sur les cellules individuelles pourrait permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles pour des applications cliniques.

5. Mélanome uvéal et intérêt du système immunitaire

Associée à la monosomie 3, l'inactivation de *MBD4* a été identifiée dans 2% des cas de mélanomes uvéaux, et donne lieu à une charge mutationnelle élevée. L'inactivation de *MBD4* a été identifiée dans une patiente montrant une réponse exceptionnelle à un anticorps anti-PD1. (M. Rodrigues, Mobuchon, Houy, Fiévet, et al. 2018). La recherche de mutations *MBD4* en routine clinique pourrait permettre d'identifier des patients pouvant bénéficier d'un traitement par immunothérapie (inhibiteurs de « checkpoints ») (Derrien et al. 2020; P. A. Johansson et al. 2019).

La maladie métastatique est celle qui a le pronostic le plus sombre dans le mélanome de l'uvée, sachant que la majorité des cas a une monosomie du 3, un gain du 8q, et est mutée *BAP1*. L'échappement tumoral au système immunitaire passe par l'inhibition de ces récepteurs par l'expression de ligands. Il est intéressant de rappeler que les mélanomes uvéaux se développent initialement dans un organe où l'environnement immunitaire est peu présent, comme dans le cerveau, où la réponse innée et adaptative est réprimée. L'humeur aqueuse produite par les cellules de l'œil, contient des immunosuppresseurs tels que la cytokine MIF (macrophage migration-inhibitory factor), FAS ligand, IDO1/2, le TGFβ et l'α-MSH (Melano Stimulating Hormone) qui bloquent la réponse des cellules NK (Natural Killer) (Streilein 1999; Cone et Pais 2009; Ferguson et Griffith 2007). L'expression de MIF a d'ailleurs pu être quantifiée dans des modèles métastatiques de mélanome uvéal, bloquant la réponse immunitaire, même dans l'environnement hépatique pourtant riche en NK (Repp et al. 2000). Les travaux de Figueiredo et al. (Figueiredo et al. 2020) ont montré la surexpression de gènes immuno-suppresseurs comme *HLA-DR*, *CD38* et *CD74* par les cellules tumorales, la présence de TILs (lymphocytes infiltrant la tumeur) et de TAMs (tumor associated macrophages) surexprimant IDO1 et TIGIT en particulier, proposant ainsi une piste intéressante d'inhibition de cette immuno-résistance (Holmgaard et al. 2013; Machicote et al. 2018; Tosi et al. 2021). Des approches d'analyse de transcriptome de cellules uniques réalisées par l'équipe de Dr William Harbour sur une dizaine de cas d'UM (tumeurs primaires et métastases) ont récemment montré une expression de TIGIT, et LAG3 dans les cellules immunitaires contrairement à CTLA4 et PDL1, et que LAG3 était exprimé de manière plus homogène au sein de populations de NK et de cellules T régulateurs (Durante et al. 2020).

La mise en évidence de néo-épitopes dans les mélanomes uvéaux constitue une autre piste intéressante pour les patients chez qui des mutations pour des facteurs d'épissage tels que *SF3B1*, *SUGP1*, (Alsafadi et al. 2016; Canbezdi et al. 2021; Alsafadi et

al. 2021), SRSF2 (J. Zhang et al. 2015; E. Kim et al. 2015), *SF3B5*, *TAD1A*, *IDH1* ou des facteurs impliqués dans la dégradation des ARN non-sens (NMD (Kurosaki, Popp, et Maquat 2019)) comme *PPP2R1A* (Kahles et al. 2018) sont détectées. Bien que la détection de mutations dans les gènes connus ne soit pas toujours réalisable par manque d'ADN disponible, les signatures transcriptionnelles de défauts d'épissage basées sur des analyses de RNAseq permettent d'identifier des transcrits alternatifs tumoraux, parmi lesquels certains peuvent être traduits en protéines ou polypeptides et produire des néo-antigènes (Alsafadi et al. 2016; Kahles et al. 2018; Bigot et al. 2021; Apcher et al. 2013; Yewdell, Dersh, et Fåhræus 2019). L'existence de néo-transcrits fonctionnels donnant lieu à néo-épitopes communs et partagés par l'ensemble de patients mutés SF3B1 par exemple (publics à l'opposé de transcrits alternatifs privés identifiés dans un seul individu) permet d'envisager des vaccinations utilisant soit des longs peptides soit des vaccins ADN ou ARN. Ces épitopes spécifiques de tumeurs peuvent également être utilisés pour élaborer par exemple des récepteurs des cellules T (TCR) et engager la réponse médiée par lymphocytes T CD8+ lorsque ces peptides sont présentés par le CMH de type I. Dans ce cas des TCR spécifiques solubles reconnaissant les néo-épitopes peuvent être modifiés avec l'ajout d'un domaine anti-CD3 (ImmTAC) et ainsi augmenter la réponse immunitaire comme proposé par Immunocore pour cibler des épitopes de mélanomes (gp100, MAGE A3, NYBR1, NY-ESO-1) (Liddy et al. 2012; Harper et al. 2018).

Parmi les antigènes de surface pouvant être reconnus par les lymphocytes T et exprimés par les cellules tumorales, les cancer testis antigènes (C/T A) ont constitué dès les années 1990 une classe intéressante de cibles à potentiel thérapeutique (Coulie et al. 1993; Van Pel et al. 1995). Les CTA sont exprimés dans les cellules germinales puis réexprimés dans un bon nombre de tumeurs solides comme par exemple les mélanomes cutanés, les cancers du sein, de la prostate, du poumon, et les mélanomes de l'uvée, mais également dans les hémopathies (Jin et al. 2018; van Baren et al. 1999; Mulcahy et al. 1996). La famille des MAGE pour Melanoma-associated antigen gene a été la première classe de CTA décrite, elle est codée par environ 60 gènes répartis en deux catégories, partageant une séquence MAGE de 200 acides aminés. Les gènes codant pour les protéines MAGE de classe 1 (MAGE A, B, et C) sont localisés sur le chromosome X et leur expression est similaire à celle des CTA, car exprimés dans les testicules et le placenta, tandis que les gènes codant pour les protéines MAGE de classe 2 : MAGE-D, -E, -F, -G, -H, -L, et Necdin sont exprimés en plus dans d'autres tissus de l'embryon et de l'adulte). Bien que rapportées comme régulant le cycle cellulaire, les fonctions des MAGEs restent peu étudiées. La mise en évidence en 2016 de la surexpression de PRAME dans les mélanomes uvéaux (Field, Decatur, et al. 2016) représente un rationnel pour l'usage de lymphocytes T modifiés (CAR-T cells ou protéines de fusion bispécifiques TCR/Anti-CD3), comme stratégie thérapeutique. La

mise au point de Caspase 9 inductible dans ces CAR T cells génétiquement modifiées permet de réguler leur action et éviter des effets adverses sévères, ceci grâce à l'ajout d'un agent permettant la dimérisation et l'induction de caspase puis l'apoptose des cellules modifiées (Gargett et Brown 2014). L'essai BPX-701 utilise actuellement cette approche pour cibler les cellules surexprimant PRAME dans le mélanome uvéal (NCT02743611, Figure 28, (Al-Khadairi et Decock 2019)).

Figure 28: Essais cliniques basés sur une thérapie cellulaire anti PRAME.

Extrait de Al-Khadairi et al 2019

NCT Number	Other ID	Intervention	Disease
NCT01333046	H-27471, ACTAL	Multi TAA T cells (NY-ESO-1, MAGEA4, PRAME, Survivin and SSX), and Azacitidine	Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma, Hodgkin disease
NCT02203903	RESOLVE	Multi TAA T cells (WT1, PRAME, and Survivin)	Relapsed/refractory hematopoietic malignancies (ALL, AML, CML, MDS)
NCT02239861	H-35425, TACTASOM	Multi TAA T cells (NY-ESO-1, MAGEA4, PRAME, Survivin, and SSX)	Rhabdomyosarcoma
NCT02291848	H-35626, TACTAM	Multi TAA T cells (NY-ESO-1, MAGEA4, PRAME, Survivin, and SSX)	Multiple myeloma
NCT02475707	H-37042, STELLA	Multi TAA T cells (WT1, PRAME, and Survivin)	Leukemia, ALL
NCT02494167	H-36346, ADSPAM	Multi TAA T cells (WT1, NY-ESO-1, PRAME, and Survivin)	AML, MDS
NCT02743611	BP-011	BPX-701 and Rimiducid	AML, MDS, uveal melanoma
NCT02789228	7497	Multi TAA T cells (WT1, PRAME, and/or Survivin)	Solid tumors
NCT03093350	H-39209, TACTIC	Multi TAA T cells (NY-ESO-1, MAGEA4, PRAME, Survivin, and SSX2)	Breast cancer
NCT03192462	H-40378, TACTOPS	Multi TAA T cells (NY-ESO-1, MAGEA4, PRAME, Survivin, and SSX2)	Pancreatic cancer
NCT03503968	CD-TCR-001	MDG1011	High risk myeloid and lymphoid neoplasms
NCT03652545	REMIND	Multi TAA T cells (WT1, PRAME, and/or Survivin)	Brain tumor

TAA, tumor associated antigen; ALL, acute lymphocytic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; BPX-701, PRAME-TCR T cells with iCasp9; CML, chronic myeloid leukemia; MDG1011, PRAME-TCR T cells; MDS, myelodysplastic syndromes; Rimiducid, homodimerizing tacrolimus analogue.

C. MODELES D'ETUDES DES MELANOMES DE L'UVEE

Des modèles cellulaires *in vitro* et des modèles animaux sont indispensables pour mieux comprendre le développement de la maladie et surtout pouvoir évaluer des nouvelles options thérapeutiques. De nombreux efforts ont été entrepris pour générer des modèles cellulaires et animaux récapitulant le mieux possible la maladie.

Les premiers travaux publiés visant à mettre en place des modèles cellulaires de mélanome uvéal sont ceux de Kirby et al de 1929 (Kirby 1929) permettant de maintenir des cellules en culture sur de courtes périodes. Les travaux d'Albert et al en 1984 (Albert et al. 1984) ont réussi à établir des lignées à partir de cellules de mélanomes uvéaux cultivées avec des fibroblastes irradiés pour éviter qu'ils prédominent dans les cultures, et à l'aide de milieux de culture HBSS complété notamment avec de l'EGF et de la toxine de choléra. Ensuite les travaux de Kan-Mitchell de l'Université du Sud de la Californie – Los Angeles, en 1989 ont permis d'établir des lignées cellulaires (OCM1 et OCM2) à partir de tumeurs primaires énucléées à Miami, tolérant un grand nombre de passages (jusque 300 fois) et permettant d'établir des modèles animaux à partir de xénogreffes chez le lapin (Kan-Mitchell et al. 1989). Ces travaux ainsi que ceux de leurs collaborateurs de Leiden (Luyten et al. 1996; De Waard-Siebinga et al. 1995) ou d'autres laboratoires (Nareyeck et al. 2009) ont permis de montrer qu'un faible nombre de modèles de lignées cellulaires pouvait être établi et maintenu en culture correspondant probablement aux modèles les plus agressifs de mélanomes uvéaux. L'authentification des différents modèles d'UM par l'analyse de séquences répétées en tandem (STR) a permis de s'assurer de l'authenticité de lignées établies, et de clarifier les modèles générés malgré l'hétérogénéité des altérations qui peuvent subsister entre la tumeur et les lignées cellulaires établies (Folberg et al. 2008; Griewank et al. 2012) (Figure 29, Figure 30). La détection de mutations *BRAF* dans certains modèles tels qu'OCM-1 remet en cause l'origine sinon l'usage de ces modèles comme modèles d'études des UM (Jager et al. 2016). La présence de gain partiel du chromosome 8 semble être un trait partagé par les modèles établis (Figure 30) (Jager et al. 2016).

Figure 29: Caractéristiques de modèles cellulaires de mélanomes.

Extrait de Griewank, et al. 2012.

Melanoma marker analysis of uveal melanoma cell lines

	92.1	MEL302	MEL270	OMML3	OMML2.5	UPMM1	UPMM2	UPMM3	OMM1	UPMD1	UPMD2	MEL285	MEL290	UPM4	OCM-1	OCM-3	OCM-8	SP6.5	MUM2C
GNAQ	Q209L (626 A>T)	Q209L (626 A>T) R210K (629 G<A)	Q209P (626 A>C)	Q209P (626 A>C)	Q209P (626 A>C)	R183Q (548 G>A)	Q209L (626 A>T)	Q209P (626 A>C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNA11	-	-	-	-	-	-	-	-	Q209L (626 A>T)	Q209L (626 A>T)	Q209L (626 A>T)	-	-	-	-	-	-	-	-
BRAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V600E	V600E	V600E	V600E	-
Primary	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Metastatic	-	-	-	liver	liver	-	-	-	subcutaneous	-	-	-	-	-	-	-	-	-	liver
Melan-A/NAART-1*	+	nd	+	+	+	nd	nd	nd	+	nd	nd	-	-	nd	+	+	nd	+	nd
gp100**	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	+	nd	nd	-	-	nd	+	+	nd	nd	nd
Tyrosinase**	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	+	nd	nd	-	-	nd	+	+	nd	+	nd
Tyrosinase-related protein-1*	+	nd	+	+	+	nd	nd	nd	+	nd	nd	-	-	nd	+	+	nd	+	nd
Dopachrome tautomerase*	+	nd	+	+	+	nd	nd	nd	+	nd	nd	-	-	nd	+	+	nd	nd	nd
S100β	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	nd	+	+	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	+
HMB-45<	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	nd	+	+	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd
MAOE 1.2.3*	-	-	nd	-	-	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd
MCSP-1>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+/+	+	nd	nd	nd	nd	nd

+ = positive, - = negative, nd = not determined, m = mRNA level determined, p = protein level determined, * determined by ref. Luyten (m), ^ determined by ref. Nareyck (p), < determined by ref. Wang (m,p)

Figure 30: Comparaison des caractéristiques de tumeurs primaires et les modèles établis de mélanomes uvéaux.

Extrait de Jager et al, 2016

CHARACTERISTIC	PRIMARY TUMOR 92-1 (ILA)	CELL LINE 92-1	PRIMARY TUMOR E-143-90 (MEL202)	CELL LINE MEL202	PRIMARY TUMOR E-1268-94 (MEL270)	CELL LINE MEL270	PRIMARY TUMOR E-994-95 (MEL285)	CELL LINE MEL285	PRIMARY TUMOR E-131-96 (MEL290)	CELL LINE MEL290
	Exenteration		I-125 choroidal, very pigmented		I-125 choroidal, large, into optic nerve; nevoid area		ciliochoroidal, mushroom		nervus of Ota choroidal, dome, many vessels	
<i>GNAI1</i> ex4, ex5	WT ^{L,R}	WT ^{26,28,R}		WT ²⁸	WT ^{L,R}	WT ^{28,R}		WT ^{26,R}	WT ^L	WT ^{26,R}
<i>GNAQ</i> ex4, ex5	Q209L 626 A>T	Q209L 626 A>T ^{26,R}		Q209L 626 A>T R210K ²⁸ 629 G>A ²⁸	Q209p ^{L,R}	Q209P 626 A>C ^{28,R}		WT ^{26,R}	WT ^L	WT ^{26,R}
<i>BAP1</i> mutation		WT ^R				WT ^R		WT ^R		WT ^R
BAP1 protein		yes ²⁸		yes ²⁸		(OMM2.5 yes) ²⁸		yes, low†		yes, low†
BAP1 IHC	positive	positive ^R		disomy 3 ^{27,46,L}	negative	positive ^R		positive ^R	positive	negative ^R
Chromosome 3	disomy 3 ¹	disomy 3 ^{1,42}		disomy 3 ^{27,46,L} 51 chrom	monosomy 3 (50%) ^{R,L}	disomy 3 ¹ loss 3p24, loss 3q21.2-3q24 ⁴⁵		loss 3p26-pter ⁴²	monosomy 3 (80%) ^{R,L}	disomy 3 ^{R,L} loss 3p26-pter ^{42,44}
Chromosome 6	tetrasomy 6p ⁵	gain 6p ^{40,L}		gain 6p loss 6q	gain 6p ¹	tetrasomy 6p ⁴²		6q loss ⁴²	disomy 3p ⁵	disomy 6 ⁴²
Chromosome 8	tetrasomy 8 ^{R,L}	gain 8q ^{42,L}		gain 8q (6 copies) ^L	disomy 8 ^{R,L}	disomy 8q ¹ extra 8 ⁴²		disomy 8p ^R tetrasomy 8q ^{R,L}	disomy 8 ^{R,L}	disomy 8 ^{R,L} /8q24.1-24.2 gain ⁴²
<i>EIF1AX</i>		c.17G/A ^{28,R}		WT ²⁸		WT ^R		WT ^R		WT ^R
<i>SF3B1</i>		WT ^{28,R}		C1793C>T ²⁸		WT ^R		WT ^R		WT ^R
exon 12-16										
Cell type			90% epithelioid		mixed, many vessels		mixed, 20% epithelioid		95% epithelioid, many vessels	
HMB45	positive	positive ^{40,43}		positive ^{40,43}	99% 3+ nervus 50%	positive ⁴¹		absent ⁴³	99% 3+	absent ⁴³
(gp100)					80% 1+ nervus 0%	positive ^{26,28}		absent ⁴³	95% 3+	absent ⁴³
Melan-A		positive ^{26,43}			3+				3+	
CD68	3+				1+				2+	
CD3	1-2+				many		sporadic		many	
Pigment macrophages			many							

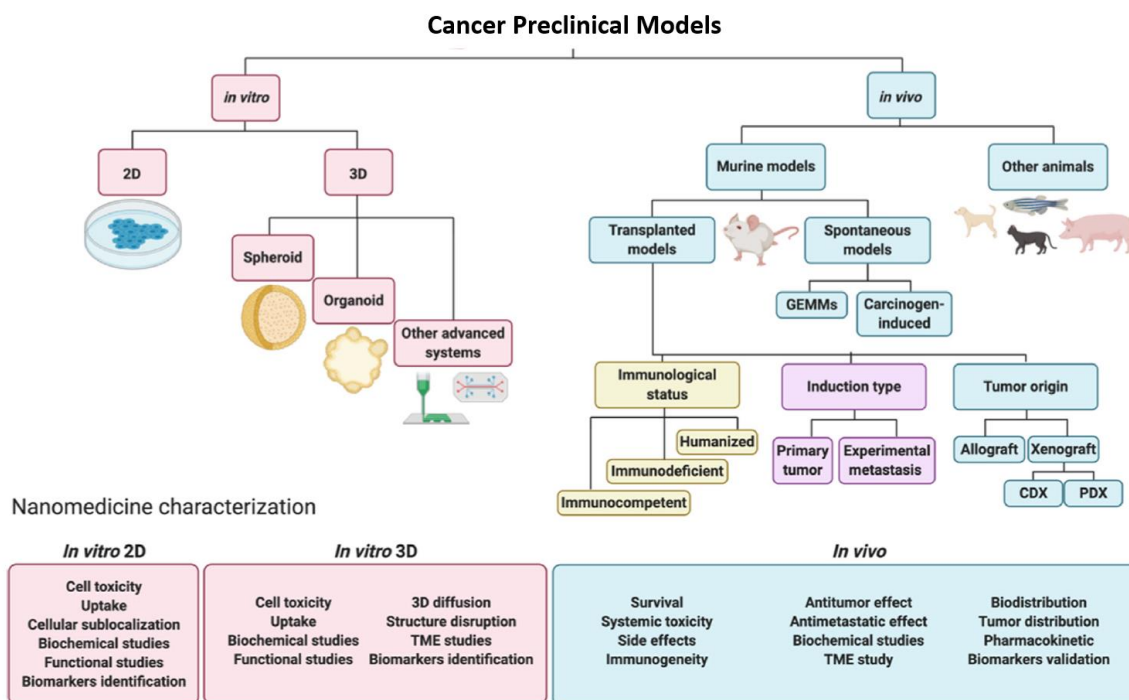
*Data regarding the primary choroidal melanoma and the choroidal melanoma cell lines were collected from published papers. A cell is empty when information is not available. The presence of mutations in exons 4 and 5 of GNAQ and GNA11 was studied in the primary choroidal melanomas and in the choroidal melanoma cell lines (R = Rotterdam, L = Leiden). Mutations in E-1268-94 and E-994-95 were also determined in Liverpool with the same results. Mutations in exons 1 and 2 of EIF1AX and exons 12-16 of SF3B1 were determined in 92-1, Mel270, Mel285, and Mel290 (Rotterdam). The chromosome composition of the primary tumors and the choroidal melanoma cell lines was obtained from the literature or obtained by FISH analysis or Droplet PCR (primary tumors) or SNP analysis (cell lines). Immunohistochemical analyses were performed for expression of BAP1, HMB45, Melan-A, and the presence of macrophages (CD8) and T cells (CD3) on sections of the primary uveal melanoma.

†As determined by Dr. A. G. Jochemsen, LUMC, Leiden, The Netherlands.

Différents modèles animaux tumoraux ont été établis par l'implantation (greffes) de cellules tumorales (xénogreffes) ou du tissu tumoral (xénogreffes dérivées de tumeurs de patients ou PDXs), ou après modifications génétiques (modèles transgéniques ou modèles génétiquement modifiés : GEMs). L'exposition à des carcinogènes a aussi permis l'établissement de modèles de tumorigénèse « spontanée » (Figure 31, (Boix-Montesinos et al. 2021)). Des caractérisations moléculaires, montrant le maintien des caractéristiques génomiques (C. Laurent et al. 2013; Némati et al. 2010; Coussy et al. 2019; Woo et al. 2021), ainsi que de l'expression génique sont très importantes et assurent la relevance de ces modèles *in vitro* et *in vivo* avant d'utiliser ces modèles pour des études précliniques. Comme cités plus tard, ces modèles ont permis d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le mélanome uvéal (Vivet-Noguer et al. 2019; F.-X. Yu et al. 2014; de Koning et al. 2019; Decaudin et al. 2020).

Figure 31: Possibilité d'analyses de modèles d'études précliniques de cancers.

Extrait de Boix-Montesinos et al, 2021.



Vue d'ensemble de modèles précliniques, y compris les systèmes de culture conventionnels *in vitro* en 2D, les systèmes de culture en 3D et les modèles *in vivo*, permettant le développement de nouveaux traitements basés sur les propriétés intrinsèques et la complexité des modèles.

Dans le mélanome de l'uvée, l'établissement de modèles animaux via la greffe de cellules tumorales peut être réalisée chez des petits animaux comme la souris, le lapin,

le hamster (Urbanska et al. 2000), le poisson zèbre (van der Ent et al. 2014), ou encore le cochon (J. Cao et Jager 2015). La greffe de suspensions de cellules tumorales ou de tissu tumoral peut être réalisée de façon orthotopique dans la chambre oculaire antérieure, soit dans la région intravitréenne, soit dans la région suprachoroïdale voire dans la région postérieure (Diaz et al. 1999; Stei et al. 2016). Ces techniques requièrent une bonne expertise et l'usage de systèmes pour guider et contrôler la greffe et présentent de faibles taux de succès. Dans ces méthodes, il faut utiliser de faibles volumes de cellules injectées pour permettre le maintien de la physiologie de l'organe. Bien qu'il n'existe pas de modèle syngénique de mélanome uvéaux, l'injection de lignées cellulaires de mélanomes cutanés a ainsi permis de créer des modèles syngéniques pour comprendre le rôle du système immunitaire et la progression tumorale (lignée cellulaire B6 établies d'un mélanome cutané murin de souris C57Bl/6J, et ses dérivés B16F10, LS9). D'autres approches d'injections de cellules tumorales dans la circulation sanguine ou directement dans des organes d'intérêt ont été réalisées pour le développement métastatique (H. Yang et al. 2008). La greffe de cellules tumorales humaines (CDX) et de fragments de biopsies de tumeurs humaines (PDX) sont faites généralement de façon ectopique : en sous cutané sur le flanc de la souris ou bien dans le coussinet adipeux interscapulaire avec des taux de succès variables. Cette dernière approche a été mise en œuvre par la Dr Fariba Némati et son équipe établissant un panel de modèles d'études des mélanomes de l'uvée à l'Institut Curie au sein du Laboratoire d'Investigation Préclinique dirigé par le Dr Didier Decaudin. Les comparaisons entre tumeurs primaires ou métastases et les différents passages des PDX ont montré des caractéristiques très semblables tant au niveau morphologique, génomique ou transcriptomique (Figure 32) (Carita, Némati, et Decaudin 2015; Némati et al. 2010; C. Laurent et al. 2013).

Figure 32: Caractéristiques de modèles de mélanomes uvéaux mis en place à l'Institut Curie.

Extrait de Carita et al, 2015

PDXs	Histology		Gene mutations								Chromosome imbalances				GE
			<i>GNAQ</i>		<i>GNA11</i>		<i>BAP1</i>		<i>SF3B1</i>		3		8q		
	P	X	P	X	P	X	P	X	P	X	P	X	P	X	
MP34	E	E	0	0	+	+	0	0	+		-3p		+8q°		
MP38	S	E	+	+	0	0	+	+	0		isod	-3	+8q	+8q	2
MP41	E	E	0	0	+	+	0	0	0		N	N	+8q°	+8q°	1
MP42	S	S	0	0	+	+	+	+	0						2
Mp46	E	M		+		0		0	0		-3	isod			
MP47	E	E	0	0	+	+	+	+	0		-3		+8q		2
MP55	M	E	0	0	+	+	+	+			-3	-3	+8q	+8q	2
MP65			0	0	+	+	+	+			-3	-3	+8q	+8q	2
MP71	E	E	+	+	0	0	0	0	0		-3	-3	+8q	+8q	2
MP77	E	E	0	0	+	+	0	0	0		-3	-3	+8q	+8q	2
MP80	M	M	0	0	+	+	0	0	0		-3	-3	+8q	+8q	2
MM26	M	E	+	+	0	0	0	0	+		-3	-3	+8q	+8q	1
MM28	M	E		0		+		+	0			isod			
MM33	E	E	+	+	0	0	0	0	0		N	N	+8q	+8q	1
MM52	M	M		+	0	0	+	+	+		-3	-3	N	+8q	2
MM66	E	E		0		+		0	0		N	N	+8q	+8q	1
MM74	E	E	0	0	+	+	+	+			-3	-3	+8q	+8q	2

P = Patient tumors; X = corresponding xenografts; E = epithelioid cells; M = mixed cells; S = spindle cells. Gene mutations: 0 = nonmutated; + = mutated. Chromosome imbalances: isod = isodisomy; - = loss; + = gain; ° = partial alteration; N = normal; empty = no data available. GE = Classification by gene expression [26]: 1 = low-risk tumors; 2 = high-risk tumors.

Notre Laboratoire d'Investigation Préclinique a établi des modèles cellulaires dérivés de PDX (Figure 33) (Amirouchene-Angelozzi et al. 2014). La mise en place de ces modèles a permis de disposer de modèles mutés *GNAQ*, ou *GNA11*, avec un gain du 8q, ayant perdu l'expression de *BAP1*, ou mutés pour *SF3B1* ou *EIF1AX* (non publié MP77, MM364 et MM341) ou encore *MBD4* (non publié). Plusieurs modèles de mélanomes uvéaux récapitulant l'hétérogénéité des mélanomes uvéaux ont ainsi pu être établis puis caractérisés. Parmi ces modèles de PDX, certains ont attiré notre attention pour approfondir leur caractérisation moléculaire, comme par exemple les modèles ayant perdu l'expression de *BAP1* sans mutation détectée (modèle MP46), ou bien les modèles pour lesquels aucun gène BSE n'a été identifié muté, qui expriment *BAP1* et qui ne présentent pas de profil d'expression suggérant une mutation d'un facteur d'épissage comme le modèle MP41 (Alsafadi et al. 2016).

Figure 33: Caractéristiques de modèles cellulaires dérivés de PDX mis en place à l'Institut Curie.

Extrait de Amirouchene-Angelozzi et al 2014

Model	Origin	Morphology	Doubling time	Status of chromosomes 1; 3; 6; 8 and 16	LOH of chromosome 3	BAP1 mutations	BAP1 protein expression	GNAQ mutations	GNA11 mutations	SF3B1 mutations	EIF1AX mutations
MP38 CL	Primary Tumor	S	80 h	L3q; G8; L16q	Yes ^a	c.68-9_72del	No	c.626 a > T	–	–	–
MP41 CL	PDX established from Primary Tumor	M	41 h	L1p; G1q; L3; G6p; L6q; L8p; G8q; L16	Yes ^b	–	Yes	–	c.626 a > A/T	–	–
MP46 CL	PDX established from Primary Tumor	M	110 h	G1q; G6p; L6q; L8p; G8q; L16q	Yes	–	No	c.626 a > T	–	–	–
MP65 CL	Primary Tumor	S	120 h	G1q; G6p; G8	Yes	c.1717del	No	–	c.626A > T	–	–
MM28 CL	PDX established from Liver Metastasis	M	109 h	L1p; G1q; L3q; G6p; L6q; L8p; G8q; L16	Yes ^a	c.1881C > A	No	–	c.626A > T	–	–
MM33 CL	PDX established from Skin Metastasis	S	91 h	G1; G6p; L6q; G8; G16	No	–	Yes	c.626 a > C	–	–	c.22G/A
MM66 CL	PDX established from Liver Metastasis	M	80 h	G1q; L6q; G8	No	–	Yes	–	c.626A > T	–	–
92.1 CL	Primary tumor	M	38 h	der (X) t (X; 6)(q28; p11),+8 ^d	ND	ND	Yes	c.626 a > T ^c	–	–	c.17G/A
Mel202 CL	Primary tumor	M	43 h	ND	ND	ND	Yes	c.629 G > A ^c	–	c.1793c > T	–
OMM1 CL	Subcutis Metastasis	M	34 h	der(1)t (1; 3)(p31; p13),+3[50%], add (8) p11),add (16)(p12) ^e	ND	ND	Yes	–	626A > T ^c	–	–
OMM2.5 CL	Liver Metastasis	M	50 h	ND	ND	ND	Yes	c.626 a > C ^c	–	–	–
MP34 X	Primary tumor	E	7 d	L1p; L6q	Yes ^a	–	Yes	–	c.626A > T	c.1793c > T	–
MP41 X	Primary tumor	E	15 d	L1p; G1q; L6q; L8p; G8q; G16p; L16q	No	–	Yes	–	626 a > A/T	–	–
MP55 X	Primary tumor	E	8 d	L3; G6p; Lq; G8p; G8q;	Yes	c.516C > G	No	–	c.626A > T	–	–
MP46 X	Primary tumor	M	11 d	G1q; L3; G6p; L8p; G8q; L16q	Yes	–	No	c.626 a > T	–	–	–

Model: CL, cell line; X, Xenograft.
Morphology: S, spindle cell; M, mixed; E, Epithelioid.
Doubling time. h: hours; d: days.
ND: not determined.
^a As determined by Western Blot and Immunocytochemistry.
^b Uniparental disomy of 3q.
^c 92.1 and Mel202 were tested for GNAQ 626A > C, GNAQ 626A > T, GNA11 626A > T; the other data on GNA mutations were issued from (Griewank et al., 2012).
^d (De Waard-Siebinga et al., 1995).
^e (Luyten et al., 1996).

Il est intéressant de remarquer que les caractérisations du modèle MP41 ont soit montré un statut normal du chromosome 3 (Carita, Némati, et Decaudin 2015) (Figure 32) soit une monosomie du chromosome 3 (Amirouchene-Angelozzi et al. 2014) (Figure 33) suggérant une hétérogénéité ou une instabilité du chromosome 3 dans ce modèle.

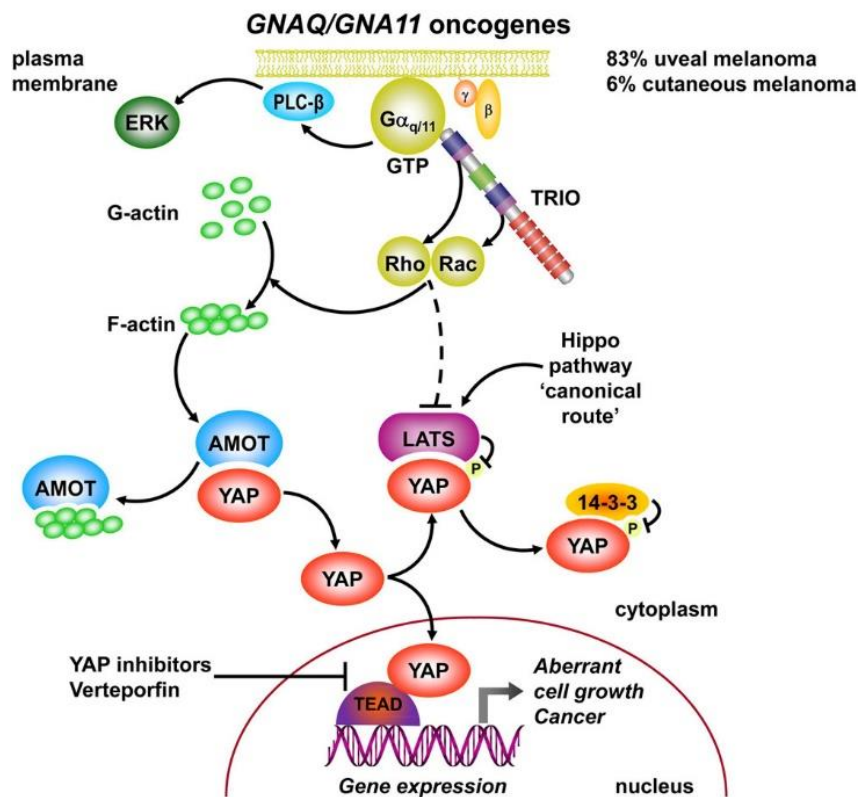
Dans le mélanome de l'uvée, plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées en activant la voies Gαq (Richards et al. 2020) ont été générées.

Feng et al (Feng et al. 2014) ont établi un modèle transgénique murin dans lequel la forme activée GNAQ Q209L est induite par la doxycycline (système Tet-on) grâce au système transactivateur rtTA2 sous contrôle du promoteur du gène DCT/TRP2 (dopachrome tautomérase) exprimé spécifiquement par les mélanocytes (Takemoto et al. 2006). Ces souris ont été croisées avec un modèle déficient pour CDKN2A/ p16^{Ink4a} et p19^{Ink4b} de façon à bloquer la voie du contrôle du cycle cellulaire. Bien qu'aucun mélanome uvéal n'ait été détecté chez ces animaux, les mutants p16p19ko et GNAQ Q209L ont cependant développé des lésions cutanées dans lesquelles les mélanocytes

présentent une activation de la voie YAP, évaluée par la présence de YAP dans le noyau. Ce modèle confirme *in vivo* des résultats de la même équipe *in vitro* qui démontrent qu'une mutation activatrice de GNAQ active la voie YAP indépendamment de la voie PLC β 4 mais aussi de la voie Hippo. Ces travaux suggèrent que l'activation de YAP est régulée par AMOT et est dépendante de la polymérisation de l'actine F (Figure 34).

Figure 34: Schéma d'activation de la voie YAP suite à l'activation de $G\alpha_q$.

Extrait de Feng et al 2014.



Représentation schématique des voies Hippo-dépendantes et Hippo-indépendantes entraînant l'activation de YAP par l'oncogène GNAQ dans le mélanome uvéal. La protéine $G\alpha_q$ stimule YAP par un circuit de signalisation régulé par RhoA et Rac1, initié par l'activation de Trio, qui est une Rho-GEF activant ces GTPases, indépendamment de la stimulation la plus connue des seconds messagers par PLCβ4. À son tour, RhoA active ROCK et Rac1 stimule les protéines PAK, qui convergent vers l'activation de LIMK qui phosphoryle et inactive la protéine de séparation de l'actine, la cofiline, ce qui entraîne la polymérisation de l'actine et l'accumulation de F-actine (non représentée, ligne continue). La F-actine peut alors se lier à l'AMOT, déplaçant YAP, qui se transloque dans le noyau et déclenche l'expression des gènes. YAP libre peut également se lier à LATS, qui phosphoryle et inactive la YAP lors de la séquestration cytosolique de la phospho-YAP par les protéines 14-3-3 ou en favorisant sa dégradation protéosomique (ce dernier cas n'est pas représenté), dans le cadre d'une voie canonique Hippo-dépendante limitant la fonction de la YAP. La façon dont les Rho GTPases régulent la fonction de LATS n'est pas entièrement comprise (ligne pointillée). On s'attend à ce qu'en présence d'oncogènes GNAQ, l'activité réduite de LATS agisse de manière coordonnée avec la stimulation probablement dominante de YAP médiée par la F-actine pour favoriser la stabilisation et la translocation nucléaire de YAP, ce qui entraîne finalement l'expression de gènes promoteurs de croissance régulés par YAP.

Un autre exemple de modèle murin génétiquement modifié correspond à l'introduction d'une mutation *GNAQ* Q209L sous le contrôle d'un promoteur Rosa26, grâce au système Flox, et l'utilisation de *MITF*-Cre qui assurent l'expression du transgène dans le lignage mélanocytaire (Alizadeh et al. 2008). Lors de l'expression de *MITF* par les cellules mélanocytaires, la recombinaise Cre flanquée des régions de

régulation de *MITF* est exprimée et supprime par recombinaison les cassettes Flox qui encadrent et bloquent l'expression de l'allèle *GNAQ* Q209L, permettant ainsi l'expression de l'allèle muté. Ce modèle murin mis en place par l'équipe du Dr Van Raamsdonk (J. L.-Y. Huang, Urtatiz, et Raamsdonk 2015) montre que l'expression de *GNAQ* muté dans les cellules qui exprime *MITF* vont donner lieu après 3 mois, à des lésions dans le tractus uvéal.

Enfin l'approche de Dr Amanda Moore et al (Moore et al. 2018) mise en place pour approfondir l'altération de la voie $G\alpha_q$ /PLC β 4/CYLSTR2 et comprendre les interactions avec *BAP1*, a nécessité de croiser des modèles murins génétiquement modifiés. Ces travaux ont placé *GNA11* Q290L sous un promoteur Rosa26, où la recombinaison Cre est sous le contrôle de séquence régulatrice de Tyrosinase (Tyr) pour l'expression de l'allèle *GNA11* muté dans le lignage mélanocytaire. Cette première modification a permis de montrer une hyperplasie au niveau de la peau, du système nerveux et de la choroïde (épaississement de la choroïde et du corps ciliaire) qui progresse au cours du temps vers un mélanome uvéal. Cependant cette mutation provoque des altérations également dans les organes contenant des ces mélanocytes comme dans les méninges, le myocarde, et dans les poumons où résideraient des cellules pigmentées sinon des métastases. L'ajout d'une seconde mutation (*BAP1*^{lox/lox} ou *BRAF* V600E) a été réalisée par induction au tamoxiphène de la recombinaison Cre donnant lieu soit à une perte de fonction de *BAP1* (*BAP1-loxé*), soit à une mutation *BRAF* V600E. La comparaison transcriptomique des modèles mutés *GNA11* +/- *BAP1* montre une accélération de l'apparition de lésions cutanées, une augmentation de leur nombre mais pas de leur taille lorsque *BAP1* et *GNA11* sont mutés. Les auteurs ont ensuite comparé le transcriptome des modèles mutés *GNA11* vs *BRAF* ainsi que celui des mélanomes cutanés et uvéaux mutés ou *BRAF* et *GNAQ* / *GNA11* du TCGA. Ces comparaisons ont mis en évidence *RASGRP3* (RAS guanyl releasing protein3), qui est une G-exchange protéine / protéine GEF qui relargue le GDP et se lie au GTP, comme jouant un rôle essentiel dans la tumorigénèse médiée par l'activation de la voie $G\alpha_q$.

Le poisson zèbre constitue depuis de nombreuses années un modèle intéressant en embryologie, mais également en oncologie. La mise en place de modèles par transgénèse, ou par xénogreffes pour la compréhension de l'oncogénèse et la dissémination tumorale, ainsi que pour des études précliniques est prometteuse (van der Ent et al. 2014; Frantz et Ceol 2020). L'activation de la voie YAP plutôt que la voie ERK a pu être montrée dans des modèles transgéniques *GNAQ* Q209P également mutés *p53* (mutants homozygotes *p53* M214K) (Mouti et al. 2016). Ce type de modèle permet de réaliser rapidement sur des cohortes importantes d'individus des études de validation de cibles thérapeutiques et de leurs inhibiteurs (van der Ent et al. 2014). Les travaux récents de Raymond Barnhill et Filippo Del Bene à l'Institut Curie, ont pu

apporter des précisions sur la migration des cellules tumorales, et en particulier l'angiotropisme et la migration extravasculaire de cellules tumorales fluorescentes dans ce type de modèle (Fornabaio et al. 2018).

APPORT DES ANALYSES MULTI-OMIQUES EN CANCEROLOGIE

A. ETAPES DE CANCEROGENESE

Les cancers reposent sur des altérations génétiques diverses et complexes. Ces altérations peuvent être soit des substitutions d'une seule base dont la variation d'un seul nucléotide (SNV, single nucleotide variant) fait apparaître un variant pathogène, ou des variations structurales (SV) de quelques nucléotides telles que les insertions duplications (indels), voire des variations plus larges telles que des insertions, délétions, inversions de grande taille. Enfin des gains ou des pertes de régions chromosomiques peuvent apparaître et conduire à des réarrangements chromosomiques complexes, donnant lieu à une aneuploïdie sous-jacente à une instabilité génomique (Alexandrov et al. 2020; Vogelstein et al. 2013; Tubbs et Nussenzweig 2017). L'origine de ces altérations peuvent être extrinsèques et causées par l'exposition à des agents pathogènes, des radiations provoquant des dommages à l'ADN et/ou aux processus de réparation des dommages mais les causes sont multiples et mal connues. Les dommages peuvent être intrinsèques et dus à des modifications nucléotidiques telles que des dépurinations, déaminations ou oxydations, à des erreurs durant la réplication, ou à des erreurs des processus de réparation de l'ADN. La fréquence de mutation est très variable selon les cancers telle qu'observée dans les données du TCGA sur plus de 12 cancers différents et 3281 tumeurs analysées par Kandoth et al. (Kandoth et al. 2013) où la médiane oscille entre 0.28 et 8.15 mutations par Mb mais pouvant atteindre par cancer, des taux bien supérieurs (10-100 mutation/Mb). D'ailleurs des signatures spécifiques a pu être définies par des algorithmes comme ceux des travaux de Alexandrov et al en 2013 et 2020 (Alexandrov et al. 2013; 2020) mettant en évidence une centaine de signatures mutationnelles impliquant soit un seul nucléotide (67 principales signatures « SBS » pour Single base substitutions), soit deux nucléotides (11 signatures, DBS : doublet base substitutions) soit plusieurs nucléotides telles que les petites insertions/délétions (17 signatures identifiées, ID pour Insertion/deletion). Ces signatures ont permis par exemple d'identifier des signatures liées aux UV en particulier

dans les mélanomes cutanés causant des dimères de pyrimidines (signatures SBS7a et SBS7b correspondant respectivement aux substitutions C>T au niveau de T $\overline{C}$ N et au niveau de C $\overline{C}$ N, ainsi que la signature DSB1 : CC>TT). Des taux élevés de mutations conduisent à l'apparition de mutations dans des gènes clés de la réparation des dommages à l'ADN comme *MSH2* ou *MSH3*.

La présence de mutations peut conduire au phénotype oncogénique et les mutations dites « driver » correspondent à des mutations conduisant au processus oncogénique malin de transformation et de progression tumorale. Les mutations dites passagères « passager » participent au phénotype tumoral mais ne donnent pas un avantage sur la croissance ou l'invasion et ne sont pas directement impliquées dans le processus tumoral.

B. GENES SUPPRESSEURS DE CANCER ET GENES ACTIVATEURS

La présence de mutations peut avoir pour conséquence d'activer la fonction d'un oncogène, ou conduire à la perte de fonction chez les tumeur supresseurs conduisant à la prolifération cellulaire en premier lieu (Vogelstein et al. 2013). La présence de mutations dans les oncogènes intervient sur des domaines fonctionnels de manière plutôt récurrente, c'est-à-dire sur un nombre restreint d'acides aminés, dans les domaines actifs de tyrosines kinases de récepteurs membranaires (CYLSTR2, ERBB2), d'effecteurs cytoplasmiques (BAF, MAPK), de GTPases (GNAQ, GNA11), ou de facteurs de transcription (MYC). Des substitutions sur un seul allèle rendant un site constitutivement actif, des translocations conduisant l'oncogène sous contrôle d'un promoteur actif, ou des amplifications conduisant à l'augmentation du dosage génique peuvent intervenir sur ces oncogènes. A l'opposé, une mutation bi-allélique inactivatrice d'un gène suppresseur de tumeur va conduire à sa perte de fonction. L'inactivation peut également être liée à une substitution, ou insertion/délétion dans une région codante, ou régulatrice (intron, promoteur, élément de régulation à distance ou *enhancers*, méthylation du promoteur), et est associée à la perte de l'allèle normal. La perte de fonction dans des gènes de maintenance ou de stabilité du génome peut également être associée au rôle d'oncogène comme les gènes en charge de réparation des dommages à l'ADN (*TP53*, *BRCA1/2*, *ATM*, *MSH2*, *MLH1*, *MBD4*), ou des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine (histone-Lysine N- méthyl transférase : gènes *KMT2D*, *KMT2C* ou *KMT2B*, ou nommés *MLL2*, *MLL3* et *MLL4*).

La recherche de mutation par séquençage ciblé des régions codantes représente actuellement la stratégie la plus intéressante en terme de rapidité, manipulation des

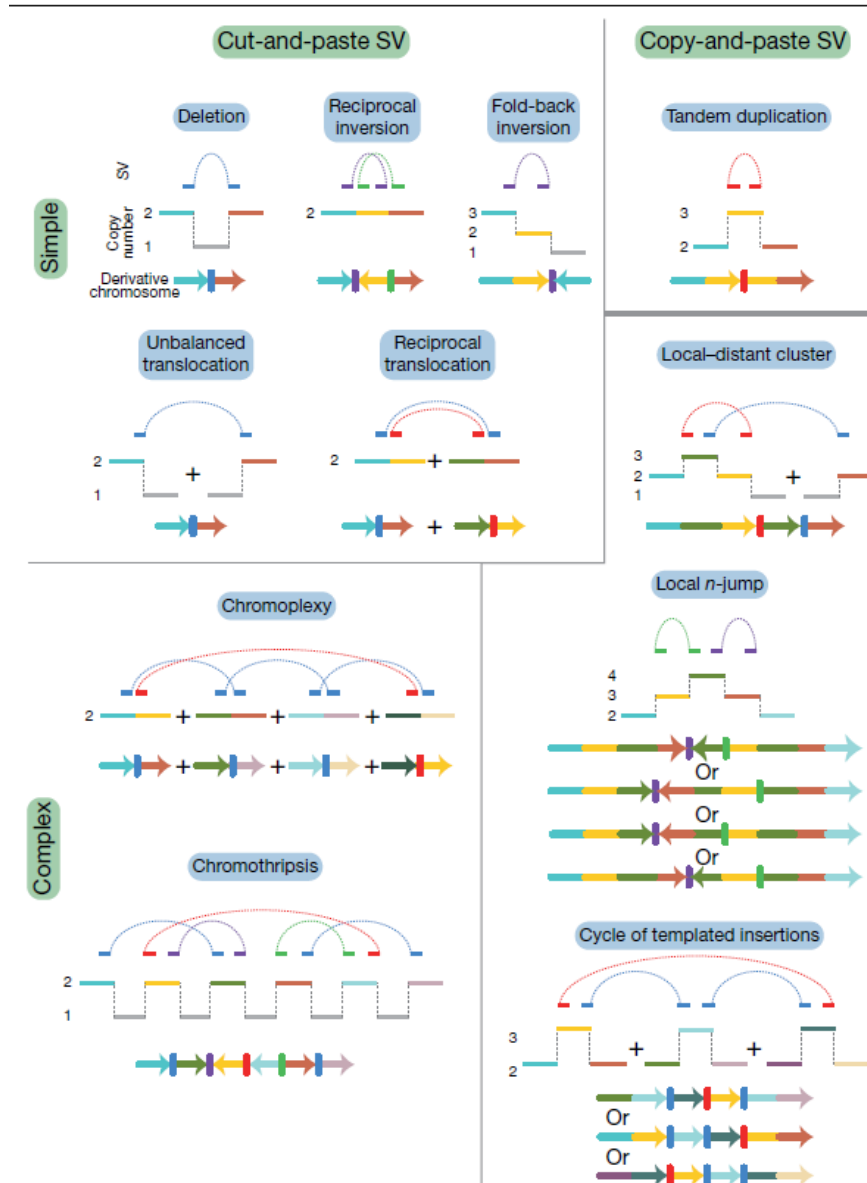
données et coût de mise en œuvre pour identifier des mutations (O. J. Dillon et al. 2018). Ces approches ciblées permettent l'identification de variants pathogènes mais également la mise en évidence de variants de signification inconnue (VUS, variants of unknown significance) dont la pathogénicité reste à définir.

C. ALTERATIONS GÉNOMIQUES DE GRANDE TAILLE

Les altérations génomiques de grandes tailles telles que des insertions duplications, inversions, duplications, translocations sont très hétérogènes et peuvent impliquer des réarrangements de dizaines de bases à des chromosomes entiers (Freeman et al. 2006; T. Wang et al. 2022; Boyling, Perez-Siles, et Kennerson 2022). Ces altérations concernent systématiquement la fusion de deux jonctions d'ADN après cassure. La jonction peut avoir lieu au point de cassure ou au niveau de région de micro-homologie des jonctions du fait de défauts de réparation de l'ADN. Les approches de cytogénétiques tels que les étalements métaphasiques associés à l'hybridation de sondes fluorescentes spécifiques de régions chromosomiques d'intérêt (FISH multi-spectral, chromosome painting, etc.) ont permis de caractériser des altérations de grandes tailles complexes et de caractériser l'instabilité génomique de certaines tumeurs. Les approches de séquençage massif ont permis de préciser certaines altérations avec plus ou moins de succès selon la taille de l'anomalie ou sa localisation, et selon la technique de séquençage employée. L'analyse récente des données de séquençage massif du TCGA et de l'ICGC, a là encore permis d'identifier 16 signatures (Figure 35, (Y. Li et al. 2020)), selon la présence d'insertions, de répétitions d'insertions, ou de multiples réarrangements en chaîne plus complexes apparentés à des translocations de plusieurs régions.

Figure 35: Classification de variants structuraux.

Extrait de Y Li et al 2020.



Schémas des principales classes de variants structuraux (SV), regroupés selon qu'ils sont simples ou complexes et qu'ils résultent de processus de couper-coller ou de copier-coller. Chaque schéma comprend trois parties. Le segment supérieur montre des arcs en pointillés pour chaque jonction de réarrangement qui joint deux segments chromosomiques ensemble. Le segment du milieu montre le nombre de copies des segments génomiques qui sont impliqués. Le segment inférieur montre la configuration du chromosome dérivé final qui résulte du variant structural ; la couleur des segments correspond à la couleur de ce segment dans le schéma du nombre de copies. Le signe + indique les différents chromosomes dérivés créés pour certaines des classes : c'est-à-dire que les variants structuraux ne sont pas transformés en un seul chromosome dérivé.

D. TRANSCRITS DE FUSION

Les variants génomiques structuraux, donnant lieu à des remaniements chromosomiques comme les translocations ou insertions de régions génomiques peuvent conduire à des gènes de fusion, voire des transcrits de fusion fonctionnels (Figure 36) codants ou non pour des protéines de fusion.

La première translocation identifiée dans des cancers a été la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 dont le point de cassure est en 9q24 au niveau du gène *ABL1* (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) et en 22q11 au niveau du gène *BCR* (Breakpoint Cluster Region, BCR) (Nowell 1962; Rowley 1973). Le chromosome 22 raccourci et portant la partie terminale du chr9 est appelé chromosome de Philadelphie du fait de la ville où il a été mis en évidence. Cette translocation t(9;22) (q34;q11) est présente chez 90% des patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques notamment (LMC/CML), mais également chez des patients atteints de leucémies lymphoblastiques aigües (LLA/ALL) et de leucémies myéloïdes aigües (LMA/AML). La caractérisation moléculaire de cette translocation a montré ultérieurement que le point de cassure avait lieu dans le gène *BCR* généralement au niveau d'exon 12 à 16 voire entre les exons 19 à 20 ou dans le 1^{er} exon, impliquant au minimum le domaine serine/thréonine kinase de *BCR*. De la même manière, le point de cassure sur le gène *ABL* varie : il est majoritairement entre les exons 2 à 11. Différentes isoformes ont été identifiées selon le point de cassure (ARN *BCR-ABL* de 7 à 10kb) et l'expression de protéines chimériques (190-230kb), impliquées par exemple dans l'activation de kinase (Lugo et al. 1990), la voie de signalisation RAS (Cortez et al. 1996), l'altération du cytosquelette (via FAK (Gotoh et al. 1995; Verfaillie et al. 1997)), la résistance à l'apoptose (via *BCL2*, (Bedi et al. 1994)) et la réparation des cassures double brins de l'ADN (Takeda, Shibuya, et Maru 1999).

D'autres gènes de fusions causés par des réarrangements structuraux (translocations, inversions, insertions, etc) ont été identifiés dans des hémopathies telles *PML-RARA*, causé par t(15;17)(q22;q21)(Larson et al. 1984), mais également dans les sarcomes et carcinomes comme *EWSR1-FLI1* (t(11;22)(q24;q12), (Aurias et al. 1984)), *BCOR-CCNB3* (inv(X), (Pierron et al. 2012; Peters et al. 2015)), *EVT6-NTRK3* (t(12;15)(p13;q25), (Knezevich et al. 1998)), *EML4-ALK* (inv(2)(p21p23), (Soda et al. 2007)) ou encore *FGFR3-TACC3* (t(4;7), (D. Singh et al. 2012; S. V. Williams, Hurst, et Knowles 2013; Y.-M. Wu et al. 2013; Helsten et al. 2016)), etc.

Ces réarrangements contribuent à la dérégulation des gènes impliqués et dont les transcrits de fusion participent directement à la tumorigénèse. Ces transcrits de fusion codant pour des protéines présentent des cibles thérapeutiques intéressantes comme le Glivec inhibant l'activité tyrosine kinase de *BCR-ABL* dans les leucémies myéloïdes chroniques (Druker et al. 2001), ou le Crizotinib inhibant les protéines de fusion impliquant *ALK* (*EML4-ALK*) dans les cancers du poumon (Shaw et al. 2011). D'autres inhibiteurs dirigés par exemple contre les différentes fusions impliquant les récepteurs au FGF (*FGFR1-4*), ciblant soit les domaines tyrosines kinases de *FGFRs* soit les domaines liant l'ATP, ont montré des résultats encourageants en clinique (De Luca et al. 2020).

Des transcrits de fusions ne codant pas pour des protéines peuvent modifier la prolifération de cellules tumorales comme *SLC45A3-ELK4* (Qin et al. 2017) dont l'origine est un épissage en cis de gènes adjacents (Figure 36 A et D, (Jia, Xie, et Li 2016)) dans le cancer de la prostate (Yanmei Zhang et al. 2012; Qin et al. 2015). Cet épissage à distance est causé par la formation d'une insulation dont la boucle d'extrusion est formée par les facteurs de cohésion de l'ADN et la présence de motifs CTCF. D'autres processus plus complexes de trans-épissage ont été décrits et peuvent également conduire à la synthèse d'ARN chimériques comme schématisé en Figure 36 E et F (Jia, Xie, et Li 2016; Maher et al. 2009).

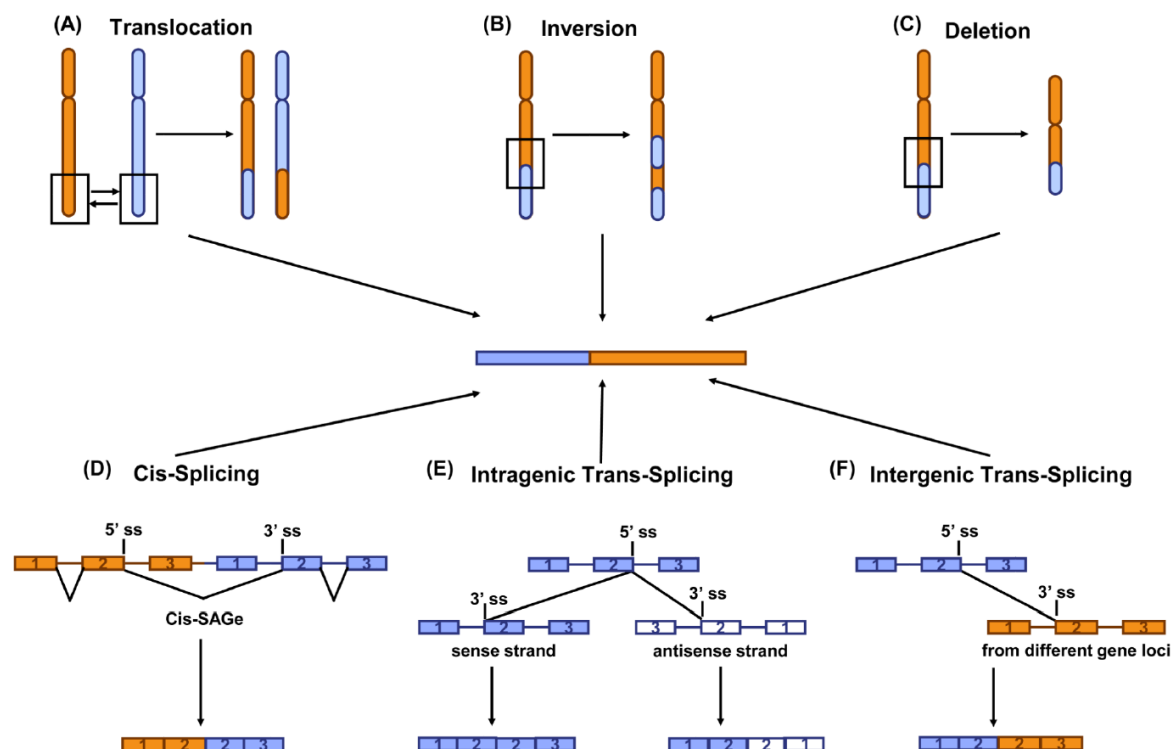
Il est important de noter que ces transcrits de fusion codant ou non pour des protéines chimériques, ont également été identifiés dans des conditions physiologiques normales (Babiceanu et al. 2016). Les travaux de Babiceanu et al de 2016, ont montré l'importance de filtrer les transcrits de fusions « tumoraux » par ceux détectés en situation physiologique normale et éviter la détection de faux positifs en particulier chez les primates où le nombre d'événements est plus important que chez les autres vertébrés quel que soit le tissu ou l'organe considéré (Barbosa-Morais et al. 2012).

De façon intéressante, les sarcomes d'Ewing présentent un très faible taux de mutations par Mb (Anderson et al. 2018) similaires aux UM, néanmoins 42% de ces sarcomes comportent au moins un réarrangement impliquant *EWSR1* et *ETS* comme transcrits de fusion. Ces réarrangements complexes, sont associés soit à une chromoplexie soit à un chromothripsis, et sont retrouvés dans des sarcomes d'Ewing agressifs, de moins bons pronostics. Dans le contexte de chromoplexie, il a été montré que les régions soumises à des variants structuraux correspondent à des régions de réplifications précoces, et

comportent un grand nombre de gènes dérégulés donnant un enrichissement de voies de signalisations associées aux cancers (Anderson et al. 2018). Bien que le taux de mutations ponctuelles soit plus important dans les cancers de la prostate, des translocations ainsi que des délétions ont également été identifiées conduisant à la surexpression de facteurs de transcription et de transcrits de fusion. Il a d'ailleurs été suggéré que cette chromoplexie participe à la tumorigénèse des cancers de la prostate (Baca et al. 2013). Enfin l'identification de ces transcrits de fusion présente des perspectives intéressantes pour la compréhension des mécanismes oncogéniques, pour le développement de biomarqueurs et de thérapies innovantes.

Figure 36: ARN de fusion et réarrangements interchromosomiques.

Extrait de Jia et al 2016



(A) Translocation : le réarrangement de parties de deux chromosomes non homologues peut réunir deux gènes séparés. (B) Inversion : Le segment d'un chromosome couvrant deux gènes est inversé bout à bout, ce qui conduit à la formation de gènes de fusion. (C) La suppression de la partie interstitielle entre deux gènes séparés peut entraîner la fusion de gènes. (D) Epissage en cis entre gènes adjacents. La machinerie de transcription lit à travers deux gènes voisins, transcrivant dans la même direction. Après l'épissage, les exons des gènes différents sont épissés ensemble pour produire un ARN chimérique. (E) Trans-épissage intragénique. Deux transcrits de pré-ARNm provenant du même locus génomique participent au processus. Les deux transcrits de pré-ARNm peuvent être transcrits à partir du même brin ou de brins différents. L'épissage transgénique peut entraîner une duplication d'exon ou une fusion sens-antisens. (F) Trans-épissage intergénique. Deux transcrits de pré-ARNm provenant de deux loci génomiques différents sont épissés ensemble.

E. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES

1. Modulation de l'expression des gènes par la méthylation de l'ADN

Les variations de méthylation de l'ADN constituent avec les modifications post traductionnelles des histones, ou l'organisation et la compaction de la chromatine, un domaine important de la biologie qu'est l'épigénétique. D'ailleurs les caractéristiques

épigénétiques d'un organisme participent à son développement, sa croissance, et ses fonctions.

Les principales modifications chimiques réversibles de l'ADN correspondent à la méthylation de l'ADN et plus précisément à la méthylation des cytosines, dont la découverte des 5-méthylcytosines (5mC) remonte à la fin des années quarante (Hotchkiss 1948). La régulation de l'expression des gènes par la méthylation de l'ADN a été démontré plus tardivement, comme impliquée lors de la différenciation ou l'inactivation du chromosome X, ou l'empreinte parentale (Holliday et Pugh 1975; Okamoto et Heard 2006). La méthylation de l'ADN permet de bloquer la fixation de facteurs de transcription, et permet de fixer des protéines ayant une affinité pour les CpG méthylés (MBD1-4) ou les protéines modifiant la chromatine et ayant un rôle répressif (Klose et Bird 2006). L'ajout d'un groupement méthyl en C5 sur les cytosines, d'ilots CpG, est réalisé par des ADN méthyl transférases (DNMTs) comme DNMT1, 2, 3A, 3B et 3L chez l'humain (Lyko 2018). L'activité de ces enzymes, est elle-même régulée par les complexes protéines de remodelage de la chromatine comme ATRX, les complexes Polycomb, des ARN non codant, et certaines modifications d'histones (H3K4me3 notamment) (Piunti et Shilatfard 2016; Greenberg et Bourc'his 2019). L'oxydation des 5mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) puis en 5-formylcytosine (5fC), et 5-carboxylcytosine (5caC), est réalisée par les enzymes TET1-3 (Ten-elevated translocation), modulant l'inhibition transcriptionnelle (X. Wu et Zhang 2017). Des mutations des *TET1*, *TET2* et *TET3* ont été rapportées dans les hémopathies, avec des défauts de déméthylation de l'ADN (Griewank et al. 2012; Abdel-Wahab et al. 2009). Des mutations dans les gènes *IDH1* et *IDH2*, régulateurs de *TET2* ont également été décrites comme associées aux pertes de fonctions de *TET2* (Dang et al. 2009), bloquant par exemple la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques (Figueroa et al. 2010) ou montrant un profil d'hyper-méthylation, dans les gliomes par exemple (Han et al. 2020).

Environ 1% des cytosines sont méthylées et concernent 70% à 80% des nucléotides CpG (Ehrlich et al. 1982; Illingworth et Bird 2009). La répartition des CpG n'est pas homogène, probablement à cause de la mutabilité des cytosines méthylées qui, lorsque désaminées et converties en uracile, sont remplacées par une thymine (CpG>TpG) au cours des cycles de divisions cellulaires (Alexandrov et al. 2013; Duncan et Miller 1980; Lunter et Hein 2004). Ce processus de réparation, correspond à la voie du « *base excision repair* », impliquant *MBD4* (Methyl-Binding Domain 4) ou *TDG* (Thymine DNA Glycosylase), une voie retrouvée comme impliquée dans la signature mutationnelle associée à l'âge (Alexandrov et al. 2013) et déficiente lors de l'inactivation bi-allélique de *MBD4* dans l'UM (M. Rodrigues, Mobuchon, Houy, Fiévet, et al. 2018; Derrien et al. 2020).

Les îlots CpG ou CGI ont été définis comme des séquences GC-riches non méthylées, d'une taille moyenne de 1000bp (Illingworth et Bird 2009). La plupart des promoteurs contenant un CGI ne sont pas méthylés à cause de la répression médiée par le complexe polycomb répressif de type 2 (PRC2), impliqué dans la méthylation des lysines 27 des histones H3 (H3K27me3) (van Heeringen et al. 2014; Riising et al. 2014). Lorsque H3K27me3 est présente, elle bloque DNMT3A/B qui ne peut alors pas méthyler les CGI (Marasca, Bodega, et Orlando 2018). Cette régulation de l'activité transcriptionnelle via les charges d'histones et PRC2 est probablement plus dynamique que la méthylation puis la déméthylation des CGI. Le fait qu'environ 70% des gènes contiennent un CGI au sein de leur promoteur a permis d'identifier deux classes de promoteurs selon la présence de CGI (Bird et al. 1985; Illingworth et al. 2010; Saxonov, Berg, et Brutlag 2006; Takai et Jones 2002). Alors que l'ensemble des gènes ubiquitaires possèdent un promoteur contenant un CGI, il a été montré que près de 40% des gènes tissu-spécifiques contiennent un CGI dans leur promoteur (Larsen et al. 1992; Zhu et al. 2008). Sachant que la moitié des CpG se trouvent en dehors des promoteurs, comme dans les introns, les exons et les régions inter géniques, les régions répétées, il est intéressant de considérer les diverses localisations des CpG pour identifier les régions dont la méthylation varie entre deux situations (tumoraux vs normales par exemple (Baylin et Jones 2011; Bhasin et al. 2015; Kulis et al. 2012)).

La présence de CGI inter-géniques peut être un élément régulateur à distance (enhancer) comme facilitant l'activation de régions promotrices, en fixant des facteurs de transcription. Ces éléments régulateurs à distance peuvent également constituer des insulateurs en permettant la fixation de CTCF (au site CCCTC) et régulant la transcription (Y. Guo et al. 2012; Bell et Felsenfeld 2000). La présence d'éléments régulateurs à distance des promoteurs, comme *super-enhancers* dans une fenêtre de 50kb à distance de promoteurs (Moorthy et al. 2017; Chepelev et al. 2012) peut être associée à la présence de marques d'histones comme H3K27Ac régulant l'activité transcriptionnelle (Hnisz et al. 2013). Dans ce contexte, la méthylation de CpG peut réguler la fixation de facteurs de transcription (Heyn et al. 2016). Les régulations d'oncogènes comme *MYC*, *RNF43*, *CTNNB1* (Anastas et Moon 2013), *AXIN2* (Z.-Q. Wu et al. 2012) dans les cancers colorectaux, et de micro-ARN suppresseurs de tumeur comme *MIRLET7* dans le cancer du sein et du poumon ont pu être décrites. Dans ces contextes, la surexpression de facteur de transcription comme FOXQ1 est nécessaire pour que les dérégulations épigénétiques dues à la méthylation de régions à longue distance des promoteurs mènent à un processus oncogénique (Heyn et al. 2016). La présence de CGI inter-géniques a également été décrite comme différentiellement méthylée selon le lignage cellulaire, hyper-méthylé par exemple selon la différenciation de cellules immunitaires (Deaton et al. 2011).

Les CGI introniques peuvent constituer des promoteurs alternatifs, dont le niveau de méthylation a été décrit comme tissu-spécifiques (Maunakea et al. 2010), ou associé plus fréquemment dans plusieurs cancers en comparaison avec l'ADN constitutionnel (Nguyen et al. 2001; Varley et al. 2013). Une analyse conduite dans des hémopathies et cancers colorectaux a pu montrer que les CGI des exons étaient plus sujets aux variations de méthylation que ceux présents dans des promoteurs (Nguyen et al. 2001). La méthylation de CpG introniques permet de réduire la transcription issue de promoteur alternatif (Jjing et al. 2012; Neri et al. 2017). La méthylation de CG au niveau génique (intron et exon) est corrélée à des niveaux élevés d'expression génique (X. Yang et al. 2014). La méthylation de jonctions introns-exons semble réguler l'épissage, probablement du fait de la présence de nucléosome, et le fonctionnement de la machinerie d'élongation et d'épissage lors de la transcription (X. Yang et al. 2014; L. Laurent et al. 2010; Carty et Greenleaf 2002). Il a également été montré que les régions méthylées intragéniques étaient enrichies en marques d'histones comme H3K36me3 facilitant la reconnaissance des exons (Hahn et al. 2011; Hawkins et al. 2010; Wagner et Carpenter 2012).

La caractérisation du niveau de méthylation des CGI a montré que la méthylation varie au cours du développement, du type cellulaire et selon le type de cancer (Bhasin et al. 2015; Varley et al. 2013; Bird 2002; M. Weber et al. 2005; F. Liu et al. 2015). Dans l'UM plusieurs publications ont montré des variations de méthylation importantes subdivisant les UM en 4 catégories (Robertson, Shih, et al. 2017) et plus particulièrement dans les UM à haut risque métastatique, mutés *BAP1* (groupe 4 du TCGA). Les travaux de William Harbour combinant analyse de méthylation et d'expression ont permis de montrer un enrichissement de DMR hyper et hypo-méthylés sur les chromosomes 3, 6, 10 et 19 (Field et al. 2019) lors de la comparaison des UM de classe 1 vs de classe 2, suggérant un rôle de BAP1 dans l'hyper-méthylation de locus sur le chromosome 3 (3p21–23, 3p25–26, 3q12–21, et 3q27), associé à la perte d'expression de gènes impliqués dans la mélanogenèse et le guidage axonale (*DPYSL2*, *ROBO3*). Des travaux plus récents comparant le profil de méthylation par séquençage massif (Boers et al. 2018) de tumeurs primaires métastatiques et leurs métastases associées d'UM mutés *BAP1*, *SF3B1* et *EIF1AX*, ont montré des DMR hypo et hyper méthylés selon la présence de BSE (Smit et al. 2022). Dans cette étude comparant les niveaux de méthylation aux régulations transcriptomiques dans des UM agressifs, les auteurs mettent en évidence un grand nombre de DMR en lien avec la régulation transcriptomique de gènes impliqués dans le développement tumoral suggérant que les régulations épigénétiques pourraient expliquer le faible taux de mutation présents dans les UM. Dans ces travaux, les auteurs ont également identifié que 8 à 16% des DMR (présents soit dans le promoteur soit dans les gènes) sont associés à une régulation transcriptionnelle. Dans ces travaux, l'activation de *PRAME* est retrouvée

corrélée à la déméthylation de son promoteur (Field, Durante, et al. 2016), néanmoins très peu de gènes sont retrouvés en commun avec les données du TCGA (Robertson, Shih, et al. 2017). Les dernières études dans le mélanome uvéal ont montré que l'analyse exhaustive du niveau de méthylation par séquençage massif permettait d'identifier le niveau de méthylation quelle que soit la localisation des CpG et l'identification de régulations fines de la transcription (Smit et al. 2022; Lister et al. 2009). Enfin du fait que dans certains cas, l'activité des enzymes impliquées dans la méthylation de l'ADN est dépendante de modifications portées par les histones, il est intéressant de considérer la position de marques d'histones et plus généralement l'organisation de la chromatine pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle.

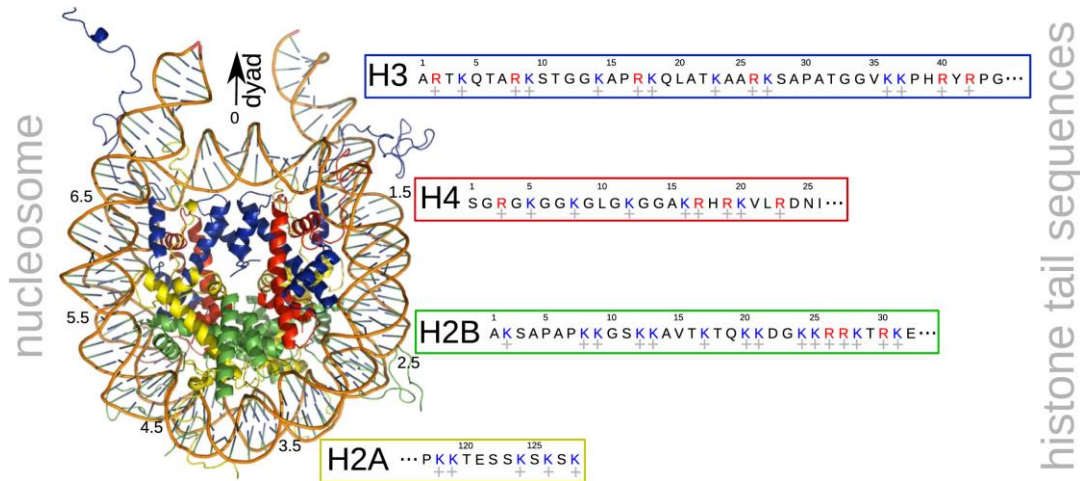
2. Modulation de l'expression des gènes selon la présence de marques d'histones

L'ADN est compacté dans le noyau dont l'hyper-structure de l'ADN, est due à plusieurs niveaux d'organisations. La chromatine correspond à l'ADN enroulé autour de protéines d'échafaudage dont les principales sont les histones H3, H4, H2A, H2B (Luger et al. 1997). Il existe des variants d'histones H3 comme CENP-A spécifique des régions péri-centromériques (Müller et Almouzni 2014). Le nucléosome est l'unité qui regroupe un octamère de protéines d'histones autour duquel l'ADN est enroulé. Le diamètre d'un nucléosome est de 11nm et correspond à 147 nucléotides. Une superstructure de 30nm correspond à l'enroulement de 6 nucléosomes (environ 1kb) formant une cavité d'un solénoïde d'une structure plus compactée de la chromatine, stabilisée grace aux histones H1. Les protéines d'histones participent à la structure de la chromatine ainsi qu'aux fonctions et à la dynamique de l'ADN (réplication, réparation, transcription). Les modifications chimiques réversibles des protéines d'histones sont nombreuses et complexes, constituant un code à part entière complétant les régulations de l'expression des gènes apportées par la méthylation de l'ADN. Les principales modifications chimiques des protéines d'histones sont des acétylations et des méthylations (mono, di, tri-méthylation) des extrémités N-terminales (Allfrey, Faulkner, et Mirsky 1964), au niveau de lysine voire d'arginine (Figure 37, (Erler et al. 2014)). Les enzymes qui régulent les charges d'histones sont soit des acétyl ou methyltransferase (histone acetyltransferase : HAT et histone methyltransferase : HMT) pour les histones « *readers* », soit des histones déacétylases (HDAC) ou des histones déméthylases (HDM) pour les histones « *erasers* ». L'acétylation ou la méthylation des extrémités N-terminales des histones modifie leur charge électrostatique positive qui neutralise la charge négative due aux groupements phosphates de l'ADN. Cet équilibre

de charge contribue probablement à l'organisation de la chromatine (Erler et al. 2014), modulant l'accès aux facteurs de transcriptions et aux enzymes.

Figure 37: Schéma d'un nucléosome.

Extrait de Erler et al 2014.



Le nucléosome et les séquences de queue d'histone, montrant 147 pb d'ADN enroulé autour d'un noyau protéique. Le noyau protéique est composé de quatre protéines histones, H3, H4, H2A et H2B (bleu, rouge, jaune et vert, respectivement). Une extension de 10 pb d'ADN figure de chaque côté du nucléosome. Les séquences des queues N-terminales des histones H3, H4, et H2B et la queue C-terminale de l'histone H2A sont également montrées, avec les résidus chargés lysine et arginine indiqués en bleu et rouge, respectivement.

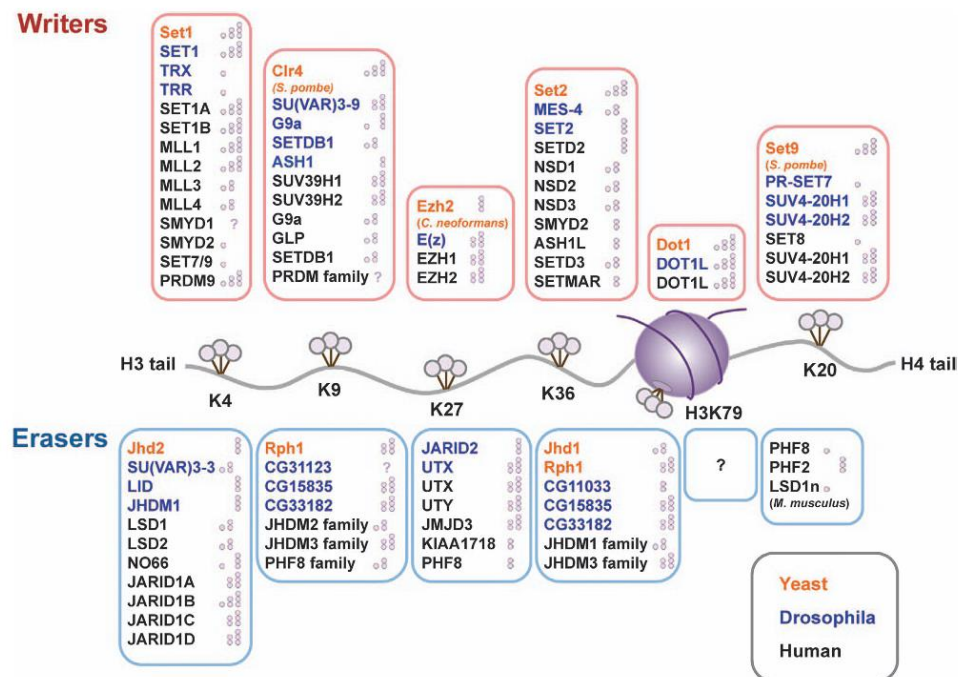
a. Complexes Polycomb et Trithorax

Les complexes protéiques modulant l'organisation de la chromatine et régulant l'expression des gènes comprennent des complexes Polycomb de répression de la transcription tels que PRC1 et PRC2, décrits comme régulant l'expression des gènes impliqués dans le développement, la différenciation (Kassis, Kennison, et Tamkun 2017). Les premières études sur ces complexes ont montré le contrôle des gènes du développement Homeotic/Hox (Lewis 1978). Les complexes Polycomb (PcG) et les complexes Trithorax (TrxG) fonctionnent de manière antagoniste (Geisler et Paro 2015) et sont composés soit d'histones méthyltransférases, soit d'histones méthylases, ou d'histones ubiquitines ligases. Ces complexes se lient à l'ADN grâce à des protéines adaptatrices au niveau de régions CpG non méthylées par exemple. Les complexes PcG sont impliqués dans la modification des H2AK119Ub, et H3K27me3. L'ubiquitination de la lysine 119 des protéines d'histones H2A est réalisée par les complexes polycomb PRC1, canoniques ou non canoniques, par les protéines RING (RING1A, RING1B ou leurs paralogues) (Taylor-Papadimitriou et Burchell 2022). H2AK119ub1 maintient une répression transcriptionnelle des gènes qu'elle contrôle. Dans ce contexte, BAP1 interagit avec ASXL1/2/3 (complexe BAP1.com), permettant la dé-ubiquitination de la lysine 119 de H2A et l'activation transcriptionnelle de gènes (Scheuermann et al. 2010; Campagne et al. 2019; Peng et al. 2018). Ces complexes ont d'abord été identifiés et étudiés chez le xénope durant les étapes du développement embryonnaire pour le contrôle de l'expression de gènes clés (Paro 1990).

Les méthylations de lysines représentent probablement les modifications les plus couramment associées à la régulation de l'expression des gènes. Le niveau de méthylation est assuré par des méthyltransférases et par des méthylases permettant de passer d'un état non méthylé (me0), à mono (me1), di (me2) et tri(me3) méthylé. La Figure 38 liste les lysines méthyltransferase (« *writers* ») et méthylases (« *erasers* ») (Hyun et al. 2017). Selon la position des marques d'histones, la méthylation est associée à l'activation transcriptionnelle par les complexes TrxG lorsqu'elle intervient au niveau des lysines 4, 36 ou 79 alors que la méthylation des lysines 9, 20 et 27 est plutôt associée à la répression transcriptionnelle par les complexes PcG (Figure 39, (Black, Van Rechem, et Whetstine 2012)).

Figure 38: Principales enzymes impliquées dans la méthylation des lysines des protéines d'histones.

Extrait de Hyun et al 2017.



Représentation schématique d'un nucléosome montrant les principaux sites de méthylation de la lysine sur les histones H3 et H4. Les *Writers* (méthyltransférases) et les *Erasers* (déméthylases) signalés pour chaque méthylation de la lysine sont également représentés avec leurs spécificités d'état de méthylation : cercle simple, me1 ; cercle double, me2 ; cercle triple, me3.

b. H3K4me3

La tri-méthylation de lysines 4 des histones H3 est présente au niveau de régions promotrices et du site d'initiation de la transcription (Figure 39, (A Shilatifard 2012; Santos-Rosa et al. 2002)). La méthylation de lysines 4 des histones H3 est réalisée par des lysines méthyltransférases, KMT : SETDB1, MLL, SETD1, EZH2, etc. via leur domaine SET (S. C. Dillon et al. 2005), au sein du complexe COMPASS (Complex Proteins Associated with Set1), dont les sous-unités sont associées à des fonctions distinctes (Black, Van Rechem, et Whetstine 2012; Miller et al. 2001; S. C. Dillon et al. 2005). Il a été rapporté que la mutation d'un des membres de ce complexe, pouvait altérer le fonctionnement du complexe dans son ensemble ou moduler sa spécificité (S. C. Dillon et al. 2005). La mutation de SET1A a par exemple été montrée dans le carcinome hépatique (T. Li et al. 2016). La mutation de SET1B identifiée dans le mélanome de la

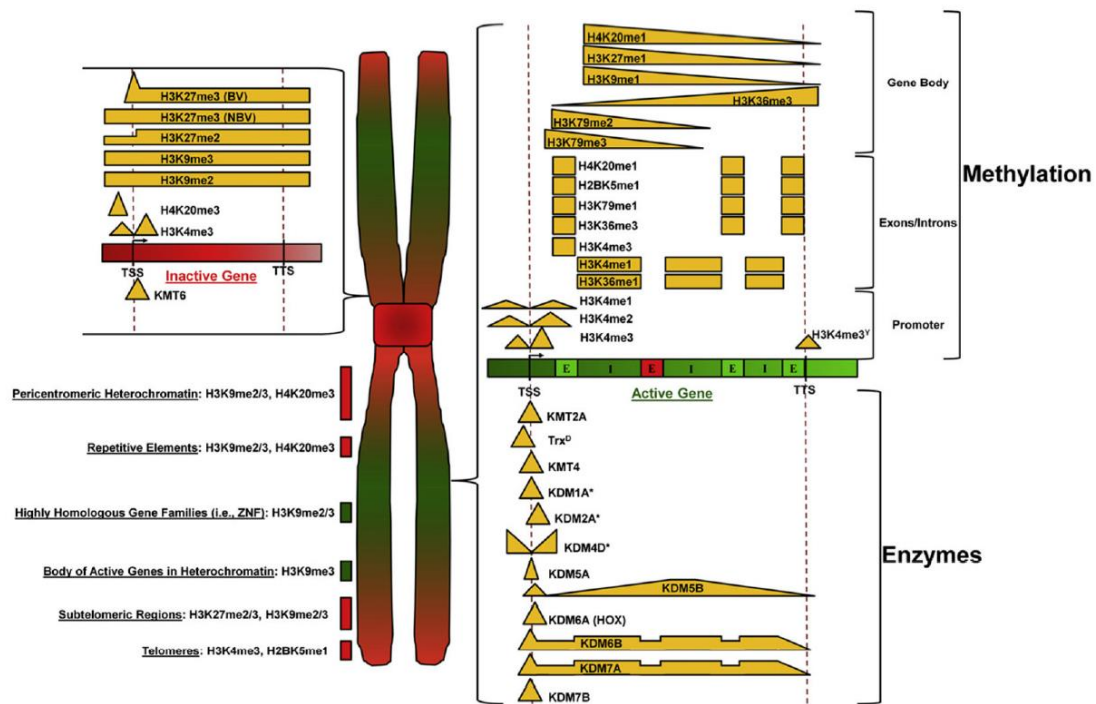
peau (Ceol et al. 2011) résulte en un gain de fonction qui accentue l'oncogenèse. La présence de mutations selon le domaine des protéines SET requiert une analyse détaillée car il semble que selon la mutation identifiée, elle altère la fixation de facteurs de transcription et dérégule spécifiquement certains gènes clés. De manière intéressante, les partenaires d'assemblages du complexe de méthylation des lysines 4 histones H3 ont été identifiés comme dépendant de l'ubiquitination des histones H2B, montrant un lien étroit mais complexe entre méthylation des H3K4 et ubiquitination des H2B (Sun et Allis 2002; Serrano-Quílez, Roig-Soucase, et Rodríguez-Navarro 2020; J. Choi et al. 2021). Parmi les mutations les plus fréquentes des lysines méthyltransférases (Kandoth et al. 2013), les altérations de KMT2A/MLL1 reposent sur des réarrangements structuraux dus notamment à des translocations équilibrées d'un allèle, présentes dans 70% des leucémies de l'enfant. Ces translocations ont pour conséquence de fusionner la partie N-terminale de MLL1 à plusieurs dizaines de partenaires différents (R. C. Rao et Dou 2015; Tenney et Shilatifard 2005). Ces mutations conduisent à des défauts de méthylation participant à une transformation oncogénique.

Selon le degré de méthylation des lysines 4 des histones H3, la déméthylation sera réalisée spécifiquement par les déméthylases telles que LSD1/2 (Yujiang Shi et al. 2004), NO66 et KDM5/JARID1 A-D (Tsukada et al. 2006). La déméthylation dépend également de la présence de cofacteurs (corépresseurs) (Yang Shi et Whetstine 2007; Ali Shilatifard 2006). La surexpression de LSD1 et SNAIL a été montrée comme de mauvais pronostic dans les carcinomes de l'hypopharynx, en favorisant l'EMT (Bottner et al. 2022).

Les mutations dans la famille de gènes KDM5/JARID1 donne lieu à une dérégulation des gènes HOX, exprimés précocément durant les étapes du développement (Christensen et al. 2007), dans les leucémies aiguës pédiatriques (de Rooij et al. 2013) mais aussi dans les cancers du sein (Yamane et al. 2007). De façon plus générale, les altérations de lysine méthyltransférases et de lysine déméthylases causées par mutation ou dérégulation de leur expression (KMT2B/MLL2, KDM1A/SUV39H1, etc) (Varier et Timmers 2011; Black et Whetstine 2013), et identifiées dans les médulloblastomes (Jones et al. 2012; Dubuc et al. 2013; Pajtler et al. 2013), sont associées à un phénotype oncogénique (perte de contrôle de la prolifération, inhibition de l'apoptose, migration), et constituent des cibles thérapeutiques intéressantes dans le médulloblastome (Pajtler et al. 2013) ou les leucémies (Karatas et al. 2013; F. Cao et al. 2014).

Figure 39: Localisation des marques d'histones méthylées et des enzymes impliquées dans leur méthylation.

Extrait de Hyun et al 2017.



La distribution des modifications de méthylation est représentée par rapport à l'emplacement chromosomique, ainsi que par rapport aux gènes actifs et inactifs. Le vert représente les régions de l'euchromatine, tandis que la couleur rouge représente les régions de hétérochromatine. Les distributions des modifications sont représentées par des barres, et les gradients sont dérivés de l'analyse métagène publiée dans le cadre des ensembles de données pangénomiques issus des travaux de nombreux laboratoires. Les auteurs ont inclus des graphiques provenant d'analyses métagéniques qui comprenaient à la fois un site de début de transcription (TSS, Transcription start site) et un site de fin de transcription (TTS, transcription terminaison site). Les enzymes marquées d'un * indiquent la distribution décrite par les analyses métagéniques qui n'incluaient pas à la fois un TSS et un TTS ou par les distributions publiées sous forme de cartes thermiques centrées sur le SCT. Dans le modèle de gène actif, le E vert représente les exons exprimés, tandis que le E rouge représente un exon non exprimé. I correspond aux introns. Les distributions découvertes dans des espèces spécifiques sont indiquées par : Y, *Saccharomyces cerevisiae* ; D, *Drosophila*. L'absence de dénotation indique une conservation entre plusieurs espèces. BV désigne les gènes bivalents, NBV les gènes non bivalents, HOX les motifs des gènes Hox et ZNF les gènes à doigts de zinc.

De façon intéressante, un lien étroit entre méthylation de l'ADN, localisation et méthylation des lysines 4 des histones H3, et transcription au niveau de promoteurs alternatifs a été montré dans le cerveau (Maunakea et al. 2010). En effet les CGI intragéniques identifiés comme promoteurs alternatifs (associés à un site de

transcription) ont été identifiés majoritairement non méthylés et associés à des marques d'histones H3K4me3, en comparaison de ceux méthylés et non –associés aux marque H3K4 non méthylés. Par ailleurs, la présence de marques activatrices et répressives de la transcription a pu être mise en évidence sur des régions de la chromatine bivalente. La présence de marques telles que H3K4me3 et H3K27me3 sur des promoteurs de gènes bivalents (poised DNA) (T. S. Mikkelsen et al. 2007; Barski et al. 2007; Bracken et al. 2006), protégerait de la méthylation et permettrait une régulation de l'expression de gènes comme durant le développement. Il apparaît d'ailleurs qu'une perte de H3K4me3, conduirait à une hyper-méthylation des régions considérées comme bivalentes, en particulier en situation tumorale (D. Kumar et al. 2021).

c. *H3K9me3 et H3K27me3*

La triméthylation de la lysine 9 sur les histones H3 (H3K9me3) est une marque associée à la répression de la transcription, et associée à l'hétérochromatine (Bracken et al. 2006; Z. Wang et al. 2008; Padeken, Methot, et Gasser 2022). Les différentes méthyltransférases en charge de la mono, bi et tri-méthylation de la lysine 9 des histones H3 sont : KMT1A/SUV39H1, KMT1B/SUV39H2, KMT1E/SETDB1, le dimère formé par KMT1C/G9a et KMT1D/GLP, etc. (Brower-Toland et al. 2009). La surexpression de KMT1C/G9a a été identifiée notamment dans plusieurs types de cancers ayant pour conséquence la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs comme *DSC3*, *MASPIN*, *DUSP5*, *SPRY4* (Wozniak et al. 2007; Hua et al. 2014). Par ailleurs, il existe 3 types de lysines déméthylases : KDM3/JHDM2, KDM4/JHDM3 et KDM7/PHF8 (Figure 38). La déméthylation des H3K9me3 est réalisée par les membres de la famille des KDM4/JHDM3, la déméthylation des H3K9me2 peut être réalisée par KDM3/JHDM2 et KDM4/JHDM3 (Yamane et al. 2006; Cloos et al. 2006; Klose et al. 2006). PHF8 déméthyle les H3K9 mono et diméthylées mais également les H3K9me3 associées au H3K4me3 (Loenarz et al. 2010). Il a été montré que le rôle de la déméthylase PHF8 explique la localisation exclusive des marques H3K4me3 et H3K9me3 (Horton et al. 2010). La présence de mutations dans les lysines déméthylases peut altérer leur spécificité, comme il a été rapporté pour KDM4A/JMJD2 (Hillringhaus et al. 2011; Wilson 2007; Varier et Timmers 2011; Black et Whetstine 2013). Enfin de façon intéressante, il existe des interactions entre les lysines méthyltransférases des lysines 9 des histones H3 et les ADN méthyltransférases (Fuks et al. 2003; Rothbart et al. 2012; Babbio et al. 2012), via par exemple HP1, dont les fonctions restent à préciser (Ren et al. 2020), en dehors des régions péri-centriques (Lehnertz et al. 2003).

La triméthylation de la lysine 27 des histones H3 est probablement la marque la plus caractéristique de la répression de la transcription. La méthylation de cette lysine est réalisée par la lysine méthyltransférase KMT6A/EZH2 (Enhancer of Zeste 2) du complexe répressif polycomb 2, PRC2. EZH2 assure le rôle catalytique dans la mono-, di- et tri-méthylation via son domaine SET (S. C. Dillon et al. 2005; Pasini et Di Croce 2016). EZH1/2 forment le complexe PRC2, avec les cofacteurs tels que EED (embryonic ectoderm development), SUZ12 (suppressor of zeste 12) et RbAp46/48 dépourvus (R. Cao et al. 2002; Montgomery et al. 2005; Pasini et al. 2004; Margueron et al. 2009). Il est intéressant de noter que d'autres protéines sont associées au complexe PRC2 comme AEBP2 ou JARID2, dont la méthylation réalisée par le complexe PRC2 constitue une boucle de rétrocontrôle qui régule l'activité du complexe PRC2 (Serena Sanulli et al. 2015). *EZH2* a été identifié dans un bon nombre de cancers comme étant muté (tyrosine 646 chez l'humain, (Morin et al. 2010; Tirode et al. 2014; Souroullas et al. 2016)) ou surexprimé, conduisant à l'extinction de gènes suppresseurs de tumeurs (J. Yu et al. 2010; J. C. Zhao et al. 2012; J. Kim et al. 2018), et le constitue ainsi comme une cible thérapeutique intéressante (K. H. Kim et Roberts 2016). Les travaux récents de Donaldson-Collier et al (Donaldson-Collier et al. 2019), ont pu montrer par des analyses intégratives combinant analyse de la topologie (Hi-C, (S. S. P. Rao et al. 2014)), analyse de positions de H3K37me3 par ChIP-Seq et expression de gènes par RNAseq, que la mutation d'*EZH2* a pour conséquence d'enrichir en marques H3K27me3 les compartiments inactifs (n=72). Cette mutation résulte en la modification de certaines interactions de la chromatine au niveau de domaines topologiques associés, inactivant l'expression de gènes comme des gènes suppresseurs de tumeurs (*FOXO3*, *ARMC2*, *SESN1*) par des changements d'interactions entre promoteurs au sein de même domaines topologiques. Dans ces travaux, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacogénomiques d'EZH2 (GSK126 and EPZ6438), restaurent l'expression de ces gènes, ne modifient pas les bornes des domaines d'interactions mais modifient leur forme. Par ailleurs, il a été montré que d'autres voies non-canoniques impliquaient le domaine catalytique d'EZH2. Il a par exemple été montré que le complexe PRC2 assure la méthylation de facteurs de transcription dans le cytosol comme GATA4, STAT3, RORA (E. Kim et al. 2013; A. He et al. 2012; J. M. Lee et al. 2012). La méthylation de protéines via le complexe PRC2 et plus précisément via EZH2, EED et SUZ12, permet de recruter Cul4B via DCAF1 et DDB1 pour l'ubiquitination des protéines méthylées (J. M. Lee et al. 2012). L'ubiquitination de protéines active une cascade enzymatique via les enzymes E1, E2 et E3 (Culines 1, 2, 3, 4A, 4B, 5 et 7) conduisant à la dégradation des protéines ubiquitinylées dans le protéasome (Pickart 2004; Timms et Koren 2020). Les H3K27me2/me3 déméthylases sont les enzymes KDM6A/UTX, KDM6C/UTY et KDM6B/JMJD3 (Agger et al. 2007; De Santa et al. 2007; Walport et al. 2014).

d. H3K27Ac

La présence et l'augmentation de marques d'histones acétylées sur la lysine 27 des histones H3 (H3K27Ac) au niveau d'éléments régulateurs à distance du promoteur participe à l'activité transcriptionnelle (T. Roh et al. 2007; Creyghton et al. 2010; Visel et al. 2009). L'acétylation des lysines 27 des histones H3 est réalisée par des histones acétyl-transférases (HAT), comme p300 ou CBP (Visel et al. 2009; Eckner et al. 1994; Heintzman et al. 2007). A l'inverse, la déacétylation réalisée par des histones déacétylases HDACs, est associée à une répression transcriptionnelle (Berger 2007). La dérégulation de ces enzymes (HAT et HDAC) a par ailleurs été rapportée dans plusieurs cancers. Il a également été montré que la présence de H3K4me3 facilitait l'acétylation de lysines portées par les histones H3 (H3K9ac, H3K16ac). Les diverses marques d'acétylation de lysines étant exclusives, et présentes soit à l'initiation de la transcription, soit à l'élongation de la transcription (Z. Wang et al. 2008), leur mise en évidence permet de mieux comprendre les mécanismes fins de la régulation de la transcription.

Globalement, l'analyse des marques activatrices (H3K4me3, H3K27Ac) et répressives (H3K27me3, H2Aub) portées par les protéines d'histones permet d'identifier des régions régulées modifiant l'expression des gènes selon le positionnement de ces marques dans des situations pathologiques. Ces variations de marques d'histones sur des loci ont été identifiées comme altérées dans plusieurs types de cancers, à la suite de réarrangements structuraux, dérégulant l'expression des gènes à distance, et cela soit en l'absence de régulation de la méthylation de l'ADN, (comme dans le cancer de la vessie (Stransky et al. 2006)), soit en association avec des régulations de méthylation de l'ADN (cancer du colon, (Frigola et al. 2006), cancer du sein (Novak et al. 2006)). L'altération d'EZH2 par mutation identifiée comme jouant un rôle clé dans l'oncogenèse des lymphomes B dans les centres germinatifs du fait de régulation de H3K27me3 au niveau de promoteurs de gènes impliqués dans la différenciation (Béguelin et al. 2013). L'étude d'altérations des partenaires des complexes impliqués, associées à la modification des charges d'histones et modifiant l'équilibre de régulation de l'expression des gènes constituent une analyse intégrative prometteuse pour in fine l'identification de cibles thérapeutiques (Taylor-Papadimitriou et Burchell 2022; Frigola et al. 2006; Novak et al. 2006; Béguelin et al. 2013; Lohr et al. 2012; Morin et al. 2011).

3. Modulation de l'expression des gènes selon l'organisation de la chromatine

Les analyses de conformation de la chromatine ont permis de montrer que les marques d'acétylation ou de méthylation, des histones H2 et H3 sont associées à des séquences spécifiques de l'ADN. Les modifications des histones H4 sont quant à elles plutôt associées aux liaisons entre nucléosomes (Erler et al. 2014; Kan et Hayes 2007). L'agencement des protéines contribue à la plasticité et aux fonctions de l'ADN : la réplication, la transcription, ainsi que la réparation des dommages à l'ADN (Müller et Almouzni 2014; Grewal et Jia 2007; S. Sanulli et al. 2019). Le positionnement des histones est complexe, car dépendant de protéines chaperonnes (HP1, ASF1, CAF1, CABIN1, HJURP, ...) et de protéines de remodelage de la chromatine (protéines SWI/SNF, ISWI, INO80 et CHD (Tyagi et al. 2016), lesquelles modifient par exemple l'espacement des histones et le repliement de l'ADN. Le positionnement des histones est hétérogène et contribue à différents niveaux d'organisation tridimensionnelle de l'ADN selon les interactions entre les nucléosomes eux-mêmes. La position des nucléosomes varie selon la régulation de la transcription (Cairns 2009; Valouev et al. 2011). Hormis une région de 150nt près du site de transcription très peu recouverte en nucléosomes (NFR : Nucleosome Free region, riches en polyA), les régions promotrices proches du site de transcription (TSS : transcription start site) sont recouvertes comme les régions codantes, de nucléosomes portant des modifications telles que H3K4me3 ou H3K27Ac, ou les éléments régulateurs à distance tels que les enhanceurs facilitant la transcription. L'analyse de la combinaison de plusieurs marques, par l'immuno-précipitation de la chromatine puis séquençage massif des régions d'ADN associées, permet d'évaluer l'état de la chromatine.

Les premiers travaux d'étude de l'organisation des chromosomes dans le noyau datent de 1885 faisant état de différents domaines lors de la mitose, du fait de l'orientation des centromères et des télomères communs à différentes espèces. Durant l'interphase, les chromosomes sont organisés en territoires, soit décondensés sous forme d'euchromatine (A-compartments) soit compactés sous forme d'hétérochromatine (B-compartments) (T. Cremer et Cremer 2001; Kosak et Groudine 2004; Dekker et al. 2002). Les régions les plus denses en gènes sont plutôt présentes au centre du noyau alors que les régions les moins denses en gènes ou composées de séquences répétitives sont plutôt localisées à la périphérie du noyau et associées à la lamine nucléaire (Thomas Cremer et al. 2006; Yu Zhang et al. 2012; Bickmore et van Steensel 2013; Nishibuchi et Déjardin 2017). Cette organisation dynamique de la topologie de l'ADN est associée à des niveaux d'expression des gènes, dont l'analyse combinée permet de

mieux comprendre le positionnement de gènes dans certains territoires (T. Cremer et Cremer 2001; Sexton et al. 2007).

L'analyse de l'organisation de la chromatine par des techniques de capture de la conformation puis de séquençage massif a permis de montrer différents niveaux de « compartimentalisation » (Dekker et al. 2002; Lieberman-Aiden et al. 2009) (Figure 40). Des cartes de contacts permettent de montrer que différents niveaux d'organisation de la chromatine peuvent être identifiés formant des territoires d'interaction à l'échelle du chromosome mais également à des résolutions importantes notamment d'1Mb pour l'identification de domaines topologiques d'interactions ou TAD (Topological Associated Domains, Figure 40 C, D et E). L'analyse de la conformation de la chromatine est un domaine qui évolue selon le développement de méthodes simplifiées comme celui développé en 2015 par Dr Suhas Rao dans l'équipe de Dr Lieberman-Aiden (S. S. P. Rao et al. 2014). Ce protocole « *in situ* Hi-C », utilise Mbo1 comme enzyme de restriction reconnaissant un site de restriction de 4 paires de bases, augmentant la résolution à 1kb alors que précédemment l'usage de HindIII reconnaissant un site de 6bp donnait une résolution de 10kb (Lieberman-Aiden et al. 2009). Le protocole d'*in situ* Hi-C permet de réaliser une analyse de la topologie avec moins de cellules (1-5 millions vs 20 millions). Alors que les étapes initiales du protocole de Dr Job Dekker (Belton et al. 2012) de digestion ligation sont réalisés après lyse cellulaire dans des volumes importants, le protocole de Rao et al, propose des volumes réactionnels réduits et les étapes de digestion et ligation ont lieu dans les noyaux des cellules fixées générant in fine des données de séquençage de meilleure qualité favorables à des analyses de résolutions plus importantes (1kb).

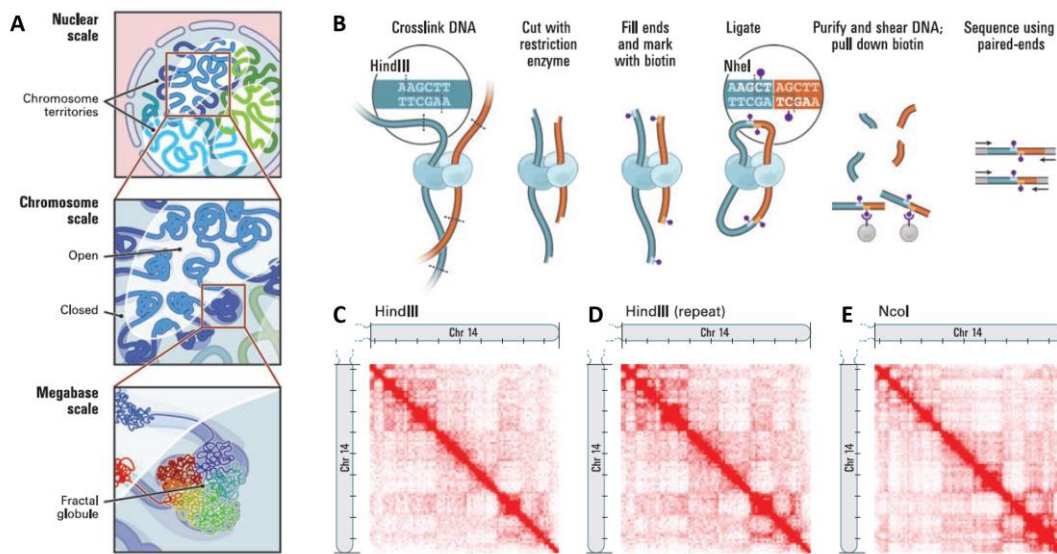
Le protocole d'*in situ* Hi-C a permis l'identification des boucles formées par des sous structures d'interactions de l'ADN au sein des TADs lesquelles correspondent à la structure primaire d'organisation de la chromatine. A l'intérieur de ces TADs, les régions du génome interagissent ensemble (Dixon et al. 2012; Nora et al. 2012) de telle sorte que les interactions au sein des TAD sont 2 à 3 fois plus importantes qu'en dehors du génome, en l'absence de réarrangements. Plus récemment (2020-2021), l'équipe du Dr Johan Gibcus et du Pr Job Dekker a apporté de nouvelles améliorations pour l'identification de boucles, de TAD et de compartiments grâce à la modification des paramètres de fixation et l'usage de 2 enzymes de restriction (DpnII et DdeI, (Oksuz et al. 2020; Lafontaine et al. 2021)).

L'analyse de l'organisation de la chromatine en 3D permet donc d'identifier des compartiments entre 1 et 10Mb (de taille médiane de 3Mb), ou méga-domaines, dans lesquels l'activité transcriptionnelle est active ou inactive comme proposé par les travaux de Lieberman-Aiden, Leonid Mirny, Eric Lander et Job Dekker (Lieberman-Aiden et al. 2009). Bien que deux types de compartiments aient été proposés, il semble

que cette dichotomie n'est pas suffisante pour refléter l'activité de la chromatine. Les travaux de Rao puis ceux de Giovanni Ciriello (Yuanlong Liu et al. 2021) ont proposé une subdivision en 6 à 8 sous compartiments respectivement prenant en compte la position et l'enrichissement de marques d'histones (H3K4me1, H3K4me3, H3K36me3, H3K27me3, H3K27ac, H3K79me2, et H3K9Ac). La proposition de classification la plus récente en 4 état actifs (A1.1, A1.2 et A2.1, A2.2), et 4 états inactifs (B1.1, B1.2, B2.1 et B2.2) du groupe de Giovanni Ciriello, permet de compléter l'analyse de topologie à une résolution importante intégrant la fonctionnalité des compartiments considérés. Cette classification permet de mieux identifier les interactions à l'échelle de quelques megabases, elle propose une analyse intégrative majeure (via l'algorithme Calder) pour l'analyse de l'organisation fonctionnelle de domaines topologiques associés (TAD) grâce à l'implémentation de données épigénétiques des positions de plusieurs marques d'histones.

Figure 40: Schéma d'organisation de la chromatine à différentes échelles.

Extrait de Lieberman-Aiden et al 2009.



A. Architecture du génome à trois échelles. (Haut) Deux compartiments, correspondant à la chromatine ouverte et fermée, partitionnent spatialement le génome. Les chromosomes (bleu, cyan, vert) occupent des territoires distincts. (Au milieu) Les chromosomes individuels se faufilent entre les compartiments de chromatine ouverts et fermés. (En bas) À l'échelle d'une mégabase, le chromosome est constitué d'une série de globules fractales. B-E. Vue d'ensemble de Hi-C. (B). Les cellules sont fixées à l'aide de formaldéhyde, ce qui entraîne des liens covalents entre des segments de chromatine spatialement adjacents (les fragments d'ADN sont représentés en bleu foncé et en rouge ; les protéines, qui peuvent servir de médiateurs à ces interactions, sont représentées en bleu clair et en cyan). La chromatine est digérée avec une enzyme de restriction (ici, HindIII ; le site de restriction est marqué par une ligne pointillée ; voir l'encadré), et les extrémités cohésives résultantes sont complétées de nucléotides, dont l'un est biotinylé (point violet). La ligation est effectuée dans des conditions extrêmement diluées pour créer des molécules chimériques ; le site HindIII est perdu et un site NheI est créé (encadré). L'ADN est purifié et fragmenté. Les jonctions biotinyliées sont isolées avec des billes de streptavidine et identifiées par séquençage des extrémités (paired-end sequencing). (C) Hi-C produit une matrice de contact à l'échelle du génome. La sous-matrice représentée ici correspond aux interactions intrachromosomiques sur le chromosome 14. (Le chromosome 14 est acrocentrique ; le bras court n'est pas représenté.) Chaque pixel représente toutes les interactions entre un locus de 1 Mb et un autre locus de 1 Mb ; l'intensité correspond au nombre total de lectures (0 à 50). (D et E) Nous avons comparé l'expérience originale aux résultats d'une répétition biologique utilisant la même enzyme de restriction [(C), plage de 0 à 50 lectures] et aux résultats utilisant une enzyme de restriction différente [(D), NcoI, plage de 0 à 100 lectures].

La définition des TAD dépend de la résolution des données de Hi-C (Filippova et al. 2014), et différents niveaux de TAD peuvent être définis dès lors que des sous-TAD sont détectés comme inclus. Bien que l'échelle du mégabase corresponde à l'analyse des TAD, leur taille varie entre 40kb et 3Mb, avec une taille médiane de 185kb (S. S. P. Rao et al. 2014). Les bornes et la taille des TAD sont stables entre différents types de cellules normales (S. S. P. Rao et al. 2014), cependant l'organisation des boucles

internes est dynamique pouvant varier au sein d'un même type cellulaire. Les compartiments sont également dynamiques comme par exemple au cours de la différenciation où 25% des compartiments peuvent passer d'un état actif à inactif, et vice-versa (Dixon et al. 2015). Le changement d'activité d'histones méthyltransferases comme SUV39H1, peut par exemple modifier un compartiment actif vers inactif (Wijchers et al. 2016). Le gain de fonction apporté par la mutation activatrice d'EZH2 dans des modèles de lymphomes a été caractérisé par une augmentation des marques H3K27me3 sur l'ensemble des TADs plutôt dépourvus de H3K27 méthylées. Cet enrichissement en H3K27me3 est associé à une répression transcriptionnelle, montrant que la mutation d'EZH2 rend certains TAD inactifs, à l'intérieur desquels les interactions promoteurs –promoteurs sont perturbées (Donaldson-Collier et al. 2019). Les perturbations d'interactions d'enhanceurs et promoteurs ont également été rapportées dans les lymphomes, selon l'hyper acétylation des marques H3K27 conduisant à l'activation de subTAD, et la dérégulation d'oncogènes (Sungalee et al. 2021). D'ailleurs des réarrangements structuraux comme des translocations t(3;8) ont été montrés comme contribuant à l'oncogenèse en modifiant la topologie, donnant lieu à de nouvelles interactions apportant des régions riches en H3K27Ac entre le chr3 (enhanceurs de *BCL6*) et le chr8 au voisinage de *MYC* (Sungalee et al. 2021). L'hyper-acétylation due à la protéine de fusion BRD4-NUT (French et al. 2003), perturbe également les interactions au niveau de méga-domaines (à l'échelle de centaines de mégabases) favorisant les contacts à large distance interchromosomiques (Rosencrance et al. 2020). A l'interface de la biophysique, des expériences utilisant des polymères, permettant de modéliser les interactions, devraient aider à mieux comprendre l'organisation de la chromatine, et sa dynamique (Fudenberg et al. 2016).

L'analyse des interactions à une échelle de l'ordre du kilobase, au sein des TADs, permet d'identifier des interactions directes en *cis* et en *trans* composées de boucles d'extrusion, dont les extrémités vont rapprocher des séquences d'ADN ainsi que des complexes formés de protéines principalement, permettant la réplication, la réparation et la transcription de l'ADN. L'organisation de la topologie de l'ADN requiert la formation de boucles présentent à la fois aux extrémités des compartiments et des TADs ainsi qu'au sein des TADs eux-mêmes (Phillips-Cremins et al. 2013; Sofueva et al. 2013). Ces boucles sont échafaudées grâce à un dimère de protéines de liaison à l'ADN, CTCF, reconnaissant un motif sur chaque brin pour former une boucle selon l'orientation de ce motif (CCCTC) (de Wit et al. 2015; Nora et al. 2020), ainsi qu'au complexe Cohésin qui stabilise ces boucles. CTCF est une protéine d'insulation permettant de rapprocher deux éléments distants de quelques kilobases à quelques mégabases ou au contraire d'isoler une région activatrice (Bell, West, et Felsenfeld 1999). L'identification de ces boucles par des approches de ChIP-seq contre CTCF, permet alors de mettre en évidence des interactions de régulations selon les sites CTCF

et leur orientation (Y. Guo et al. 2015). Les boucles d'extrusion ont permis d'identifier le rôle des enhanceurs (Bulger et Groudine 2011) dans les promoteurs d'abord chez la drosophile puis dans d'autres organismes eucaryotes dont l'humain (Welshons et Keppy 1975; Vazquez et Schedl 2000; Vogelmann et al. 2011). La fixation de CTCF est variable entre les types cellulaires assurant une certaine plasticité (H. Wang et al. 2012). Sachant que l'occupation de CTCF est sensible à la méthylation des ilots CpG pour une faible proportion des sites de fixation (H. Wang et al. 2012; Feldmann et al. 2013), la dérégulation de certains sites de liaison de CTCF causée par hyper-méthylation d'ilots CpG peut être identifiée dans certains cancers en particulier lorsqu'associés à des défauts de méthylation à l'échelle de leur génome. Il est intéressant de noter qu'à la suite d'une mutation activatrice d'*IDH1/2* dans les gliomes produisant un onco-métabolite compétiteur de TET1/2 (Dang et al. 2009; Figueroa et al. 2010), plusieurs gènes proches des sites CTCF aux extrémités de TAD sont dérégulés par la perte de fixation de CTCF, parmi lesquels l'oncogène *PDGFRA* (Flavahan et al. 2016). Dans ce cas, le promoteur de *PDGFRA* se retrouve interagir avec un enhanceur de *FIP1L1*, du fait de l'insulation du site CTCF hyperméthylé (Flavahan et al. 2016).

Le complexe multi-protéique Cohesin composé de SMC3, SMC1, RAD21, SCC1, SCC3, et SA1/2, stabilise quant à lui cette structure formée par CTCF et permet de rapprocher ou d'éloigner des éléments régulateurs de la transcription, à distance des promoteurs (Rubio et al. 2008; Parelho et al. 2008). La présence de protéines dans le complexe Cohesin, maintient la cohésion de l'architecture de cette organisation, pour une communication directe entre enhanceur et promoteur. L'extrusion des régions génomiques impliquées dans ces boucles peut elle-même être en contact d'autres régions et jouer un rôle régulateur.

RESULTATS

MISE EN PLACE D'OUTILS POUR L'ISOLEMENT DE CELLULES TUMORALES

Les caractérisations moléculaires envisagées sur quelques modèles cellulaires reposent sur l'analyse du génome entier par séquençage massif, l'analyse globale de méthylation sur l'ADN génomique, l'analyse structurale du génome par technique Hi-C, analyse transcriptomique, l'analyse de plusieurs marques d'histones méthylées ou acétylées. Ces analyses requièrent plusieurs dizaines de millions de cellules (40 à 60x10⁶) si l'on souhaite que l'ensemble des analyses proviennent du même échantillon. Afin de réaliser ces analyses moléculaires au plus près du contexte tumoral, plutôt qu'*in vitro*, nous avons choisi d'utiliser des cellules issues de xénogreffes de tumeurs humaines (PDX) établies par l'équipe de Dr Fariba Némati à l'institut Curie. A l'issue des greffes, et lorsque les tumeurs ont atteint une taille raisonnable ne dépassant les tailles éthiques pour l'animal (1cm), les tumeurs ont été réséquées pour être analysées dans cette étude. Comme les biopsies peuvent contenir un contingent murin important (30-70%), et de manière à éviter que les analyses par séquençage massif soient contaminées par des séquences murines, une étape de dissociation et de tri cellulaire a été envisagée comme décrit par Valérie Petit et al (Petit et al. 2013) pour étudier les cellules tumorales humaines. Cette approche présente un intérêt en particulier pour réaliser les analyses onéreuses de la conformation de la chromatine par la technique Hi-C-seq et disposer d'un très grand nombre de molécules séquencées et atteindre une résolution suffisante.

A. MISE AU POINT D'ANTICORPS SPECIFIQUES DE CELLULES TUMORALES DERIVEES DE MELANOMES UVEAUX.

Ce travail doctoral a profité de la mise au point concomitante d'anticorps spécifiques dans l'objectif de caractérisation de l'hétérogénéité cellulaire des mélanomes uvéaux. La mise au point d'anticorps par une approche de phage display a été engagée dans le département de recherche translationnelle, avec la plateforme Tablp de l'Institut Curie dirigée par les Drs Ario Di Marco, Sandrine Moutel, et Franck Perez, et avec la Dr Fariba Némati du Laboratoire d'Investigation Préclinique. Mon travail a consisté à participer à la mise au point des anticorps en vérifiant les altérations moléculaires des cellules marquées par les clones identifiés comme spécifiques des cellules tumorales de mélanomes uvéaux. Une approche de phage display exprimant des bibliothèques de

nanobodies (anticorps de lama, monocaténaires) a ainsi été entreprise en collaboration avec le Dr Ronan Crépin de la plateforme Taplp.

Le développement d'anticorps a conduit après sélection contre des cellules RPE1 (lignée cellulaire de cellules épithéliales pigmentaires de rétines, immortalisées), à la sélection de 4 anticorps (8H2, 8G5, 14A7, 14A9) testés et validés à l'aide de différents modèles cellulaires métastatiques de mélanomes uvéaux. La caractérisation a permis de montrer que le clone 8H2 dirigé contre un épitope identifié de MUC18, était l'anticorps le plus intéressant pour l'isolement des cellules de mélanome uvéal à partir des modèles MP41, et MP46. Les cellules isolées par FACS grâce à l'anti Muc18 ont été vérifiées sur la plan génomique et transcriptomique. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2017 où Ronan Crépin et moi-même sommes co-premiers auteurs. (Crépin et al. 2017).

Nanobodies against surface biomarkers enable the analysis of tumor genetic heterogeneity in uveal melanoma patient-derived xenografts

Ronan Crépin^{1,†,a}, David Gentien^{2,†}, Angeline Duché², Audrey Rapinat², Cecile Reyes², Fariba Némati², Gérald Massonnet², Didier Decaudin^{2,3}, Selma Djender^{1,4}, Sandrine Moutel^{2,4,5}, Klervi Desrumeaux^{1,a}, Nathalie Cassoux⁶, Sophie Piperno-Neumann⁷, Sebastian Amigorena^{4,8,9,10}, Franck Perez^{1,4,5}, Sergio Roman-Roman² and Ario de Marco^{1,9,10,11} 

1 Tumor Target and Therapeutic Antibody - Identification Platform (TAb-IP), Paris Cedex 05, France

2 Translational Research Department, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France **3** Medical Oncology Department, Institut Curie, Paris Cedex 05, France **4** Institut Curie, PSL Research University, Paris Cedex 05, France **5** UMR144, Institut Curie, Paris, France **6** Department of Surgical Oncology, Institut Curie, Paris, France **7** Department of Medical Oncology, Institut Curie, Paris, France **8** INSERM Unit 932, Paris cedex 05, France **9** SIRIC INCa-DGOS-4654, Paris, France **10** CIC IGR Curie 1428, Paris, France **11** Department of Biomedical Sciences and Engineering, University of Nova Gorica (UNG), Vipava, Slovenia **a** Present address: Sanofi, 13 quai Jules Guesde, 94403 Vitry-sur-Seine, France

CORRESPONDENCE Ario de Marco, e-mail: ario.demarco@ung.si

[†]These two authors contributed equally to the work.

KEYWORDS nanobodies/uveal melanoma/patient-derived xenografts/MUC18/membrane surface biomarkers/panning/tumor polyclonality

PUBLICATION DATA Received 1 December 2016, revised and accepted for publication 23 January 2017, published online 31 January 2017

doi: 10.1111/pcmr.12577

Summary

Monoclonal antibodies specific for biomarkers expressed on the surface of uveal melanoma (UM) cells would simplify the immune capture and genomic characterization of heterogeneous tumor cells originated from patient-derived xenografts (PDXs). Antibodies against four independent tumor antigens were isolated by panning a nanobody synthetic library. Such antibodies enabled flow cytometry-based sorting of distinct cell subpopulations from UM PDXs and to analyze their genomic features. The complexity and specificity of the biochemical and genomic biomarker combinations mirrored the UM tumor polyclonality. The data showed that MUC18 is highly and universally displayed on the surface of UM cells with different genetic background and consequently represents a reliable pan-biomarker for their identification and purification. In contrast, the other three biomarkers were detected in very variable combinations in UM PDX cells. The availability of the identified nanobodies will be instrumental in developing clone-specific drug evaluation and rational clinical strategies based on accurate genomic profiling.

Introduction

Uveal melanoma (UM) is the most frequent and aggressive ocular primary tumor in adults and its age-adjusted incidence remained unchanged in the last 25 yr. Enucleation is the

standard treatment for large tumors, while smaller tumors are accessible to conservative therapy (eye-conserving surgery-local resection, brachytherapy, or proton beam irradiation). Up to 50% of the patients develop metastases—mostly in the liver—with similar risk after enucleation or

Significance

The collected data show the feasibility to select nanobodies specific for biomarkers expressed on uveal melanoma cells by panning directly against cells recovered from patient-derived xenografts. These antibodies were suitable for identifying and capturing selectively cells with different genomic profile and are suitable for targeting metastatic cells with diagnostic and therapeutic reagents. This would represent a clear advantage over the presently available clinical tools.

conservative local treatment (Singh et al., 2011). Despite encouraging preclinical achievements (Luke et al., 2014), there is no treatment to prevent such metastases and chemotherapy showed limited efficacy, probably because of the multiple resistance mechanisms of melanoma cells (Velho et al., 2012). Genetic alterations of chromosome 3 (Damato et al., 2007; Prescher et al., 1996; Tura et al., 2016) and chromosome 8 and the loss of function of the tumor suppressor gene BAP1 products have been shown to be highly predictive of a poor prognosis (Damato et al., 2007; Harbour et al., 2010; Luke et al., 2014; Murali et al., 2013). The paucity of reliable specific markers and corresponding diagnostic tools has prevented early UM metastatic detection and correlation with prognosis. So far, there are few data describing potential soluble uveal melanoma biomarkers and they are contradictory, for instance concerning the predictive value of IGF1 (Frenkel et al., 2013; Triozzi et al., 2013). The analysis of circulating tumor cells as a prognostic biomarker has been proposed without a clear demonstration of its reliability (Torres et al., 2011; Tura et al., 2014). Proteins specifically secreted from primary UM cells have been recently identified (Angi et al., 2016), and further analysis will enable to evaluate more precisely their contribution to metastasis. Proteomic surveys identified also some inner-cell candidates (Linge et al., 2012), but their usefulness for diagnostics and therapeutic targeting is limited due to their *in vivo* inaccessibility. In contrast, cell surface biomarkers specifically expressed by the metastatic form of UM would be targetable by naked and armed antibodies and suitable for *in vivo* imaging and therapeutic applications. This may result in a significant improvement of the disease outcome. Furthermore, biomarkers specific for any different UM cell subtypes would be beneficial to characterize tumor intraheterogeneity and hopefully to elucidate the reasons for varying drug sensitivity. Here we

describe a successful multiple differential panning strategy that allowed for the isolation of UM-specific recombinant antibodies (VHHs/nanobodies) from a large synthetic phage display library (Moutel et al., 2016) after depletion on control cell populations. Such miniaturized antibodies (14 kDa) can be produced inexpensively in bacteria, are easy to engineer into application-specific reagents, and represent a promising tool also for *in vivo* diagnostics (de Marco, 2012). In the present work, the selected antibodies were directed against exposed membrane biomarkers that were identified by immuno-precipitation and mass spectrometry. The recovery of antibodies specific for several different UM antigens offered the opportunity to improve the selective flow cytometry-based recovery and clonal characterization of UM cells extracted from patient-derived xenograft (PDX) material.

Results

Antibodies directed against antigens exclusively expressed on the surface of a cell subpopulation can be selected *in vitro* by adopting a two-step biopanning strategy using large pre-immune phage-displayed antibody libraries (Figure S1). First, the phage library is incubated with a large number of control cells to deplete all the potentially cross-reacting binders. Then, the unbound phages are allowed to interact with the target cell population to select antibodies specific for antigens expressed at the cell surface. We carried out three biopanning rounds using a large synthetic library of single-domain antibodies (VHH/nanobody) displayed on filamentous phages (Moutel et al., 2016). Clones of selected VHHs were then screened by flow cytometry to determine their specificity for the target cell population (Figure 1). Cells used for the depletion steps were used

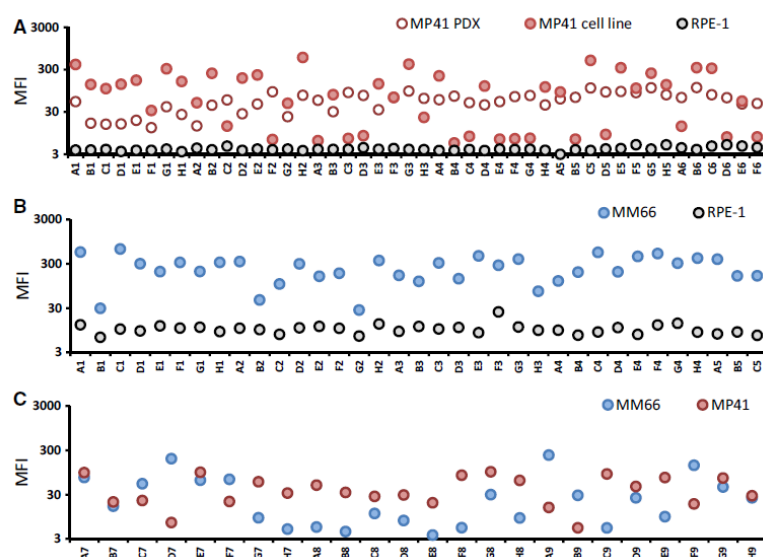


Figure 1. Panning strategies for the identification of antibodies specific for biomarkers overexpressed on the surface of Uveal Melanoma cells corresponding to primary and metastatic tumors. (A) The pre-immune library was depleted using RPE1 cells, and specific binders were selected against cells issued from a MP41 (primary) PDX. Selected clones were validated by FACS analysis using RPE1 cells as a control and MP41 cells from either clonal line or PDX. (B) Specific binders were selected and validated as above, but MM33 (metastatic) PDX cells were used for selection and MM66 (metastatic) cells for validation. (C) The depletion step was performed using primary tumor MP41 cells, the selection in the presence of metastatic MM33 PDX cells, and the validation using metastatic MM66 cells.

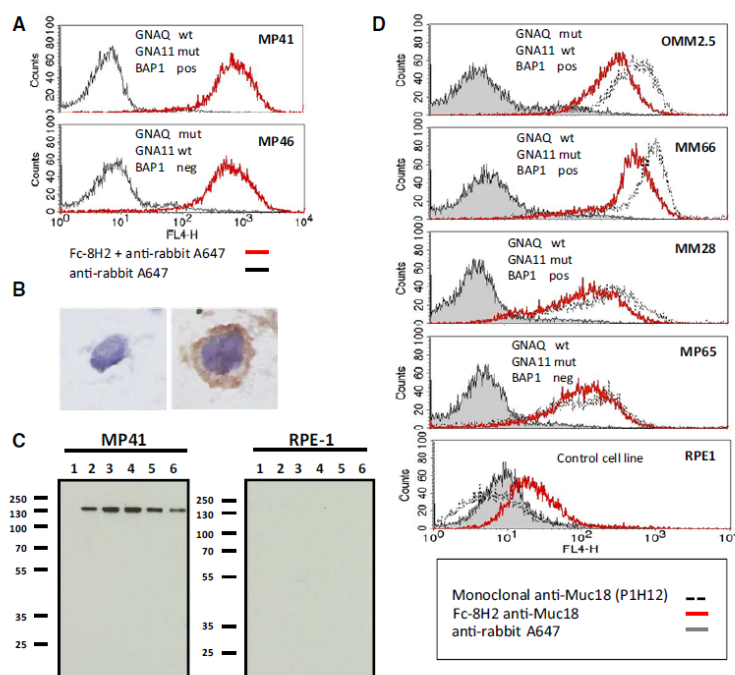
as negative control. In the first two campaigns, the depletion step was performed against hTERT-immortalized normal retinal pigment epithelial cells (RPE-1). The selection step was performed using cells isolated either from primary (MP41, Figure 1A) or metastatic (MM33, Figure 1B) UM PDXs. In the third case, the primary UM cells MP41 were used for the depletion and metastatic cells MM33 for the selection step (Figure 1C). PDXs were used because enable a panning strategy that is the best compromise between the use of 'real' primary tumors (fresh material) and the necessity to avoid manipulating material with non-reproducible differences (due to individual variability) during the repeated panning cycles.

After the first biopanning (Figure 1A), cells isolated either directly from the PDX (MP41 PDX) or the corresponding stable cell line (MP41 cell line) were used for the positive screening. Eighty-eight of the 96 analyzed clones recognized specifically MP41 cells. Sequencing of these clones revealed that they corresponded to 46 unique sequences. Note that several binders showed variable detection efficacy toward PDX-extracted cells and cells from the stable culture originated from the same PDX. Specifically, some of the antigens seem to have been almost fully lost in the MP41 cell line (see, e.g., F2 or D3). As reported before (Amirouchene-Angelozzi et al., 2014), this suggests that cells undergo significant modifications when forced to adapt to *in vitro* culture conditions, with consequent rearrangement of surface protein composition. Indirectly, these results also suggest that the selected antibodies recognize different antigens,

conformations, or post-translational modifications. A comparison of the relative antibody binding intensity measured on various cell types confirmed the differential expression of targeted antigens (Figure S2A).

Out of the three groups of VHHs identified by means of this approach (Figure S2A), we initially focused on the VHHs with the strongest binding for all the tested melanoma cell lines (group 1). Eight unique sequences corresponding to such antibodies were subcloned into an expression vector to obtain Fc-VHH fusions. We reported before that these constructs enhance the antigen binding capacity and enable the use of secondary antibodies (Aliprandi et al., 2010; Moutel et al., 2009). Most of them were produced efficiently (several mg/l of culture) in the cytoplasm of *E. coli*-expressing recombinant sulfhydryl oxidase and DsbC isomerase (Djender et al., 2014a; Figure S2B). Such IgG-like bivalent antibodies had an apparent affinity measured by flow cytometry in the nanomolar range for their antigen (Figure S2C) and effectively immunoprecipitated a protein of 130 kDa (Figure S2D). The clone 8H2 recognized its antigen on UM tumors of different genetic background (Figure 2A) and in the spindle phenotype MP38 (data not shown) and therefore was selected as a promising pan-UM binder directed against a cell surface epitope (Figure 2B). Optimized IP (Figure 2C) enabled the recovery of enough protein for mass spectrometry analysis. Twenty-two peptides of the immunoprecipitated protein were identified by mass spectrometry as corresponding to MUC18, a result that gave high confidence on the nature of the

Figure 2. Characterization of the 8H2 clone (anti-MUC18). (A) Specific binding of 8H2 to cells from primary UM tumors characterized by different genetic background (GNAQ/GNA11/BAP1 status). (B) Exclusive 8H2-dependent membrane staining of frozen MP41 uveal melanoma pelleted cells (right). RPE-1 cells were used as a control (left). (C) Immune precipitation output obtained using Fc-8H2 and biotinylated cells. Numbers from 1 to 6 refer to successive IP fractions eluted from beads treated with UM cells (MP41, MUC18 pos) and control cells (RPE-1, MUC18 neg). (D) Binding of 8H2 and monoclonal anti-MUC18 to a large spectrum of UM cells characterized by different genetic background (GNAQ/GNA11/BAP1 status is indicated in the figure; further genomic details of the cells are reported in Amirouchene-Angelozzi et al., 2014 and Laurent et al., 2013).



recognized antigen. The binding specificity of 8H2 for MUC18 was further confirmed by the coincident activity of a commercial anti-MUC18 monoclonal antibody (P1H12) exploited in experiments of flow cytometry using HEK293 cells overexpressing MUC18 and of ELISA using the purified MUC18 ectodomain (Figure S3A,B). Subsequent experiments showed that all the other binders belonging to the same group were also directed against MUC18 (Figure S3A,B). Flow cytometry experiments using primary and metastatic UM cells issued from tumors with different genetic background confirmed the universal expression of MUC18 in UM tumors and the efficacy of the selected 8H2 recombinant antibody (Figure 2A,D). Using P1H12, we evaluated that there are between 1 and 2 millions of MUC18 molecules exposed at the surface of MP41 UM cells.

Next we characterized an antibody (8G5) which represented those particularly active cells recovered from MP41 PDX (Figure S2A, group 2). As above, it was produced as a Fc-VHH and successfully used to immunoprecipitate its antigen (Figure 3A) that was identified as CEACAM1 by mass spectrometry. The apparent affinity of the Fc-8G5 construct for its antigen was measured by flow cytometry (2.5×10^{-9} M, Figure 3B) and by SPR (9.8×10^{-10} M, Figure 3C). The minimal discrepancy measured using the two methods can be attributed to higher antigen density in the SPR experimental condition that would favor the avidity effect of the bivalent molecule. The purified CEACAM1 ectodomain was similarly detected in ELISA by 8G5 and by a commercial anti-CEACAM1 polyclonal antibody (Figure 3D). Accordingly, these antibodies shared the same binding pattern when used to stain a panel of different UM cells (Figure 3E).

The second biopanning strategy (RPE-1 cells used for library depletion and metastatic UM cells for enrichment) resulted in 72 positive clones out of 88 tested,

corresponding to 45 independent clones (Figure 1B). Two metastatic UM cells were used: MM33 for panning and MM66 for screening. The reason for this choice is that their genetic background is very similar but not identical because corresponds to two different patients. This condition allows for the selection of binders recognizing biomarkers conserved among metastatic cells and not individual specific. Interestingly, all the different clones isolated using the first selection approach were directed against MUC18 (data not shown). This may suggest that the expression of MUC18 was even stronger on metastatic than on primary UM tumors. However, because we do not possess the appropriate cellular model to confirm this interpretation, namely PDXs derived from primary and metastatic tumors of the same patient, we could not rule out individual variations.

Looking for additional UM (metastatic) antibody/biomarker pairs, we tuned the biopanning conditions by depleting the library on primary tumor cells (strongly positive for MUC18 expression) before selecting antibodies using metastatic cells of the same genetic signature (Figure 1C). This strategy allowed for the selection of several MUC18-negative clones (Figure S4A). Five novel antibodies were characterized using a panel of UM cell models (Figure S4B). Two antibody groups could be defined based on the observed binding patterns, 14A7/14E7/14G8 and 14D7/14A9. At least 14D7/14A9 seemed to detect specifically an antigen present on metastatic and not on the primary UM tumor cell models (Figure S4B). Mass spectrometry analysis of the proteins immunoprecipitated using 14A9 (Figure S5A) indicated NG2 receptor as the potential antigen detected by the antibody on metastatic UM cells. This is particularly interesting because expression of NG2 has been described as a key element of angiogenesis in melanoma lung metastasis (Guan et al., 2014). However, although

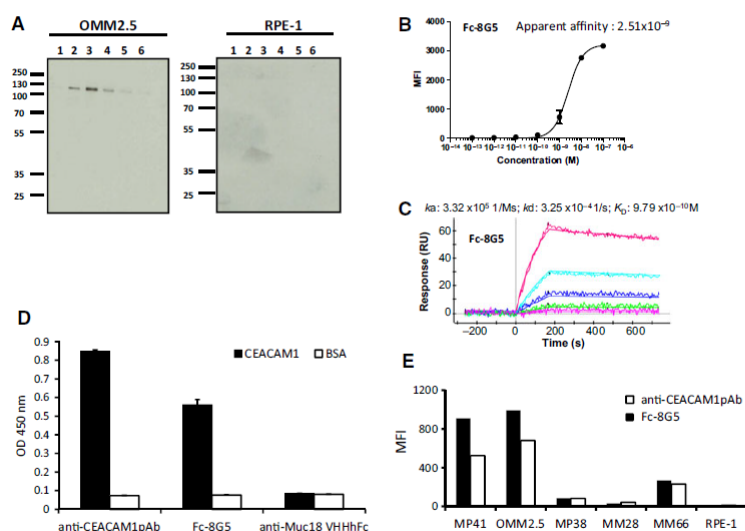


Figure 3. Characterization of the clone 8G5 (anti-CEACAM1). (A) Immune precipitation output obtained using Fc-8G5 and biotinylated UM tumor cells. (B) Apparent affinity of the bivalent Fc-8G5 antibody for UM tumor cells OMM2.5 calculated using the fluorescence signals measured by FACS. (C) Apparent affinity determination of the bivalent Fc-8G5 for purified CEACAM1 ectodomain by SPR. Analyte concentrations varied between 10 and 0.1 nM. (D) Comparative ELISA using CEACAM1 ectodomain and either a commercial polyclonal anti-CEACAM1 antibody or Fc-8G5. (E) Specific binding of different UM and control (RPE-1) cell lines obtained with the polyclonal anti-CEACAM1 and the Fc-8G5.

the binding patterns of 14A9 and of a commercial anti-NG2 toward a set of cells were quite similar (Figure S5B), a formal validation of the antigen has remained elusive so far. It was not possible to identify the antigen recognized by 14A7.

We then evaluated whether the four unique antibodies 8H2, 8G5, 14A7, and 14A9 expressed as Fc-VHH fusions could be used to purify by FACS UM cells obtained from dissociated PDX biopsies. Two recently characterized tumor models (Amirouchene-Angelozi et al., 2014; Laurent et al., 2013) were chosen: the MP41 model used for the selection (SF3B1, EIF1AX, and BAP1 wild type, correlating to low metastasis risk) and the MP46 one (SF3B1 and EIF1AX wild type, BAP1 mutated, correlating to bad prognosis). Ten SCID mice were grafted for each model, the tumors removed when their volume reached 1 cm³, and the tissue was dissociated as described in the methods section. We observed that the anti-MUC18 8H2 was the most efficient to sort MP41 and MP46 PDX-extracted cells. This may be related to the strong expression of MUC18 on the surface of UM cells (Figure 2). 8H2-dependent immune capture allowed recovering a population of cells that displays the whole genetic complexity that was present in the original PDX and was lost when original tumor cells were adapted to monoclonal in vitro culture (Figure 4A).

In both PDX models, only a minimal fraction of the MUC18-negative cells were positive for at least one of the other UM biomarkers identified by the selected antibodies (Figure 4B). In contrast, in the MUC18-positive cells, the genetic heterogeneity of the cells

dissociated from the PDXs was confirmed by the presence of cells with highly diverging co-expression levels relative to the other UM biomarkers (Figure 4B). The double staining results reported in Figure 4B indicate that in the MP41 tumor model, most of the MUC18-positive population (8H2 pos) also expressed CEACAM1 (8G5 pos: 73% of the total), whereas the antigens recognized by the antibodies 14A9 and 14A7 were displayed only in 50% and 9% of the cells, respectively. Differently from the MP41 model, a large fraction of MUC18-positive population (8H2 pos) also expressed the antigen recognized by 14A7 (94% of the total), whereas the antigens recognized by the antibodies 14A9 and 8G5 were displayed in 74% and 32% of the cells, respectively. Altogether, the results indicate that MUC18, as detected by 8H2, is a pan-antigen that can be used to stain various UM populations because it is expressed in almost the totality of the cells dissociated from PDXs. On the other hand, in each PDX is present a rather complex cell population characterized by the expression of very variable proportions of the other biomarkers.

We thus carried out a genomic analysis of the MUC18-sorted subpopulation, and their features were compared to those specific of the total cell population derived from the PDXs (unsorted, dissociated cells) and from the original biopsy. Both genome copy number and allele copy number were analyzed, and the process was extended to all the chromosomes. The result indicates that the genomic characteristics of the three samples were highly similar, as illustrated by the allelic profiles of MP41 and MP46 (Figures 4A and S6) relative to the

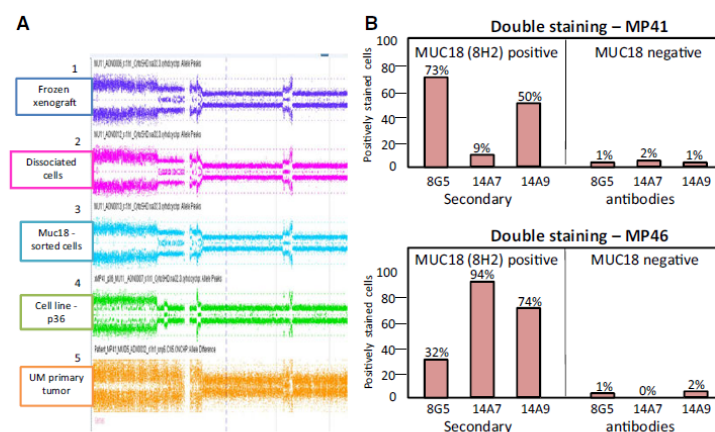


Figure 4. Effective recovery of tumor cells from PDX tissues using 8H2. (A) Genetic variability in tumor cells obtained from PDX and cell lines. Various MP41 models were analyzed on Cytoscan arrays, and allele peaks on chromosome 6 were analyzed. Very similar profiles were obtained when analyzing whole xenograft (1), total cell population obtained from dissociated PDX (2), and MUC18+ cells purified using 8H2 (3). Note that clear differences could be observed when analyzing in vitro culture-adapted MP41 cells (4). The profile of the original tumor (5) is the reference to evaluate the modifications that characterize the corresponding PDX. (B) Flow cytometry characterization of PDX-derived cells stained using combinations of antibodies specific for different cell surface antigens. MUC18+ (8H2 pos) UM cells extracted from MP41 PDX were co-stained for CEACAM1 (8G5 pos, 73% pos), 14A7 (9% pos), and 14A9 (50% pos). When MUC18+ cells extracted from MP46 PDX were co-stained with another antibody, they were highly positive for 14A7 (94%) and 14A9 (74%), but only 32% of the cells expressed also CEACAM (8G5 pos). MUC18-negative cells from both PDX models were mostly negative also for 8G5, 14A7, and 14A9 staining.

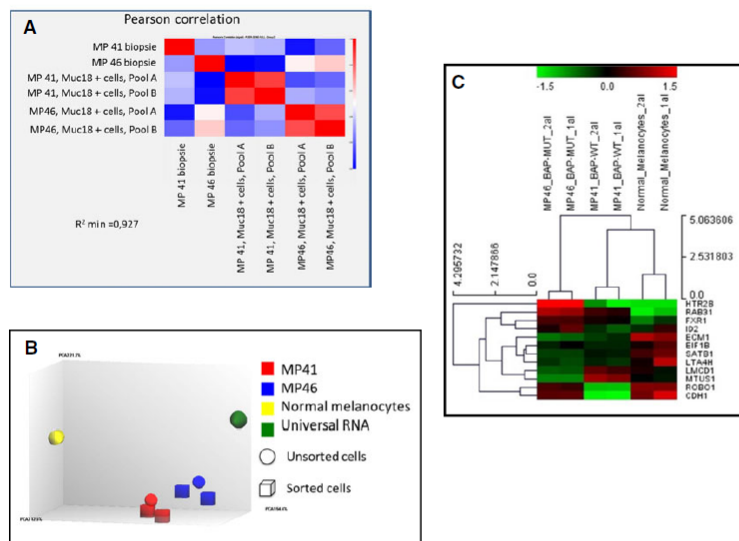


Figure 5. Transcriptomic profiles of MP41 and MP46 models measured by Affymetrix (Waltham, MA, USA) HTA2.0 arrays. (A) Pearson correlation matrix allowed the comparative analysis of gene expression (Blue/lowest correlation: 0.927—Red/highest correlation: 1). (B) Principal component analysis enabled to identify differences and similarities in gene expression of MP41, MP46, and two control samples (normal choroidal melanocytes and Universal Reference RNA). (C) Supervised clustering applied to Onken's Class I/Class II gene list. Replicated BAP1 mutant model MP46 samples were clustered and remained apart from both BAP1 wild-type tumor samples MP41 and normal choroidal melanocytes. [The colour version of this figure is available on Wiley Online Library]

chromosomes 3, 6, and 8 that contain the main abnormalities observed in UM. Transcriptome analysis was also carried out to assess the characteristics of mRNA recovered from MUC18-sorted MP41 and MP46 cells in comparison with normal choroidal melanocytes. The Pearson correlation matrix (Figure 5A) shows the high reproducibility of the transcriptome measurements. The data obtained using fresh tumors and the two MUC18-sorted fractions indicate high correlation. Principal component analysis applied to gene expression data (Figure 5B) highlights that both MP41 and MP46 samples cluster in together in comparison with the controls (normal choroidal melanocytes and Universal Reference RNA). Even if minor differences are observed between samples, MUC18-sorted cells cluster together and their pattern remains very similar to that specific of the original tumors (sorted versus unsorted cells). Finally, the Harbour supervised clustering signature based on the expression of 12 genes that discriminates low metastatic risk samples (Onken's Class 1) from high metastatic risk samples (Onken's Class 2) indicates that the replicates of both MP41 (class 1) and MP46 (class 2) MUC18-sorted cells cluster independently and differently from control choroidal melanocytes (Figure 5C). Altogether, these results clearly indicate that MUC18-sorting is an effective method to purify various type of UM cells that can then be used for robust genomic analyses.

Discussion

In this work, we used a differential selection method carried out on UM cells extracted from PDX to isolate antibodies directed against four cell surface antigens. Because the panning is performed directly on cells, this approach enables to recover antibodies that discriminate between the two cell populations even in the absence of

any preliminary knowledge on the targeted antigens. The totally in vitro selection not only spares animal immunization, but makes also feasible to adapt selection conditions and overcome immune dominance. In such a way, it is possible to isolate antibodies against less accessible or less expressed biomarkers, or biomarkers expressed on a subpopulation of cells, such as those that seem to be preferentially expressed in melanoma metastatic lineages. This was the case of NG2 which is a membrane-bound protein overexpressed on most of skin melanomas and consequently has been tested as a target for antibody-based therapies (Malas et al., 2014). Despite the fact that it is actually not surprising to find it also on the uveal melanomas, ours represents the first report describing the presence of such antigen on UM metastatic cells.

Adopting the whole-cell selection process, the surface antigens are presented in their native conformation and post-translational modification and are embedded in their natural lipid environment. Consequently, the isolated antibodies are particularly usable in approaches in which the antigen conformation is preserved, such as flow cytometry, fluorescence microscopy, and in vivo applications (Djender et al., 2014a,b; Moutel et al., 2016; Zou et al., 2015). As recently underlined (Bradbury and Plückthun, 2015), recombinant monoclonal antibodies described here offer the highest guarantee of product (and, consequently, data) reproducibility, at a rather low cost and therefore will probably represent one of the gold standards for immune-based analyses in the future.

Two of the proteins strongly expressed at the surface of UM cells were identified as MUC18 and CEACAM1. A third one may be the NG2 receptor. Other antigens were likely the target of other VHHs, but their identification has not been yet accomplished. MUC18 and CEACAM1 have been already studied as candidate biomarkers because

their strong expression has been detected in several tumor types (Löffek et al., 2015; Mobley et al., 2012). MUC18 is strongly expressed in primary UM tumor cells, and its expression seems even increased in metastatic UM tumors. These data confirm previous reports that identified MUC18 as a potential marker for UM metastasis (Beutel et al., 2009; Lai et al., 2007; Pardo et al., 2006) and can be effectively used for capturing circulating melanoma tumor cells with CellSearch technology (Bande et al., 2015). Otherwise, MUC18 has been described as a pro-angiogenic factor, as a metastatic marker in several kinds of tumors, and as a potential target for melanoma metastasis treatment, also performed using anti-MUC18 antibodies (Gould Rothberg et al., 2009; Oka et al., 2012; Orentas et al., 2012; Stalin et al., 2013; Staquicini et al., 2008; Wu et al., 2012; Xie et al., 1997; Yan et al., 2003; Zeng et al., 2011; Zigler et al., 2011). Our results confirm that the advantage of using MUC18 is related to its very high expression level ($> 10^6$ proteins/cell) which enables efficient capture/labeling for cell sorting and immune-based purification.

The other two antigens identified here were also reported before to be associated with tumor development. CEACAM1 was shown to promote cell proliferation in melanoma and was proposed as a diagnostic and therapeutic biomarker for malignant melanoma (Löffek et al., 2015; Ortenberg et al., 2014; Sapoznik et al., 2012) and as an antigen preferentially expressed in some subsets of uveal melanoma cells (Khatib et al., 2011). NG2 has been proposed as a target for nanoparticle and BiTE therapies in metastatic melanoma (Blumel et al., 2010; Guan et al., 2014).

The main limitation of these (and most of the other) biomarkers is that although expressed at relative high density on the surface of tumor cells, they are not exclusively expressed on these cells (for an exhaustive description of expression patterns in different tissue see Protein Atlas—<http://www.proteinatlas.org>) and, therefore, their use in diagnostics and therapy might be hindered by off-target activity. Nevertheless, the specific combination of their co-expression in tumor cells would represent an extremely more selective factor for discriminating between tumors and healthy tissues.

The VHH format is very suitable for engineering. Bispecific constructs that target two co-expressed antigens such as CEACAM1 and NG2 may be generated and could increase the specificity for metastatic cells. On the other hand, the immune capture results reported here underline the extreme heterogeneity of the UM tumors in terms of antigen display at the cell surface. This observation stresses the necessity of using pan-tumor antibodies to ensure efficient targeting of the whole population of tumor cells for in vivo applications and to purify and characterize tumor cells as reported here. Given the high efficiency of the anti-MUC18 antibody for cell capture, 8H2 should be considered for the diagnostic of the metastatic

melanoma tumor cells, better if coupled to another antibody specific for a different UM biomarker.

In addition to these clinical applications, the selected VHHs represent unique tools to understand more in detail the biology of UM. As shown in this study, the very effective immune purification and the cell subpopulation stratification allowed carrying out extensive genomic analyses that confirmed and widened the available data (Furney et al., 2013; Onken et al., 2004). In particular, our study highlighted the differences that exist between the restricted diversity of UM models and the variability inside the same tumor. The polyclonality of solid tumors has been well established, but most of the in vitro studies are still performed using cell lines. Our data clearly show that the heterogeneity of the original PDX is dramatically lost in the derived cell lines. Consequently, only part of the actual tumor response may be studied using these models. Nanobodies can be fused to several different tags (de Marco, 2012) and this condition expands the possibility of multilabeling and contemporary evaluation of several biomarkers. Consequently, tumor cell subpopulations can be identified and recovered independently. Such possibility to identify the intratumor heterogeneity and to sort subpopulations by means of a set of specific monoclonal recombinant antibodies opens unprecedented opportunities for testing drug effectiveness (Schoumacher et al., 2016) and resistances on diverse ‘tumor clones’, for instance those with different expression patterns of CEACAM1 (Khatib et al., 2011) and NG2 (this work). Furthermore, engineered VHHs are particularly suitable for in vivo diagnostics and drug delivery (de Marco, 2013; Zou et al., 2015).

In conclusion, we show here that in vitro selection of antibodies from a naïve nanobody library using a differential selection approach allows for the recovery of binders that are instrumental to identify novel tumor antigens, to advance in the understanding of tumor diversity, and to propose improved diagnostic and therapeutic approaches based on immune biosensors and immune nanoparticles. Finally, it must be reminded that nanobodies can be produced in significantly shorter time and at a cost that is just a fraction of that typical of hybridoma-derived monoclonal antibodies. This condition makes conceivable large-scale screening programs and the development of diagnostics tools that would be not affordable with conventional antibodies.

Methods

Cell culture

UM cells (MP41, MM33, MM66, OMM2.5, MM28, MP38, MP65, and MP46) and lung cancer cells NCIH1299 were grown in RPMI-Glutamax (Gibco, Waltham, MA, USA) containing 20% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) complemented with penicillin/streptomycin (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and insulin (Invitrogen) for NCIH1299. Mammalian adherent cells (RPE-1, HEK, mel-STV, SK-mel-28, C8161, SKBR-3) were grown in DMEM-Glutamax (Gibco) containing 10% FBS, complemented with penicillin/streptomycin (Invitrogen). Human

Nanobodies for studying uveal melanoma biomarkers

bronchial epithelial cells (HBEC) were grown in BEGM™ BulletKit™ (Lonza, Basel, Switzerland). All cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere enriched in 5% CO₂. The genomic characteristics of the UM material used in the panning/screening steps are the following. MP41 has a mixed phenotype (spindle and epithelioid), a mutation in GNA11, a loss of chr3, and a gain of 8q; MP46 has a mixed phenotype, a mutation in GNAQ, a loss of chr3, and a gain of 8q, and does not express BAP1; MM33 has a spindle phenotype, a mutation in GNAQ and in EIF1AX, and a gain of chr8; MM66 has a mixed phenotype, is GNA11 mutated, and has a gain of chr8. The GNAQ/GNA11 status of any batch of sorted cells was tested and confirmed. The features of the further UM cell lines used for characterization have been described in details elsewhere (Amirouchene-Angelozzi et al., 2014; Laurent et al., 2013).

Selection of tumor-specific VHHs on PDX cells

Primary (MP derived from human primary ocular tumor) and metastatic (MM derived from human liver metastasis) UM tumor models MP41 and MM33 were grafted subcutaneously into the interscapular fat pad of female NOD SCID mice (Charles River) under anesthesia. Patients signed an inform consent and authorization for the use of their tumor material for research. Experimental protocol and animal housing were performed according to institutional and French Ethics Committee guidelines (Agreement B75-05-18, France). PDXs of 0.6–1 mm³ developed 2 months after grafting (Némati et al., 2010). At a volume of ~1 cm³, mice were sacrificed and tumors were removed and subsequently dissociated to purify viable tumor cells as described previously (Petit et al., 2013). Murine stromal and immune cells were sorted out of the whole population after staining cells with a rat anti-mouse Pan H-2 (CMH-I) monoclonal antibody coupled to PE (BioLegend, San Diego, CA, USA), and a rat anti-mouse CD45 monoclonal antibody Pe-Texas red (Life Technologies, Waltham, MA, USA) at the Curie Flow Cytometry platform.

Three successive phage display panning were realized on freshly purified UM tumor cells using a synthetic, humanized single-domain antibody phage library (NaLi-H1; Moutel et al., 2016) with a diversity of 3.10⁹. Briefly, 3.10¹¹ phages were prepared from the library, saturated in PBS, 2% BSA, and incubated with 5.10⁶ control cells (retinal pigment epithelium, RPE-1, or primary tumor, MP41, cells, according to the panning protocol, as described in the legend of Figure 1) 1 h at 4°C under gentle agitation in a total volume of 1 ml of PBS, 2% BSA. Cells were centrifuged at 400×g for 5 min, and the unbound phages were incubated again in the presence of 5.10⁶ control cells as previously described. After centrifugation, the unbound phages were collected and centrifuged again at 1000×g for 10 min to spin down aggregates before incubating 1 h the supernatant with 5.10⁶ of either primary or metastatic tumor cells at 4°C under gentle agitation in a total volume of 1 ml of PBS, 2% BSA. Cells were washed 10 times with 10 ml of PBS; phages eluted with triethylamine 100 mM and neutralized with a solution of 1 M Tris-HCl, pH 7.4. Selected phages were amplified for another panning round by infection of *E. coli* TG1. Three rounds of selections were performed.

Positive binder screening

Single colonies of selected VHHs were used to infect growth medium in 96-well plates. Antibody expression was induced overnight in the presence of 1 mM IPTG. Two hundred thousand RPE-1 or tumor cells were resuspended with Stempro Accutase (Invitrogen) in 100 µl of PBS, 1% FBS at 4°C (fluorescence-activated cell (FACS) buffer). One hundred µl of crude culture supernatant was added to the cells for 2 h at 4°C. Cells were washed with FACS buffer, and bound VHHs were detected with an anti-c-myc antibody (9E10, Sigma, Saint Louis, MO, USA) followed by goat anti-mouse immunoglobulin conjugated to phycoerythrin (PE, BD). Cells were analyzed with FACSCalibur Flow Cytometer (BD) using CellQuest Pro

Software for mean fluorescence intensity (MFI) calculation. The diversity of FACS positive clones was evaluated after sequencing with the primer M13 rev: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG -3'.

Antibody subcloning and production

VHH cDNA was digested *NcoI/NotI* and subcloned into either pET14b-rFc and pET14b-hFc-multitag to express fusion proteins composed of VHH plus Fc fragments of rabbit and human immunoglobulin, respectively (Djender et al., 2014a), or in the cytoplasmic pET14Ctag to obtain VHH fusions with C-tag (Djender et al., 2014b). Recombinant antibodies were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) strain co-transformed with a plasmid for the expression of sulfhydryl oxidase and DsbC (Djender et al., 2014a). Briefly, 2 ml of over-night preculture was used to inoculate 500 ml of LB broth in the presence of the appropriate antibiotics. Bacteria were grown at 37°C until OD_{600nm} reached 0.4. Sulfhydryl oxidase and DsbC expression were induced by adding 0.5% (g/ml culture) of arabinose, and the temperature was lowered to 30°C. After 45 min, 0.05 mM of IPTG was added to induce antibody expression, the bacteria were grown overnight at 20°C, harvested, and frozen. Pellets were resuspended in 20 ml of 100 mM Tris pH8, 500 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂. Lysozyme (0.5 mg/ml) and DNase (3U) were added, and the lysate was kept 30 min at room temperature. Samples were sonicated and finally centrifuged at 18 000×g for 20 min at 4°C. Lysates were filtered and applied on either a HiTrap TALON® 5 ml column or on a HiTrap MabSelect SuRe 5 ml column in combination with a chromatographic AKTA pure system (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Analytical (Sala and de Marco, 2010) and preparative size exclusion chromatographic steps were performed on Superdex™ 75 5/150 and 10/300 GL, respectively (GE Healthcare), to evaluate the antibody monodispersity, and their concentration was measured by UV absorbance at 280 nm.

Biotinylation of plasma membrane proteins and antigen immunoprecipitation

For immunoprecipitation (IP), cells were grown to 90% confluence in 150 mm² culture dishes, washed twice with PBS, and resuspended with Stempro Accutase. Cells were washed three times with cold PBS before incubation with 2 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) in PBS (pH 8.0) at 25 × 10⁶ cells/ml for 15 min at 4°C under gentle agitation to biotinylate plasma membrane proteins. The reaction was stopped by three washing steps in 100 mM PBS/glycine at 4°C. Cells were permeabilized 10 min at 4°C with a permeabilization solution (BD) and washed twice with PBS according manufacturer recommendations to remove cytosolic proteins. Lysis was induced by resuspending the cell pellet in the presence of IP buffer [50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 10% glycerol, and protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland)]. After 1-h incubation at 4°C under gentle agitation, cell debris was separated from soluble lysate by centrifugation at 4°C (10 min at 13 000×g). Protein concentration in cleared lysates was determined by BCA assay (Pierce, Rockford, IL, USA). One hundred µg of Fc-VHH antibodies was incubated in the presence of 100 µl of protein G agarose beads (Thermo Fisher) for 1 h at 4°C under gentle agitation and successively washed three times with IP buffer at 4°C to eliminate unspecific binding. Fc-VHHs bound to protein G agarose beads were then incubated 2 h at 4°C in the presence of 500 µg of biotinylated cell lysates. Agarose beads were loaded on an empty column (Bio-Rad) before being washed five times at 4°C with 10 ml of IP buffer. Antigen–antibody complex was eluted with 0.1 M glycine, pH 3, in 6 fractions neutralized with 1 M Tris-HCl, pH7.4. Thirty µl of the eluted fractions was combined with 10 µl of SDS loading buffer and heated 5 min at 100°C. The protein samples were fractionated on two parallel 12% denaturing

acrylamide gels; one was used for protein transfer to nitrocellulose membranes, saturated 1 h with PBS, 10% milk, and finally incubated 30 min with Streptavidin-HRP (Pierce). Immunoprecipitated proteins were identified by chemiluminescence (GE Healthcare). The corresponding bands were excised from the second gel and the proteins identified by mass spectrometry (Institut Curie Platform).

Antibody specificity characterization

Antigen- to antibody-specific recognition was tested by flow cytometry using 2.10^5 RPE-1 and cancer cells resuspended with Stempro Accutase in 100 μ l of FACS buffer. All incubations were performed at 4°C. Antibody binding to cells was assessed in 96-well plates in the presence of 0.1 μ g/ml of Fc-VHH followed by goat anti-rabbit or anti-human IgG conjugated to Alexa Fluor 647 (Invitrogen), depending on the origin of the Fc moiety. Flow cytometry was used for Fc-VHH titration experiments performed to evaluate the apparent affinity directly on cells. Values were fitted with GraphPad software. Mouse monoclonal antibodies P1H12 (Abcam, Cambridge, UK) and LHM2 (Abcam) were used as positive controls for MUC18 and NG2, respectively, in combination with anti-mouse immunoglobulins conjugated to PE. CEACAM1 was detected with the commercial rabbit polyclonal antibody ab129385 (Abcam) combined with goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 647. MUC18 overexpression in HEK cells was obtained by transfecting the plasmid pCMV6-XL4-MCAM (Origene, Rockville, MD, USA) with JetPEI (Polyplus, Illkirch, France) and collecting the cells after two culture days. Transfection efficiency was monitored by flow cytometry (FACSCalibur BD) after incubating cells with antibody P1H12 and recombinant Fc-VHH as previously described. Evaluation of the MUC18 number at the cell surface was carried out by flow cytometry with Quantum™ Simply Cellular® anti-mouse IgG kit (Bangs Laboratories, Inc, Fishers, IN, USA) and P1H12 antibody in combination with anti-mouse immunoglobulins conjugated to PE according manufacturer recommendation.

Western blot analysis

HEK cells overexpressing MUC18 were resuspended with accutase and washed with cold PBS before the addition of lysis buffer: 10 mM Tris-HCl (pH7.4), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic). Lysates were incubated for 20 min on ice and cleared by centrifugation at $14\,000\times g$ for 10 min at 4°C. Protein content in the supernatant was quantified by means of the BCA assay (Interchim, Montluçon, France). Cell extract samples or recombinant MUC18 were resolved by 8% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). After saturation in PBS, 10% milk, the membrane was incubated 1 h with P1H12 at 5 μ g/ml and the presence of MUC18 was revealed with HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulins (Pierce) combined to enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

ELISA

Fifty μ l of 5 μ g/ml recombinant MUC18 and CEACAM1 (Abcam) or the same volume of 2% BSA (negative control) was used to coat overnight a maxisorp 96-well plate (Nunc) at 4°C. The wells were saturated with PBS, 2% BSA for 2 h at room temperature (RT) before adding recombinant Fc-VHH, P1H12, or anti-CEACAM1 polyclonal antibody diluted in PBS, 1% BSA. After 1-h incubation at RT, the plates were washed 3 times with PBS, 0.05% Tween-20 and three times with PBS before adding goat anti-rabbit, anti-human, or anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Pierce), respectively. The plates were incubated 30 min, washed as previously described, the antibody- to antigen-specific binding was visualized by

the addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and quantified by measuring the OD at 450 nm.

Surface plasmon resonance (SPR) analysis

Fc-8G5 apparent affinity was measured at 25°C using a ProteOn XPR36 (Bio-Rad). CEACAM1 his tagged (Abcam) was diluted to 40 μ g/ml in sodium acetate buffer (pH 5.5) and immobilized by amine-coupling on a GLC chip (BioRad, Hercules, CA, USA) at 3000 RU. Four hundred μ l of various concentrations of bivalent antibodies was injected as the analyte at 100 μ l/min. The complete kinetic data set was collected in a single run, and data were fitted with a bivalent analyte interaction model. Surface regeneration was performed using 10 mM glycine HCl, pH 2.

Sorter-assisted immune purification and genomic analyses

Fresh uveal melanoma tumors were transplanted into fad pad of 10 non-pre-irradiated immune-deficient female SCID mice as previously described by Némati et al. (2010). When their volume reached 1 cm³, tumors were removed and were immediately processed to obtain cells dissociation, immunolabeling, and sorting according to the modified protocol published by Petit et al. (2013) because cells in uveal melanoma tumors have weaker interactions than in breast tumors. The tumors were cut into thin fragments using scalpels before being incubated in 10 ml of the non-enzymatic dissociation buffer (NEDB, Life Sciences). Dissociation was performed for 30 min at 37°C under constant shaking. Samples were mixed by pipetting every 5 min. The fragments were successively filtered through two nylon meshes (100 and 40 μ m, respectively, BD). The released cells were recovered by centrifugation ($279\times g$ for 2 min) and stored at 4°C in cold CO₂-independent medium (Life Sciences) supplemented with 30% FCS. Fresh NEDB was added to the uncompleted digested tissue debris recovered from the nylon filters to promote the complete cell dissociation. Cells were finally collected as above and pooled together in a total volume of 15 ml of Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS medium, Life Sciences) + 30% FCS, layered onto a double Ficoll gradient (10 ml of 1.077 LD buffer onto 5 ml of 1.119 HD buffer; Histopaque, Sigma-Aldrich), and spun at $700\times g$ for 30 min at room temperature. Cells were recovered from both interfaces, pooled, and washed twice in CO₂-independent medium.

Cells were counted using a Cellometer Auto T4 device (Nexcelom, Ozyme, France), adjusted to a concentration of 2000 cells/ml using PBS+1% FCS, and incubated 45 min at 4°C with Fc-VHH antibodies used at a final concentration of 0.1 μ g/ μ l. After two washing steps in PBS+1% FCS, the Fc-VHH antibodies were revealed during a 15-min incubation at 4°C using an Alexa Fluor® 647 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (Life Technologies, A-21245) and CEACAM1, 14A7 and 14A9 antibodies were revealed with an Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Human IgG (H+L) secondary antibody (A-11013, Life Technologies) diluted 1:400. Dual staining (MUC18/CEACAM1, MUC18/14A7, and MUC18/14A9) was performed to establish the percentage of CEACAM1-, 14A7-, and 14A9-positive cells in MUC18-positive cells. Anti-MUC18 fused to human Fc and anti-CEACAM1, anti-14A7, and anti-14A9 fused to rabbit Fc were prepared as above to a final concentration of 0.1 μ g/ μ l and incubated 45 min at 4°C. Two washes were applied using PBS+ 1% FCS. Cell volume was adjusted to 1 ml using PBS+ 1% FCS. Secondary antibodies were diluted 1:400 and incubated 15 min at 4°C to detect simultaneously both human and rabbit Fc domains. Flow cytometry analysis was performed after two washing steps and sorted using BD FACSAria II and III in combination with the BD FACSDiva software. MUC18-positive fractions were collected in PBS before further analysis. A minimum of one million of MUC18-positive cells was used for DNA and RNA extraction.

Genomic analysis

Genomic DNA was extracted and purified using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). The integrity of DNA was controlled on agarose gel, and its purification quality was assessed using a Nanodrop spectrophotometer. Only DNA showing a sharp 12 kb band and a 260/280 ratio >1.7 was further processed.

The genomic (copy number, gains, loss, and loss of heterozygosity) profiling of uveal melanoma tumors was performed using the Affymetrix Cytoscan HD assay according to the supplier recommendations (Affymetrix Reagent Kit Bundle, ref. 901835). Briefly, 250 ng of genomic DNA was digested with *Nspl*. Adaptor-primers were ligated to the *Nspl* fragments before starting a PCR amplification step performed to reduce the genome complexity and obtain enough material to detect 750 000 SNPs and 1.9 million CNVs on the Cytoscan array. High-fidelity polymerase (Titanium Taq DNA polymerase; Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) was used for the PCR amplification, and the products were controlled on agarose gels before being pooled, purified, quantified, fragmented with a DNase, and processed with biotin end-labeled nucleotides to being hybridized onto Cytoscan HD arrays using Affymetrix equipment. Raw data (CEL files) were generated using Affymetrix Genechip Command Console (AGCC). Data analysis was performed using Chromosome Analysis Suite software (Affymetrix).

Transcriptomic analysis

Total RNA was extracted and purified using the miRNEasy kit from Qiagen. Sample concentration and purity were measured using a Nanodrop spectrophotometer (260/280 ratio >1.6), and the integrity of RNA was evaluated according to the Agilent RNA 6000 LabChip electrophoresis test (integrity median value: 8.9).

The transcriptome was analyzed using 100 ng of total RNA for each Affymetrix HTA 2.0 microarray, as previously described (Furney et al., 2013). Excel files were generated using the Affymetrix Expression console software. Data were normalized using the iterPlier algorithm (Affymetrix); data were compared by means of a Pearson's correlation map and the principal component analysis.

Acknowledgements

The authors thank Florian Dingli for his assistance at the mass spectrometer, Didier Meseure and André Nicolas for the histopathological analysis, Christell Dolliger of the flow cytometry core facility at IUH Institut Paris, for her help to setup cell sorting, Emilie Henry for technical assistance in the genomic analysis, Pierre de la Grange from Genosplise for transcriptomic classification, and Nathalie Cassoux for her comments. The authors acknowledge the CNRS, Inserm, Institut Curie, COPIO/ITMO-TS/Aviesan, Région île de France, and Labex DCBIOL (ANR-11-LABEX-0043—grant ANR-10-IDEX-0001-02PSL) for funding support.

References

Aliprandi, M., Sparacio, E., Pivetta, F. et al. (2010). The availability of a recombinant anti-SNAP antibody in VHH format amplifies the application flexibility of SNAP-tagged proteins. *J. Biomed. Biotechnol.* ID 658954.

Amirouchene-Angelozzi, N., Nemat, F., Gentien, D. et al. (2014). Establishment of novel cell lines recapitulating the genetic landscape of uveal melanoma and preclinical validation of mTOR as a therapeutic target. *Mol. Oncol.* 8, 1508–1520.

Angi, M., Kalirai, H., Prendergast, S. et al. (2016). In-depth proteomic profiling of the uveal melanoma secretome. *Oncotarget* 7, 49623–49635.

Bande, M.F., Santiago, M., Muinelo-Romay, L. et al. (2015). Detection of circulating melanoma cells in choroidal melanocytic lesions. *BMC Res. Notes* 8, 452.

Beutel, J., Wegner, J., Wegner, R. et al. (2009). Possible implications of MCAM expression in metastasis and non-metastatic of primary uveal melanoma patients. *Curr. Eye Res.* 34, 1004–1009.

Blumel, C., Hausmann, S., Fluhr, P. et al. (2010). Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1197–1209.

Bradbury, A., and Plückthun, A. (2015). Reproducibility: standardize antibodies used in research. *Nature* 518, 27–29.

Damato, B., Duke, C., Coupland, S.E. et al. (2007). Cytogenetics of uveal melanoma: a 7-year clinical experience. *Ophthalmology* 114, 1925–1931.

Djender, S., Schneider, A., Beugnet, A. et al. (2014a). Bacterial cytoplasm as an effective cell compartment for producing functional VHH-based affinity reagents and *Camelidae* IgG-like recombinant antibodies. *Microb. Cell Fact.* 13, 140.

Djender, S., Beugnet, A., Schneider, A., and de Marco, A. (2014b). The biotechnological applications of recombinant single-domain antibodies are optimized by the C-terminal fusion to the EPEA sequence (C tag). *Antibodies* 3, 182–191.

Frenkel, S., Zlot, O., Pe'er, J., and Barak, V. (2013). Insulin-like growth factor-1 as a predictive biomarker for metastatic uveal melanoma in humans. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 490–493.

Furney, S.J., Pedersen, M., Gentien, D. et al. (2013). F3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov.* 3, 1122–1129.

Gould Rothberg, B.E., Bracken, M.B., and Rimm, D.L. (2009). Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J. Natl Cancer Inst.* 101, 452–474.

Guan, Y.Y., Luan, X., Xu, J.R. et al. (2014). Selective eradication of tumor vascular pericytes by peptide-conjugated nanoparticles for antiangiogenic therapy of melanoma lung metastasis. *Biomaterials* 35, 3060–3070.

Harbour, J.W., Onken, M.D., Roberson, E.D. et al. (2010). Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 330, 1410–1413.

Khatib, N., Pe'er, J., Ortenberg, R. et al. (2011). Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) in posterior uveal melanoma: correlation with clinical and histological survival markers. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 9368–9372.

Lai, K., Sharma, V., Jager, M.J., Conway, R.M., and Madigan, M.C. (2007). Expression and distribution of MUC18 in human uveal melanoma. *Virchows Arch.* 451, 967–976.

Laurent, C., Gentien, D., Piperno-Neumann, S. et al. (2013). Patient-derived xenografts recapitulate molecular features of human uveal melanomas. *Mol. Oncol.* 7, 625–636.

Linge, A., Kennedy, S., O'Flynn, D. et al. (2012). Differential expression of fourteen proteins between uveal melanoma from patients who subsequently developed distant metastases versus those who did not. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 4634–4643.

Löffek, S., Ullrich, N., Görgens, A. et al. (2015). CEACAM1-4L promotes anchorage-independent growth in melanoma. *Front Oncol.* 5, 234.

Luke, J.J., Triozzi, P.L., McKenna, K.C. et al. (2014). Biology of advanced uveal melanoma and next steps for clinical therapeutics. *Pigment Cell Melanoma Res.* 28, 135–147.

Malas, S., Harrasser, M., Lacy, K.E., and Karagiannis, S.N. (2014). Antibody therapies for melanoma: new and emerging opportunities to activate immunity. *Oncol. Rep.* 32, 875–886.

- de Marco, A. (2012). User-friendly expression plasmids enable the fusion of VHHs to application-specific tags. *Meth. Mol. Biol.* **911**, 507–522.
- de Marco, A. (2013). Perspective offered by single-domain antibodies in clinical diagnostic of pediatric tumors. *Curr. Med. Chem.* **20**, 2188–2194.
- Mobley, A.K., Braeuer, R.R., Kamiya, T., Shoshan, E., and Bar-Eli, M. (2012). Driving transcriptional regulators in melanoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 621–632.
- Moutel, S., El Marjou, A., Vielemeyer, O. et al. (2009). A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. *BMC Biotechnol.* **9**, 14.
- Moutel, S., Bery, N., Bernard, V. et al. (2016). NaLi-H1: a universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *eLife* **5**, e16228. doi: 10.7554/eLife.16228.
- Murali, R., Wilmott, J.S., Jakrot, V. et al. (2013). BAP1 expression in cutaneous melanoma: a pilot study. *Pathology* **45**, 116–126.
- Némati, F., Sastre-Garau, X., Laurent, C. et al. (2010). Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2352–2362.
- Oka, S., Uramoto, H., Chikaishi, Y., and Tanaka, F. (2012). The expression of CD146 predicts a poor overall survival in patients with adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res.* **32**, 861–864.
- Onken, M.D., Worley, L.A., Ehlers, J.P., and Harbour, J.W. (2004). Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res.* **64**, 7205–7209.
- Orentas, R.J., Yang, J.J., Wen, X. et al. (2012). Identification of cell surface proteins as potential immunotherapy targets in 12 pediatric cancers. *Front Oncol.* **2**, 194.
- Ortenberg, R., Galore-Haskel, G., Greenberg, I. et al. (2014). CEACAM1 promotes melanoma cell growth through Sox-2. *Neoplasia* **16**, 451–460.
- Pardo, M., García, A., Thomas, B. et al. (2006). The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells shows the presence of MUC18 and HMG-1 metastasis markers and leads to the identification of DJ-1 as a potential serum biomarker. *Int. J. Cancer* **119**, 1014–1022.
- Petit, V., Massonnet, G., Maciorowski, Z. et al. (2013). Optimization of tumor xenograft dissociation for the profiling of cell surface markers and nutrient transporters. *Lab Invest.* **93**, 611–621.
- Prescher, G., Bornfeld, N., Hirche, H., Horsthemke, B., Jöckel, K.H., and Becher, R. (1996). Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* **347**, 1222–1225.
- Sala, E., and de Marco, A. (2010). Screening optimized protein purification protocols by coupling small-scale expression and mini-size exclusion chromatography. *Prot. Expr. Purif.* **74**, 231–235.
- Sapoznik, S., Ortenberg, R., Schachter, J., and Markel, G. (2012). CEACAM1 in malignant melanoma: a diagnostic and therapeutic target. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 3–10.
- Schoumacher, M., Le Corre, S., Houy, A. et al. (2016). Uveal melanoma cells are resistant to EZH2 inhibition regardless of BAP1 status. *Nat. Med.* **22**, 577–578.
- Singh, A.D., Turell, M.E., and Topham, A.K. (2011). Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* **118**, 1881–1885.
- Stalin, J., Harhour, K., Hubert, L. et al. (2013). Soluble melanoma cell adhesion molecule (sMCAM/sCD146) promotes angiogenic effects on endothelial progenitor cells through angiomin. *J. Biol. Chem.* **288**, 8991–9000.
- Staquicini, F.I., Tandle, A., Libutti, S.K. et al. (2008). A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans. *Cancer Res.* **68**, 8419–8428.
- Torres, V., Triozzi, P., Eng, C. et al. (2011). Circulating tumor cells in uveal melanoma. *Fut. Oncol.* **7**, 101–109.
- Triozzi, P.L., Elson, P., Aldrich, W. et al. (2013). Elevated blood β -2 microglobulin is associated with tumor monosomy-3 in patients with primary uveal melanoma. *Melanoma Res.* **23**, 1–7.
- Tura, A., Lücke, J., Merz, H. et al. (2014). Identification of circulating melanoma cells in uveal melanoma patients by dual-marker immuno-enrichment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 4395–4404.
- Tura, A., Merz, H., Reinsberg, M. et al. (2016). Analysis of monosomy-3 in immunomagnetically isolated circulating melanoma cells in uveal melanoma patients. *Pigment Cell Melanoma Res.* **29**, 583–589.
- Velho, T.R., Kapiteijn, E., and Jager, M.J. (2012). New therapeutic agents in uveal melanoma. *Anticancer Res.* **32**, 2591–2598.
- Wu, Z., Wu, Z., Li, J. et al. (2012). MCAM is a novel metastasis marker and regulates spreading, apoptosis and invasion of ovarian cancer cells. *Tumour Biol.* **33**, 1619–1628.
- Xie, S., Luca, M., Huang, S. et al. (1997). Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **57**, 2295–2303.
- Yan, X., Lin, Y., Yang, D. et al. (2003). A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. *Blood* **102**, 184–191.
- Zeng, G.F., Cai, S.X., and Wu, G.J. (2011). Up-regulation of METCAM/MUC18 promotes motility, invasion, and tumorigenesis of human breast cancer cells. *BMC Cancer* **11**, 113.
- Zigler, M., Villares, G.J., Dobroff, A.S. et al. (2011). Expression of Id-1 is regulated by MCAM/MUC18: a missing link in melanoma progression. *Cancer Res.* **71**, 3494–3504.
- Zou, T., Dembele, F., Beugnet, A. et al. (2015). Nanobody-functionalized PEG-b-PCL polymersomes and their targeting study. *J. Biotechnol.* **214**, 147–155.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Flow diagram of the experimental setting.

Figure S2. Specificities of the antibodies isolated during the first biopanning.

Figure S3. Validation of MUC18 as the antigen recognized by most of the antibodies isolated during the first biopanning.

Figure S4. Binding specificity characterization of antibodies selective for 'metastatic biomarkers'.

Figure S5. Characterization of the clone 14A9.

Figure S6. Genomic profiles of MP41 and MP46 uveal melanoma models measured by Affymetrix Cytoscan arrays.

B. ISOLEMENT ET PREPARATION DE CELLULES POUR L'ANALYSE MOLECULAIRE

Comme expliqué auparavant, nous avons choisi d'étudier des cellules tumorales issues de xénogreffes d'UM (PDX UM) pour pouvoir recueillir un grand nombre de cellules vivantes et pouvoir mener sur un même ensemble de cellules les analyses envisagées (analyses de la conformation de la chromatine, analyse des marques chromatinienne, analyse de méthylation, et analyse génomique et transcriptomique).

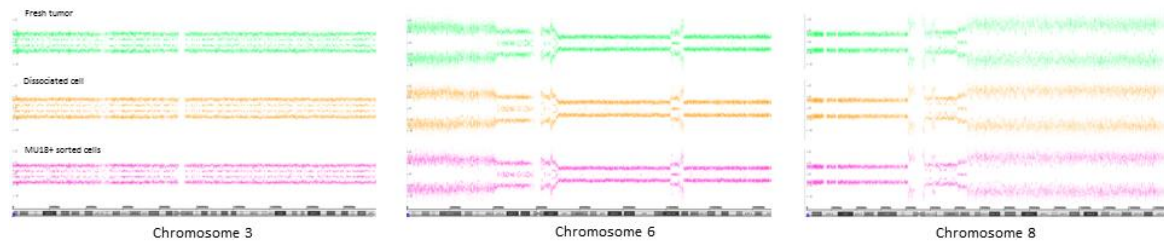
Les modèles sélectionnés, MP41 et MP46, partagent une mutation dans GNAQ/11 (MP41 : GNA11, c.626 A>T, p.Gln209Leu et MP46 : GNAQ, c.626A>T, p.Gln209Leu) et un gain du 8q. BAP1 est exprimé dans le modèle MP41 (localisation nucléaire de la protéine), alors que déficient dans le modèle MP46 (perte d'expression nucléaire de la protéine BAP1) (Amirouchene-Angelozzi et al. 2014). Pour chaque modèle, 15 à 20 souris ont été greffées, et lorsque les tumeurs ont atteint les tailles éthiques, les biopsies ont été traitées selon l'approche décrite précédemment (Petit et al. 2013). Le développement des tumeurs après xénogreffes a pris plusieurs mois pour obtenir suffisamment de matériel issu des modèles MP41 et MP46. Chaque fraction de cellules tumorales issues de PDX sélectionnées sur la présence de 8H, 14A7 et 14A9 ont dans un premier temps été vérifiées au niveau génomique et transcriptomique, avant de réaliser des pools de cellules (Crépin et al. 2017). Une comparaison des altérations génomiques présentes sur les différentes fractions préparées (avant dissociation de la biopsie issue de la souris ayant été greffées, après dissociation et avant tri puis après tri au FACS) ainsi que sur les diverses préparations de cellules triées a été menée sur puce Cytoscan HD comme présenté sur la figure ci-après (Figure 41) (Crépin et al. 2017; Le Tourneau et al. 2012)

Lors de la préparation des fractions cellulaires, l'objectif a été de réserver au minimum $1-5.10^5$ cellules pour les contrôles, et fixer 5.10^5 et 5.10^6 cellules dans les conditions définies pour les analyses de conformation de la chromatine (Hi-C) et localisation de marques activatrices ou répressives de la transcription (ChIP-seq contre H2Aub, H3K4me3 ; H3K27me3, H3K27Ac). Pour réaliser ces études, 15 souris ont été greffées par modèle d'intérêt, à l'issue desquelles 12 séries de dissociations et tris par cytométrie ont été réalisées. La quantité de cellules obtenues après tri est variable entre les deux modèles : 2-34 millions pour MP41 ; 3-21 millions pour MP46. Au total, pour MP41 177 millions de cellules ont été obtenues dont 164 millions de cellules ont été fixées pour réaliser les analyses HI-C et ChIPseq. Pour MP46, 106 millions de cellules ont été isolées dont 96 millions de cellules ont été fixées.

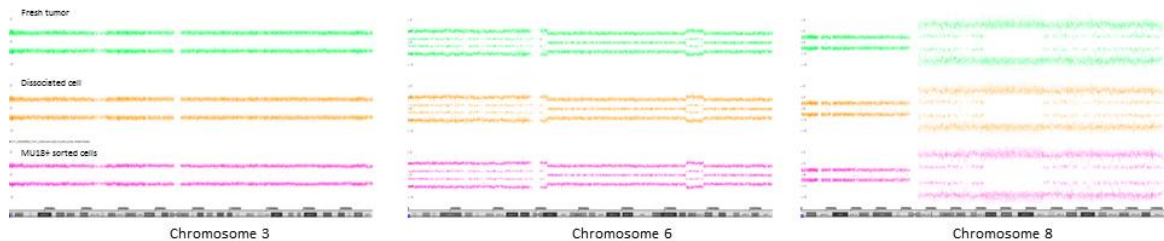
Figure 41: Profils génomiques des modèles MP41 et MP46 établis par puces Affymetrix Cytoscan HD.

Extrait de Crépin R, Gentien, D et al. 2017 (supplementary figure 6).

A: uveal Melanoma Primary tumor xenograft: MP41model



B: uveal Melanoma Primary tumor xenograft: MP46 model



Pour le modèle A) MP41 et B) MP46 (panel B), les différences alléliques des ADN extrait des biopsies avant dissociation (*fresh tumor*, en vert), des ADN extraits des cellules dissociées non triées (orange), et après tri (rose) montrent des altérations du chr 3, 6 et 8, conservées durant le protocole de préparation des échantillons.

Afin de comparer les modèles tumoraux à des mélanocytes normaux de la choroïde, 5 cultures primaires de mélanocytes normaux ont pu être obtenues grâce au laboratoire du Pr Simon Saule et sa collaboratrice la Dr Géraldine Liot. Ces cellules normales ont été isolées à partir d'énucléation post mortem (de personnes décédées après un accident de la route) ou à partir de tissu non tumoral adjacent (énucléation des suites d'un UM). Ces cellules ont pu être maintenues en culture à l'aide d'un milieu HAM/F12 (supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal, 100 U/ml pénicilline, 100 U/ml streptomycine, 2mM L-glutamine, 2.5µg/mL Amphotéricine B) complété extemporanément de 0.1mM IBMX, 10ng/ml de toxine de choléra, et 10ng/ml de βFGF puis filtré sur un filtre 0.22µm. Les cellules ont été maintenues en culture dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂, à 37°C, avec un changement de milieu deux fois par semaine. Les cultures primaires de cellules normales ont été contrôlées pour l'expression de marqueurs mélanocytaires (GP100/HMB45), l'absence d'expression de cytokératines 8/18, et pour l'absence de mutations dans les gènes clés tels que *GNAQ*, *GNA11*, *BAP1*, *SF3B1*, *EIF1AX*. Les cellules ont été ensuite préparées pour la plupart des analyses génomiques, épigénétiques et transcriptomiques.

C. ANALYSE GENOMIQUE

Plusieurs fractions cellulaires correspondant aux modèles d'UM BAP1 wt et BAP1 muté (MP41 et MP46) ont été regroupées afin de disposer de réplicats biologiques et réaliser des réplicats des analyses de conformation de la chromatine, et topologie de l'ADN, de méthylation de l'ADN et de localisation de marques d'histones d'activation ChIPSeq.

Une analyse génomique par séquençage massif à large échelle a été menée pour les modèles MP41 et MP46 à partir des cellules tumorales isolées de PDX. Une analyse similaire de l'ADN constitutionnel isolé de tissu normal adjacent à la zone tumorale de la lésion primaire a été réalisée de façon à mener une analyse appariée et filtrer les variants génétiques somatiques et éliminer les variants génétiques présents dans l'ADN constitutionnel. Les résultats sont présentés dans l'article ci-après (David Gentien et al. 2022). Brièvement, le taux de mutations ponctuelles somatiques par Mb (SNV) identifié dans MP41 et MP46 est respectivement de 0.42 SNV/Mb et 0.37SNV/Mb correspondant aux faibles valeurs identifiées dans l'UM (Robertson, Shih, et al. 2017). La classification des variants a été réalisée avec l'aide de Cancer Genome Interpreter et Varsome (Tamborero et al. 2018; Kopanos et al. 2019). Les mutations connues comme driver oncogénique identifiées par cette analyse sont *GNA11* (p.Gln209Leu) et *GNAQ* (p.Gln209Leu), retrouvés mutés respectivement dans MP41 et MP46 comme identifiés comme les tumeurs primaires (Némati et al. 2010; Amirouchene-Angelozzi et al. 2014). Des mutations passagères ayant un impact élevé à modéré sur la séquence des acides aminés, ou sur la séquence d'ARN non-codant ont été listées parmi lesquelles *KMT2C* identifiée dans MP41 (codon stop prématuré) et faiblement représentée (20% des reads portent la mutation c.2961C>G).

L'analyse des données de séquençage a également permis de cartographier les anomalies du nombre de copies, de retrouver les altérations sur le chromosome 3, 6 et 8 par exemple, et de classer MP41 et MP46 d'après la signature TCGA respectivement dans le groupe 2 et 4. Le groupe 2 est enrichi en tumeurs mutées dans *SF3B1* mais il a été montré par la Dr Samar Alsafadi, que MP41 ne présente pas de signature transcriptionnelle associée aux mutations *SF3B1* (Alsafadi et al. 2016). En revanche, l'association de MP46 au groupe 4 (enrichi en tumeurs BAP1 déficientes) est attendue compte tenu de l'absence d'expression de BAP1 dans ce modèle (Amirouchene-Angelozzi et al. 2014).

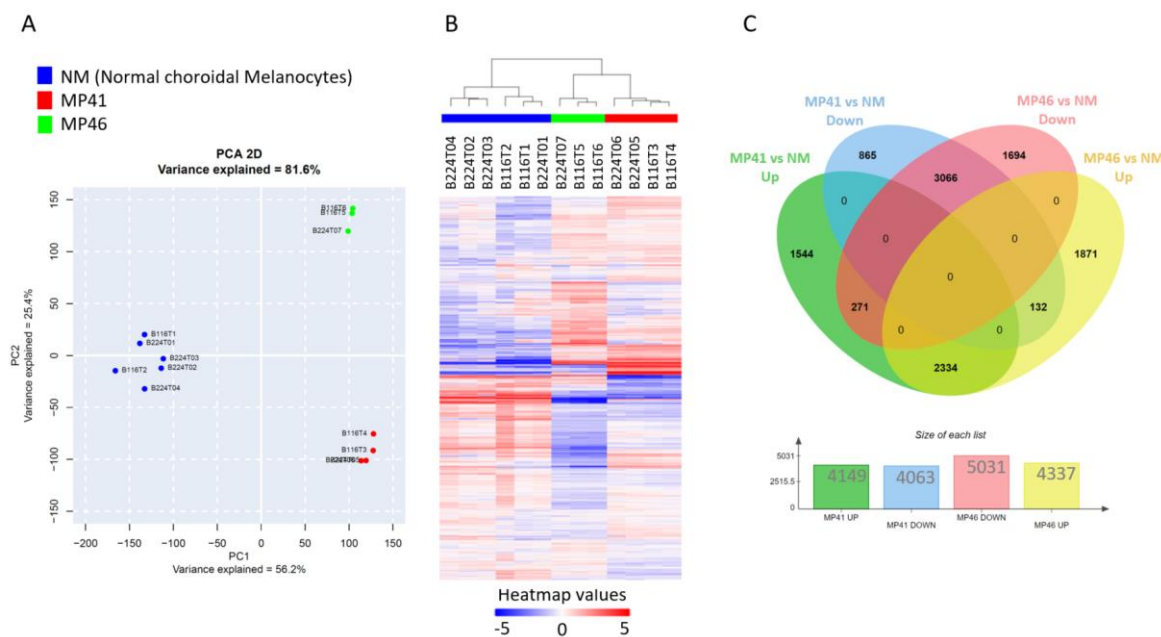
D. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE

1. Identification de gènes dérégulés impliqués dans les voies Gαq, ou dans les voies de réparation de dommages de l'ADN.

L'analyse transcriptomique a été conduite dans un premier temps en comparant chaque modèle de mélanome uvéal avec des mélanocytes normaux de la choroïde ($FC > 2$; $p\text{-value} < 0.05$), et ce à l'aide de Dr Pierre de la Grange de la société Genosplice. Une première analyse qualitative non supervisée menée sur l'ensemble des gènes exprimés, via une analyse en composante principale (ACP) a montré que les différents réplicats étaient bien reproductibles et les transcriptomes étaient bien distincts selon le type d'échantillons (Figure 42 A et B).

Figure 42: Analyse des transcriptomes de MP41, MP46 et NM par RNAseq.

Extrait de Gentien et al, 2022.



Analyse globale de l'expression des gènes par RNAseq. A) Analyse en composantes principales (ACP) des données de RNASeq de 6 échantillons de mélanocytes choroïdiens normaux (bleu), de 4 préparations de cellules UM MP41 (rouge) et de 3 préparations de cellules UM MP46 (vert). B) Clustering hiérarchique des gènes exprimés. C) Analyse de l'expression différentielle de MP41 vs NM et MP46 vs NM : $\text{Log}_2 FC > 1,5$ et $p\text{-value} < 0,05$.

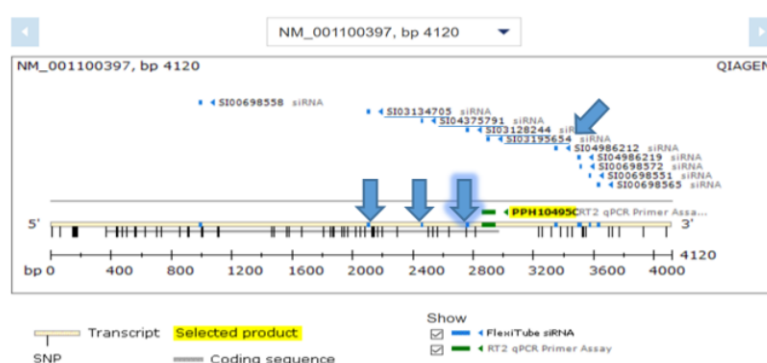
L'analyse des gènes dérégulés entre MP41 vs NM et entre MP46 vs NM a mis en évidence respectivement 8212 et 9368 gènes dérégulés (4063 sous-exprimés et 4149 surexprimés entre MP41 et NM ; 5031 sous-exprimés et 4337 surexprimés entre MP46 et NM). L'intersection des gènes dérégulés a mis en évidence 2334 gènes surexprimés et 3066 gènes sous-exprimés en commun dans les modèles MP41 et MP46 (Figure 42 C).

Dans la liste des gènes surexprimés, figurent *RASGRP3*, *PLCB4* récemment décrits comme dérégulés dans les UM, acteurs majeurs de la voie de signalisation $G\alpha/q$ (Chen et al. 2017; Moore et al. 2018) ainsi que *PRAME* (Wadelin et al. 2010). Il est intéressant de noter que dans la liste des 50 gènes les plus surexprimés, 2 gènes connus de l'oncogenèse des UM tels que *PLCB4* et *RASGRP3* soient présents, sachant que des mutations de *PLCB4*, mutuellement exclusives de *GNAQ/GNA11/CYSLTR2* aient été rapportées dans l'UM, et que les mutations de *PLCB4* participent à l'activation de la voie des PKC (P. Johansson et al. 2015). La présence de la surexpression de *PLCB4* et *RASGRP3* laisse penser que ces surexpressions contribuent à une suractivation de la voie $G\alpha q$.

Le travail de Moore (Moore et al. 2018), a montré dans des modèles murins inductibles que parmi l'activation des mutations *GNAQ*, *BAP1*, ou *BRAF*, la mutation *GNAQ* entraînait l'apparition des mélanomes dans les organes contenant des mélanocytes de façon bien plus efficace que les mutations *BAP1* ou *BRAF*. L'équipe, grâce aux données du TCGA a publié une liste de 339 gènes corrélés et dérégulés dans les modèles *GNAQ* mutés. Cette liste des 339 gènes surexprimés a été croisée à la liste des gènes surexprimés résultant de la comparaison des UM mutés *GNAQ* et *GNA11* vs les mélanocytes normaux. Cette analyse met en évidence 29 gènes surexprimés en commun dont *RASGRP3*, *RAPGEF4*, *MET*, *RAB38*, *BRCA1*, *MITF*, *TYRP1*, *CITED1*, dont les variations d'expression les plus importantes concernent *RASGRP3* et *RAPGEF4* (respectivement avec des « *fold change* » moyens de 17455 et 1091 et des p-values de 4.59×10^{-80} et 2.85×10^{-48} dans nos comparaisons UM vs NM). *RASGRP3* a été décrit comme participant à l'activation de voie RAS/ERK suite à l'activation oncogénique *GNAQ/GNA11* (Chen et al. 2017; Moore et al. 2018). Nous avons identifié comme dérégulé un autre gène de la voie des GPCR, *RAPGEF4* connu pour activer p38. De façon à tester le rôle potentiel de *RAPGEF4* dans l'UM, j'ai évalué l'inhibition de *RAPGEF4* par une approche pharmacologique avec un inhibiteur spécifique ESI-05 (Rehmann 2013; K. M. Choi et al. 2021; N. Kumar et al. 2018) et par une approche d'extinction génique par siRNA sur MP41. L'IC50 mesuré avec l'inhibiteur ESI-05 après 48h de traitements sur 5 réplicats de MP41 est de 79.3 μ M en valeur médiane et correspond aux IC50 décrites pour l'inhibiteur ESI-05. Bien que l'inhibiteur ESI-05 ait été montré comme le plus spécifique d'EPAC2/RAPGEF4, l'inhibition de croissance

mesurée sur MP41 a également été observée sur des cellules contrôles comme RPE1, n'exprimant pas RAPGEF4. Ces analyses non publiées, n'ont pas été poursuivies. Une extinction transitoire visant à bloquer l'ARNm de RAPGEF4 a été testée avec 4 siRNA différents : siRNA 5, 6, 7 et 8 (GeneGlobe, Qiagen), dont les séquences ciblées sont présentées en Figure 43. Le siRNA #5 est en commun avec les travaux de Van Kolen de 2010 (Van Kolen et al. 2010). L'extinction par siRNA a été réalisée en parallèle de siRNA contrôles soit ne ciblant aucun transcrit humain (contrôle négatif) soit ciblant PLK1 soit MAPK1 (contrôles positifs) (Maire et al. 2013; Montaudon et al. 2020). Bien que l'extinction de *RAPGEF4* ait permis une diminution de 50% au niveau protéique (anticorps anti Epac2, clone sc-28326, Santa Cruz), aucune baisse significative n'a été observée sur p38/MAPK14 ni sur phospho p38/MAPK14 comme espéré. Aucun effet n'a d'ailleurs été observé sur p44/42 MAPK (Erk2) ni sur phospho-p44/42 MAPK (Erk2) d'après les quantifications relatives réalisées en western blot suivant une normalisation sur GAPDH par exemple.

Figure 43: Schéma de ciblage de RAPGEF4 par siRNA.



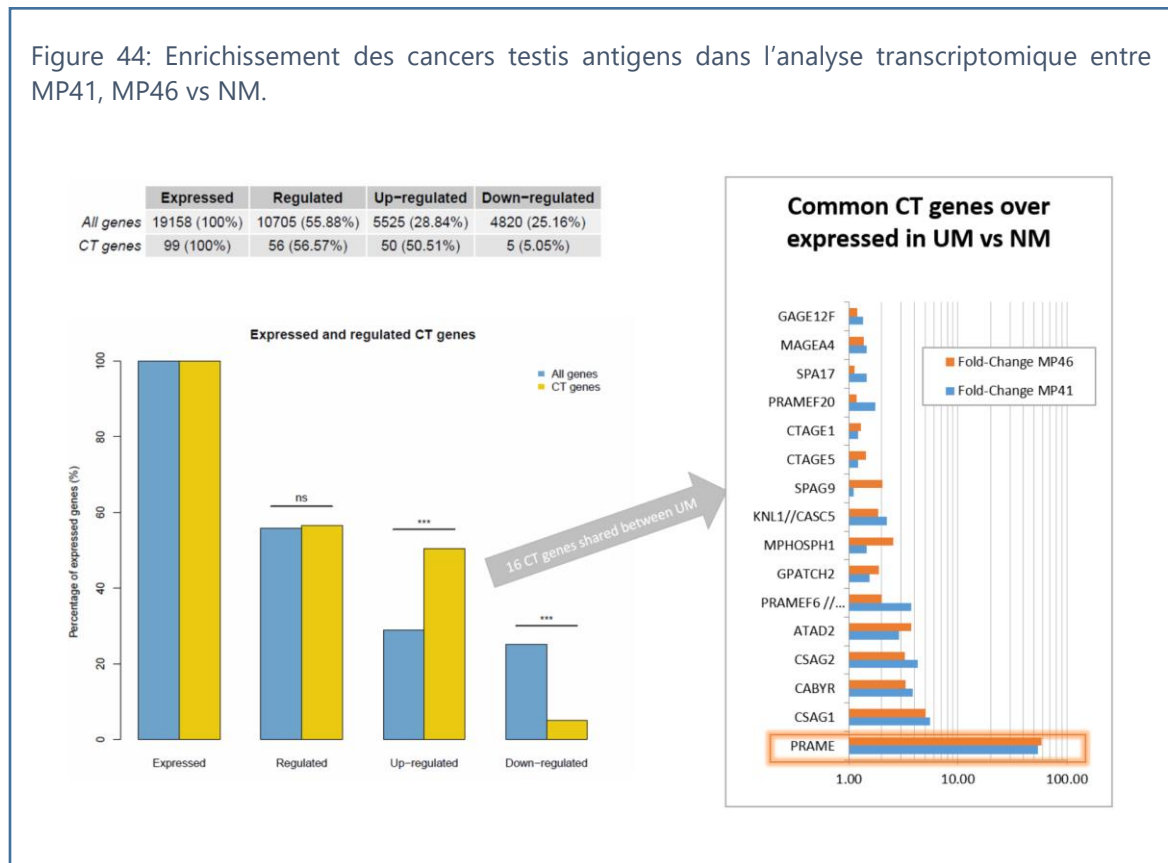
siRNA	id	Sequence targeted
siRNA Hs_RAPGEF4_5	SI03128244	CTCCTTCATATTAAGCCTTA*
siRNA Hs_RAPGEF4_6	SI03134705	AAGGTGGTGCTCAACCTAAT
siRNA Hs_RAPGEF4_7	SI03195654	CGGAGTTATGTACGGCAATTA
siRNA Hs_RAPGEF4_8	SI04375791	AGCAAGCGTGTTCAGCTATTA

* From Van Kolen K et al. Neuropharmacology. 2010

Appartenant à la famille des Cancer/Testis (C/T) antigens, *PRAME* a été décrit exprimé dans l'UM (Field, Decatur, et al. 2016; Field, Durante, et al. 2016; Gezgin et al. 2017; Schefler et al. 2019). *PRAME* a également été décrit comme facteur de transcription, et associé aux régions transcriptionnellement actives et dans la régulation du cycle

cellulaire (Costessi et al. 2011). Parmi les gènes surexprimés, 411 contiennent dans leur promoteur une séquence capable de fixer le facteur de transcription Prame (-400bp +100bp du TSS). Notre analyse transcriptomique montre un enrichissement significatif en C/T antigens observé dans les modèles tumoraux (16 C/T Antigens surexprimés, Figure 44), potentiellement utile pour des pistes d'immunothérapies du type CAR T-cells, bispecific T engagers (Tian et al. 2021) ou vaccination.

Figure 44: Enrichissement des cancers testis antigens dans l'analyse transcriptomique entre MP41, MP46 vs NM.



La liste des gènes sous exprimés dans les UM, contient quant à elle 3066 gènes dont 71 gènes ayant été associés à des fonctions de gènes suppresseurs de tumeurs. Cependant la liste des gènes sous exprimés partagés entre MP41 et MP46 vs NM, est moins consistante, peu de gènes sont présents dans le top 50 des gènes les plus sous exprimés.

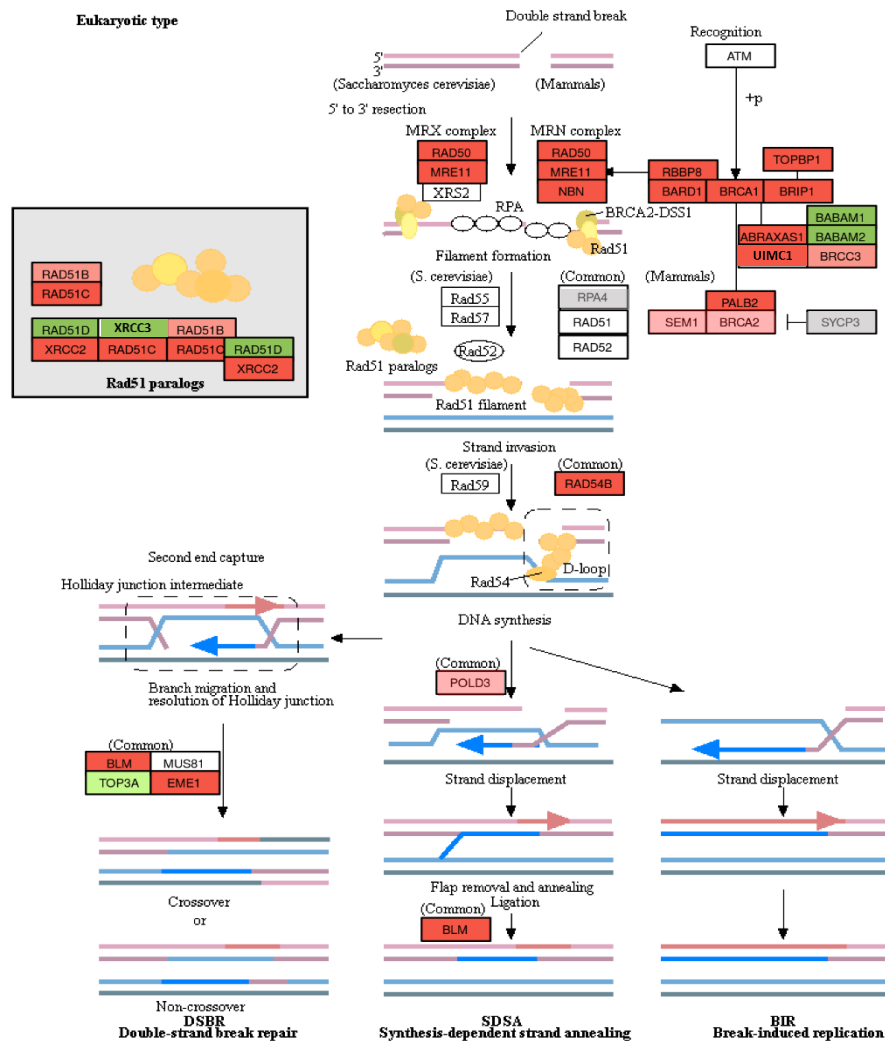
L'analyse de la localisation des gènes dérégulés, a montré que 101 cytobands étaient enrichies significativement, et en particulier 18% des gènes régulés sont localisés sur le chromosome 8. Les gènes surexprimés sont enrichis à la fois sur des régions dont le nombre de copies est supérieur à 2 : 8q, 1a, 21q, mais également sur des régions dont le nombre de copies est normal (5q, 4q). Un enrichissement des gènes sous exprimés

a été identifié sur des régions en perte telles que 1p, 3p, 8p et 16q et partagées entre MP41 et MP46 mais également sur des régions gagnées dans l'un des modèles comme le 12q (MP41) et le 17q (MP46).

L'analyse des gènes dérégulés en commun entre MP41 et MP46 vs NM a été traitée avec des outils tels que Reactome et Kegg (Gillespie et al. 2022; Kanehisa et Goto 2000) afin d'identifier les voies de signalisation et les fonctions cellulaires principalement dérégulées. Dans le top 50 des voies les plus dérégulées partagées entre MP41 et MP46 vs NM, plusieurs voies en lien avec la prolifération cellulaire, le DNA repair et la maintenance de la chromatine ont été identifiées. Les voies du DNA repair contiennent plusieurs « *sensors* » significativement surexprimés comme *MRE11*, *RAD50*, et *NBN/NBS1*, *BARD1*, *BRCA1/2*, *BRIP1*, *PALB2*, *SEM1*, *BRCC3*, *USP3*, *RAD54B* ainsi que des paralogues de *RAD51* Figure 45).

Figure 45: Dérégulation de la voie de la recombinaison homologue entre MP41 et MP46 vs NM.

Extrait de Gentien et al, 2022.



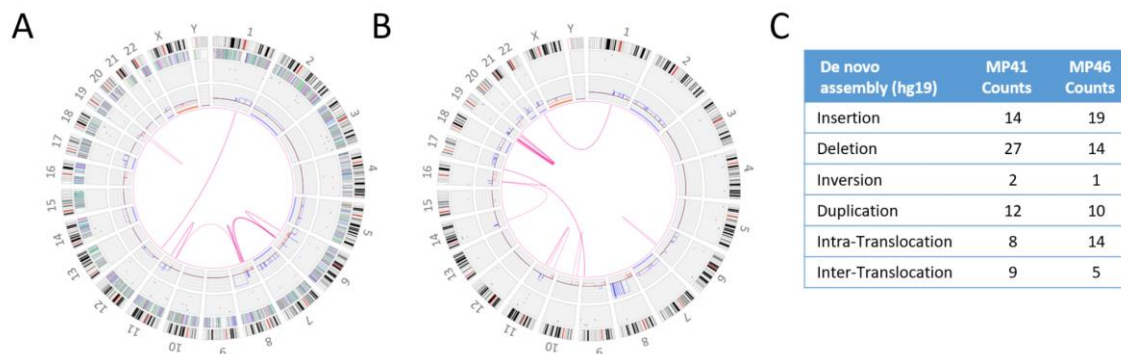
A partir des gènes régulés et partagés entre MP41 et MP46 vs NM, la voie de la recombinaison homologue, identifiée par l'analyse Reactome, est mise en évidence par la carte Kegg. Les noms des gènes sont colorés en fonction de leur régulation : les gènes non régulés sont dans des cases blanches, les gènes sur exprimés sont dans des cases rouges et les gènes sous-exprimés dans des cases vertes. Les couleurs claires indiquent une régulation significative dans MP41 vs NM ou dans MP46 vs NM, et les couleurs foncées indiquent une régulation significative observée dans les deux comparaisons. La voie de la recombinaison homologue (HR) (HSA03440, Kegg) présente 21 gènes régulés sur 41 (17 régulés à la hausse et 4 régulés à la baisse) avec une valeur significative (valeur p minimale : $5,99 \times 10^{-9}$).

2. Caractérisations d'altérations génomiques et transcriptomiques nouvelles.

Dans ce contexte d'activation de gènes liés à la réparation des dommages de l'ADN une cartographie optique de l'ADN (Lam et al. 2012; Chan et al. 2018) complétée par une approche de FISH pour le marquage des télomères, centromères puis l'analyse multi-spectrale (M'kacher et al. 2020) ont été réalisées pour analyser les altérations structurales du génome de MP41 et MP46. Du fait des limitations technologiques de l'analyse par FISH et de la quantité relativement importante d'ADN nécessaire pour la cartographie optique Bionano, nous avons profité de l'avantage des lignées cellulaires dérivées des modèles MP41 et MP46 pour réaliser ces analyses. L'analyse par cartographie optique Bionano a mis en évidence un nombre important d'altérations de grandes tailles telles que des translocations, insertions, duplications et des petites délétions (Figure 46). Des translocations inter et intra-chromosomiques ont été identifiées dans MP41 : t(19;19) t(1;12) or t(6;8), comme dans MP46 : t(19;19) et t(1;22).

Figure 46: Principales altérations structurales identifiées par cartographie optique dans les modèles MP41 et MP46.

Extrait de Gentien et al, 2022.



Cartographie optique de l'ADN de MP41 et MP46. Le circos plot resume les altérations génomiques dans A) MP41 et B) MP46. Du centre à la périphérie du circos : la vue du génome entier résume les translocations intra et inter chromosomiques (lignes roses), les gains et pertes de nombre de copies répertoriés sur la première couche interne du circos, et les SV (insertion, délétion, inversion et duplication) sont marqués par des points colorés dans la couche intermédiaire du circos. La densité des gènes, les cytobandes et les chromosomes composent les couches externes du circos. C) Le nombre d'insertions, de délétions, d'inversions et de duplications et les translocations inter et inter sont détaillés pour les MP41 et MP46 définis par la cartographie optique Bionano et le pipeline d'assemblage De novo (v1.5).

L'analyse TC+M-FISH réalisée avec l'aide de Cell Environment (Dr Radhia M'kacher, et Dr Eric Jeandidier) a permis de caractériser la ploïdie des modèles (genome hyper triploïde pour MP41 et hyper diploïde pour MP46) et d'identifier des aberrations chromosomiques donnant lieu à de nombreux chromosomes dicentriques et dérivatifs, associés à des altérations télomériques (Table 2: Altérations identifiées par M-FISH Table 2 et Figure 47). La présence de chromosomes dicentriques suggère des associations chromosomiques (chromosome end-to-end fusion) en lien avec les télomères du fait de l'observation de télomères interstitiels.

Table 2: Altérations identifiées par M-FISH.

Variant structural	MP41	MP46
Translocations	t(1;12), t(6;8), t(19;19)	t(1;22), t(19;19)
Chromosomes dicentriques	dic(14 ;16), i(8q), dic(1;11;8)	dic(1;17), dic(6;10), dic(8;21), dic(13;22), dic(16;20); dic(20;22)
Chromosomes dicentriques avec des pertes télomériques	dic(1;11;6;8), dic(1;11), dic(6;8;14), dic(6;8;17),	
Chromosome avec des séquences télomériques interstitielles	dic(6;8;17)	der(15)t(11;15)
Détection de chromosomes en anneau	r(1;11;6;8)	r(9;21)

Pour compléter l'analyse transcriptomique, au regard des altérations réarrangements structuraux observés pouvant conduire à des gènes de fusions, une analyse de transcrits de fusion a été engagée avec l'aide de la société Genosplice. En comparaison avec les mélanocytes normaux, une recherche de transcrits a été réalisée de façon à identifier ceux présents dans au moins 2 réplicats par modèle et identifiés par au moins 2 algorithmes de détection de transcrits de fusion sur 5 appliqués (deFuse, SOAPfuse, JAFFA, FusionCatcher, TopHat-Fusion). La plupart des transcrits de fusion ont été validés par PCR à partir des ARN extraits de cellules isolées des PDX MP41 et MP46 (Table 3). Les amplicons ont été séquencés par la méthode Sanger, permettant de préciser la jonction des séquences au niveau ARN.

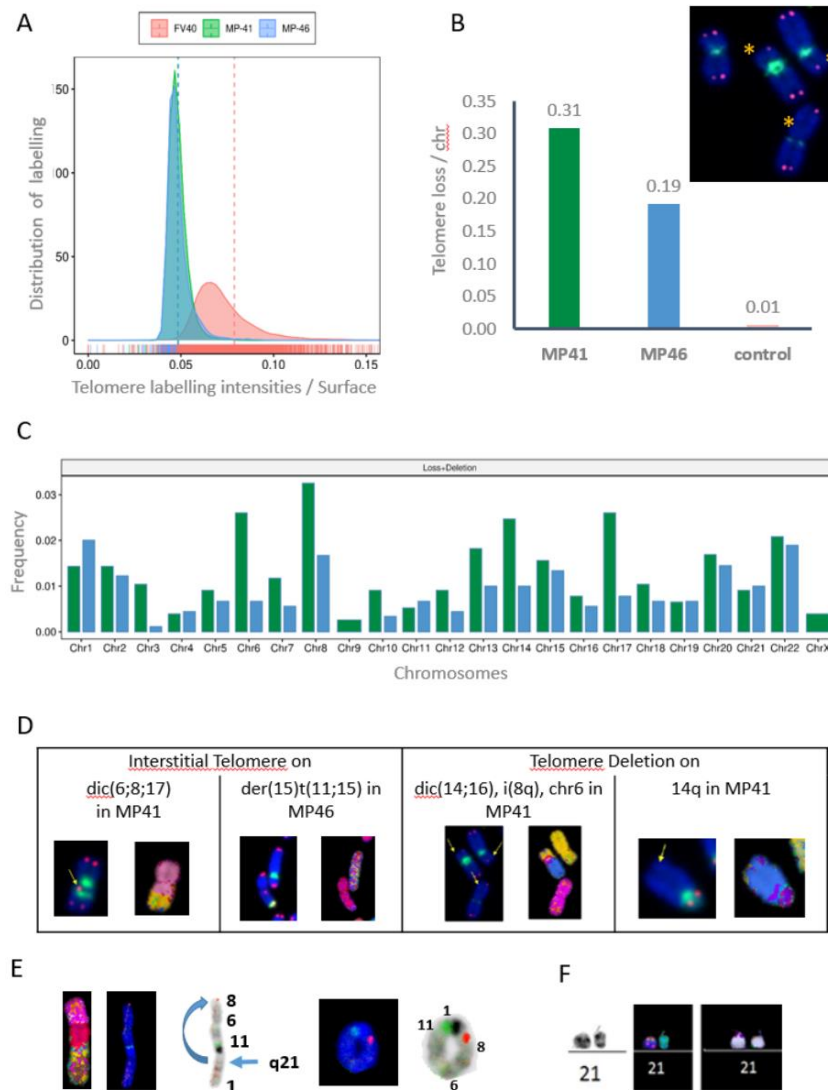
Table 3: Transcrits de fusion identifiés par RNAseq.

Modèle	Fusion Gene1- Gene2	Cyto-bande 1	Cyto-bande 2	Incidence (nb occurrence / nb de replicat)	Read Throught RNA ?	Nb d'outils de détection de fusion	Fusion connue ?	Protéine de fusion prédite ?	Confirmée par PCR + Seq. Sanger ?
MP41	RSPO3-POMK	6q22.33	8p11.21	4/4	Non	5	Non	Oui	Oui
	NCOA7-GPAT4	6q22.32	8p11.21	4/4	Non	2	Non	Non	Oui
	MAPKAPK5 - ACAD10	12q24.12 / 12q24.13	12q24.12	4/4	Non	4	Oui	Oui	Oui
	MYO10-CDH18	5p15.1	5p14.3	3/4	Non	3	Non	Non	Oui
	RYR1-SBNO2	19q13.2	19p13.3	3/4	Non	4	Non	Non	Oui
MP46	MRPS21 - CABIN1	1q21.2	22q11.23	3/3	Non	5	Non	Oui	Oui
	ODF2 - TBC1D13	9q34.11	9q34.11	3/3	Non	5	Non	Oui	Oui
	LINC00482 - NPLOC4	17q25.3	17q25.3	3/3	Non	5	Non	NO	Oui
	KDM2B - RHOF	12q24.31	12q24.31	3/3	Non	3	Non	Oui	Oui
	SLC13A3 - TP53RK	20q13.12	20q13.12	3/3	Oui/Non ?	2	Oui	Non	Oui
	USP49 - MED20	6p21.1	6p21.1	3/3	Oui	2	Oui	Oui	Oui
	MIR7703 - FUS	14q12	16p11.2	3/3	Non	2	Non	Non	Non

Ces expériences ont permis de confirmer que la plupart des transcrits de fusion étaient associés à des réarrangements structuraux identifiés par cartographie optique. Par exemple, l'ARN de fusion MAPKAPK5-ACAD10 spécifique de MP41, ainsi que l'ARN de fusion KDM2B-RHOF spécifique de MP46 correspondent à des insertions-duplications en 12q24 (Figure 48), survenant sur un site fragile de réplication l'ADN (FRA12E, (N. Kumar et al. 2018)).

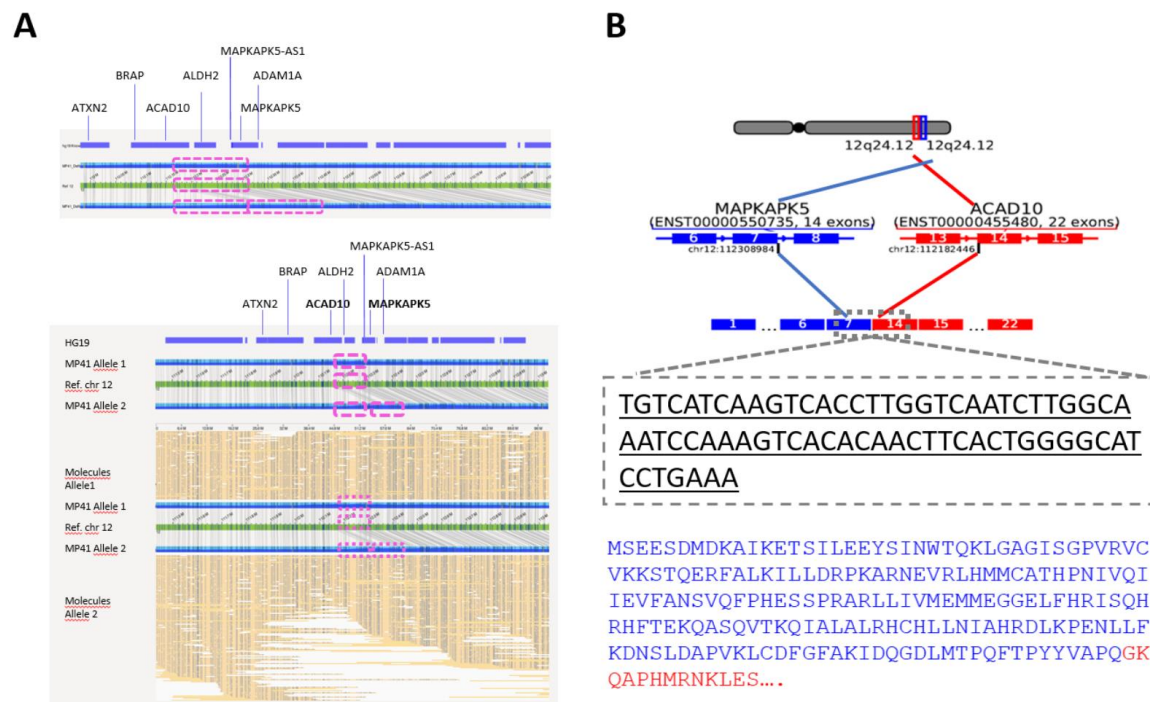
Figure 47: Evaluation de l'instabilité télomérique dans les modèles MP41 et MP46.

Extrait de Gentien et al, 2022.



L'analyse des télomères a été suivie sur MP41, MP46 et sur des fibroblastes normaux comme témoins. A) Les intensités de marquage des télomères ont été quantifiées sur les 3 modèles, et la distribution de l'intensité a été observée comme dépendant de la surface et spécifique au type de cellule. B) Après une analyse de normalisation en deux étapes, prenant en compte la taille des cellules, le nombre de chromosomes par cellule et la quantité de signal télomérique par cellule, une moyenne de perte de télomères/chromosomes a été calculée dans MP41, MP46 et les contrôles (contenant respectivement une moyenne de 76,8 chromosomes dans MP41, 44,8 dans MP46 et 46 par contrôle). Les étoiles jaunes mettent en évidence la perte de télomères sur 3 chromosomes de MP41. La fréquence de perte et de délétion des télomères par métaphase dans les cellules MP41 et MP46 est présentée dans la plupart des chromosomes des cellules MP41 et MP46. C). La fréquence de perte et de délétion des télomères par chromosome montre des aberrations télomériques de chromosomes spécifiques tels que les chromosomes 6, 8, 14, 17 et 22 dans les cellules MP41. D) Présence de séquences interstitielles de télomère sur le dicentrique (6;8;17), et sur un chr15 dérivatif. Des télomères sont absentes des dic(14;16), i(8q), chr6, et chr 14q. E) Détection d'un dic(1)t(1;11;6;8) et d'un chromosome en anneau provenant probablement d'un point de cassure en 1q21 conduisant à un chromosome en anneau (r(dic(1;11;6;8))). F) détection d'un chromosome en anneau dans MP46 (r(21)).

Figure 48: Exemple d'un variant structural (insertion, duplication) identifié dans MP41, associé à l'expression d'un transcrit de fusion MAPKAPK5-ACAD10.



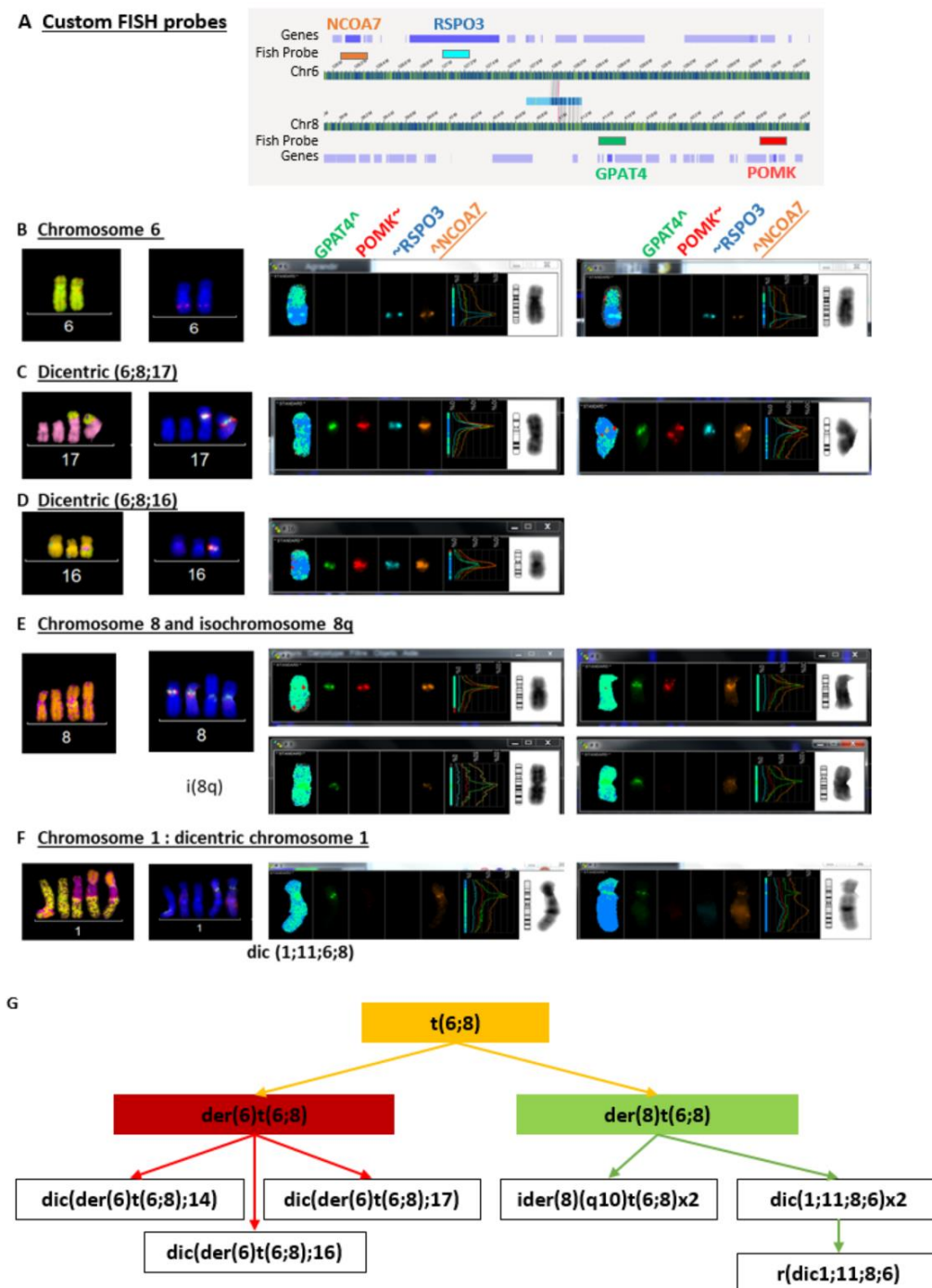
A) L'analyse par cartographie optique montre sur le chr12 (référence piste en vert), deux alleles détectés (piste en bleu) dont l'un des deux allèles contient deux copies de la région *ACAD10*-*MAPKAPK5* (rectangle en pointillé rose) dont la seconde est insérée en tandem dans *MAPKAPK5*. Les molécules d'ADN ayant conduit à l'établissement des cartes optiques des deux allèles sont affichées en jaune-orangé, donnant une couverture de la région *ACAD10*-*MAPKAPK5* de 60 à 70X par allèle.

B) La séquence nucléotidique de l'ARN de fusion affichée dans le rectangle en pointillé gris correspond à la séquence de l'amplicon de PCR ciblant l'ARN de fusion *MAPKAPK5*-*ACAD10*, et permet de préciser le point de jonction entre l'exon 7 de *MAPKAPK5* et l'exon 14 d'*ACAD10*.

De façon intéressante, un événement de translocation identifiée par cartographie optique dans MP41 entre les chromosomes 6 et 8, corrèle avec l'expression de deux transcrits de fusion confirmée par PCR et séquençage : *GPAT4*-*NCOA7* et *POMK*-*RSPO3*. Grace au FISH multi-spectral, la fusion est détectée sur des chromosomes 6 dérivatifs tels que *dic*(*der*(6)*t*(6;8);14); *dic*(*der*(6)*t*(6;8);16); *dic*(*der*(6)*t*(6;8);17), et sur des chromosomes 8 dérivatifs *der*(8)*t*(6;8), *ider*(8)(q10)*t*(6;8), *dic*(1;11;8;6) ainsi que sur le chromosome en anneau *r*(*dic*1;11;8;6). De façon à mieux comprendre les réarrangements, nous avons utilisé des sondes pour réaliser une analyse ciblée par FISH pour identifier spécifiquement *NCOA7* et *RSPO3* sur le chromosome 6 et *GPAT4* et *POMK* sur le chromosome 8 (Figure 49 A).

Figure 49: Complexité et hétérogénéité de variants structuraux présents dans MP41 impliquant les chromosomes 6 et 8.

Extrait de Gentien et al, 2022.



Analyse FISH des chromosomes 6 et 8 dans le modèle MP41. A) Sondes spécifiques (Empire Genomic, USA) conçues pour la détection de 4 gènes : *NCOA7* (orange), *RSPO3* (bleu), *GPAT4* (vert) et *POMK* (rouge). Les sondes FISH sont représentées sur la carte optique montrant la t(6;8) générée par l'analyse Bionano. B) la présence de *RSPO3* et *NCOA7* sur le chromosome 6. C) dic(6;8;17) contenant les gènes *GPAT4* et *POMK* en plus de *RSPO3* et *NCOA7*. D) dic(6;8;16) contenant les gènes *GPAT4* et *POMK* en plus de *RSPO3* et *NCOA7* (E) l'i(8q) contient les gènes *GPAT4* et *NCOA7*. (F) le dic(1;11;6;8) montre l'insertion des gènes *GPAT4* et *NCOA7* (G) schéma des possibles mécanismes de formation des réarrangements impliquant les chromosomes 6 et 8.

Les résultats obtenus par FISH montrent que les chromosomes dicentriques 6 (dic(6 ;8 ;14), dic(6 ;8 ;16) et dic(6 ;8 ;17)) sont reconnus par les 4 sondes des gènes *GPAT4*, *POMK*, *RSPO3* et *POMK* (Figure 49 C et D). Les chromosomes 8 sont reconnus pour les 2 gènes *GPAT4* et *POMK* natifs du chr8, ainsi que pour *NCOA7* dérivé du chr6, ce qui n'est pas le cas pour *RSPO3*. *POMK* (Figure 49 E). Les 2 isochromosomes 8 sont quant à eux uniquement reconnus par les sondes *GPAT4* et *NCOA7*. Ces différents résultats montrent des réarrangements complexes de régions proches des centromères des chromosomes 6 et 8 causé par une instabilité génomique. Sachant que MAPKAPK5-ACAD10 a déjà été identifié comme un variant ancestral dans une étude sur l'autisme (Holt et al. 2012), cette fusion semble ne pas être pertinente pour des analyses plus approfondies pour analyser de possibles fonctions oncogéniques dans l'UM.

Afin d'évaluer si d'autres lignées d'UM contenaient des variations structurales importantes, les lignées Mel202, MM66, OMM1 et OMM2.3 (Griewank et al. 2012; Jager et al. 2016) ont été testées par cartographies optiques et par TC+M-FISH. Des altérations ont pu être identifiées au niveau des télomères, associées à des chromosomes dicentriques et à des événements de translocations (David Gentien et al. 2022). Ces analyses réalisées sur des lignées comportant un gain du 8q, ont montré une instabilité génomique récurrente, identifiée par une analyse de cartographie optique à haute résolution, associée à une approche de TC+M-FISH.

E. ANALYSE INTEGRATIVE GENOMIQUE, TRANSCRIPTOMIQUE ET EPIGENETIQUE

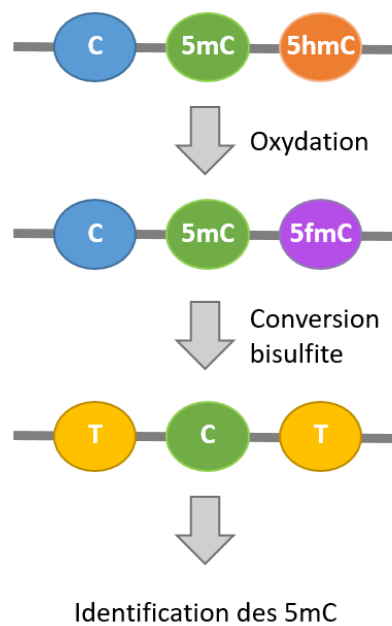
1. Caractérisation des régions méthylées et identification de nouvelles altérations *BAP1*.

L'analyse de méthylation a été menée pour l'ensemble des modèles d'intérêt à l'aide d'un protocole développé par Cambridge Epigenetix, pour lequel un contrat de collaboration a été mis en place pour le proposer dans le cadre des activités des plateformes Génomique et NGS de l'institut Curie. Le protocole OxBS utilisé permet d'identifier les méthyl Cytosine des îlots CpG de façon spécifique (Figure 50, (Booth et al. 2013)) et a permis de préparer des bibliothèques pour le séquençage des mélanocytes normaux contrairement au protocole basé sur la conversion au bisulfite de sodium standard puis séquençage (Qiagen, EpitectT), et ce probablement du fait de la mélanine présente en abondance.

La première analyse conduite avec les données de méthylation a consisté à évaluer les niveaux de méthylation des îlots CpG en commun avec les données de méthylation du TCGA pour MP41 et MP46. Cette analyse a permis de classer MP41 et MP46 dans les groupes 2 et 4 respectivement.

Figure 50: Schéma d'identification de 5mC.

Modifié de Booth et al, 2013.



Une oxydation des 5hmC en 5fmC puis un traitement au bisulfite permet de convertir les C non méthylés ainsi que les 5fmC en T, puis d'identifier les 5mC lues comme des C.

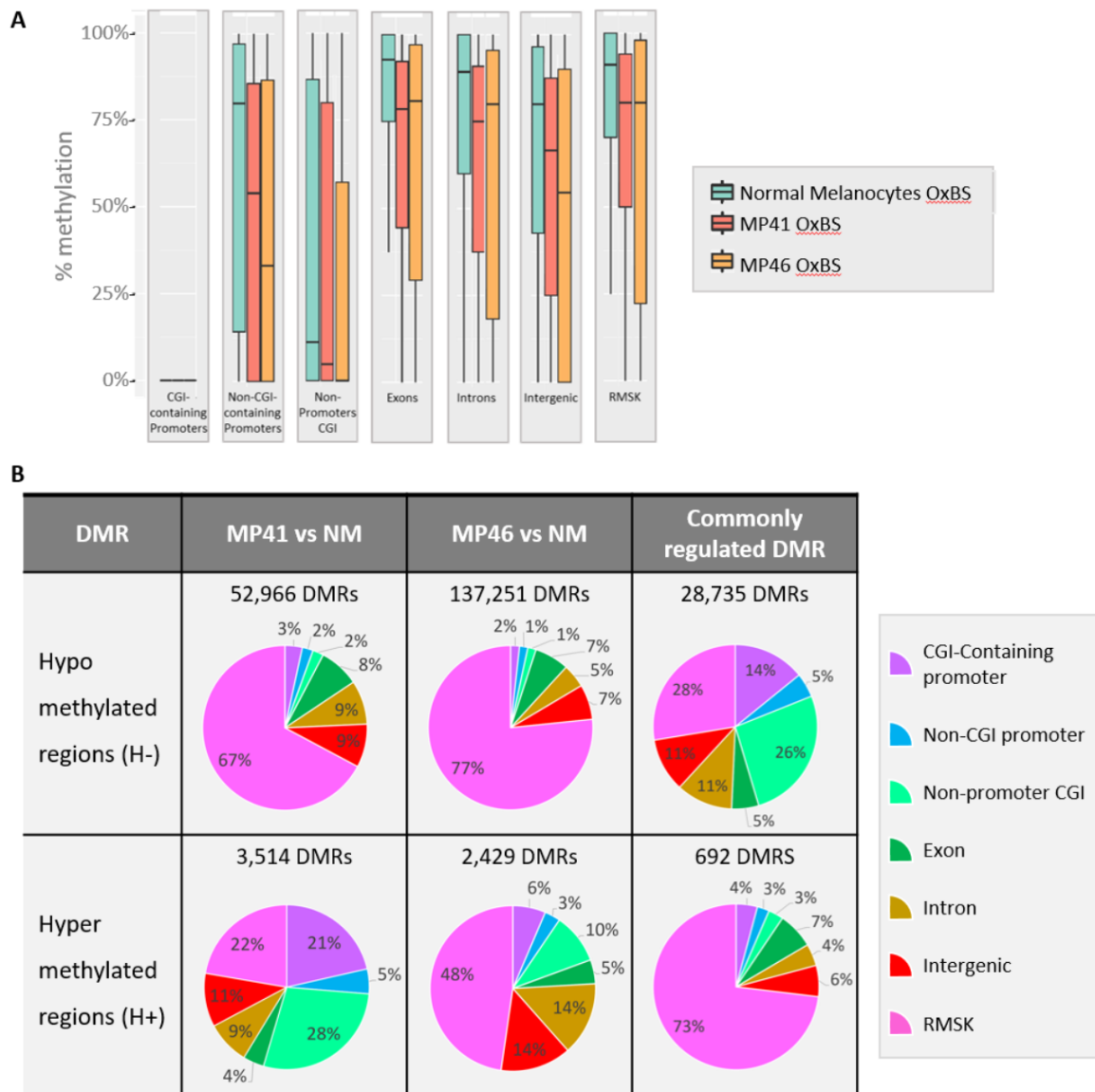
Les régions méthylées ont ensuite été annotées selon leur localisation génomique de façon à distinguer les régulations au niveau des promoteurs riches en CpG (CGI promoters), les promoteurs dépourvus de CGI, les exons, les introns, les régions intergéniques ainsi que les éléments répétés (Figure 51).

Comme attendu les CGI promoteurs sont méthylés (Figure 51 A) et ne présentent pas de différences notables entre UM et NM, alors que les autres localisations sont globalement moins méthylées dans MP41 et MP46 que les NM (Gama-Sosa et al. 1983; Feinberg et Vogelstein 1983). Des différences existent cependant entre les deux modèles MP41 et MP46, en particulier au niveau des promoteurs ne contenant pas de CGI, au niveau des CGI en dehors des promoteurs, et dans les régions intergéniques.

L'analyse des régions différentiellement méthylées (DMR) a été conduite pour MP41 vs NM et MP46 vs NM, de façon à identifier dans MP41 et dans MP46, les régions hyperméthylées et hypométhylées par rapport aux NM. L'identification de DMR repose sur l'analyse de CpG couverts par au moins 5 reads de séquençage, pour lesquels au moins 10 CpGs sont contenus dans une fenêtre de 500bp, et présentent au moins un écart de 30% de méthylation entre les modèles d'UM et les NM. Comme présenté sur la Figure 51 B, la plupart des DMR identifiées sont hypométhylées (H-) dans les modèles MP41 (53k H-) et MP46 (137k H-), et sont majoritairement localisées au niveau de régions répétées. Ensuite 2 à 3% des H- concernent des promoteurs contenant des CGIs, et 1 à 2% des promoteurs ne contenant pas d'ilots CpG. Les régions intergéniques, introniques et exoniques se répartissent ensuite les 21-26% de régions hypométhylées. Parmi les DMR hypométhylées identifiées dans ces comparaisons, la moitié des 53k H- de MP41 sont partagées avec MP46, alors que parmi les 137k H- de MP46 seulement 21% sont partagés avec MP41. La répartition des H- partagés par MP41 et MP46 est assez homogène. Les régions hyperméthylées (H+) identifiées dans MP41 vs NM et MP46 vs NM sont moins nombreuses (respectivement 3.5k et 2.4k), et se répartissent différemment entre les MP41 et MP46 vs NM. Seulement 692 H+ sont partagées entre M41 et MP46 vs NM, et sont majoritairement localisées sur les régions répétées. Globalement la majorité des DMR identifiées sont hypométhylées (H-) dans les comparaisons réalisées, dont la moitié de celles présentes dans MP41 représentent environ 20% de celles identifiées dans MP46 ; ces H- en commun représentent 29k DMR répartis de manière homogène sur le génome, dont 19% concernent des promoteurs. A l'inverse les 692 H+ en commun entre MP41 et MP46 concernent principalement des répétitions (73%) et peu les promoteurs (7%).

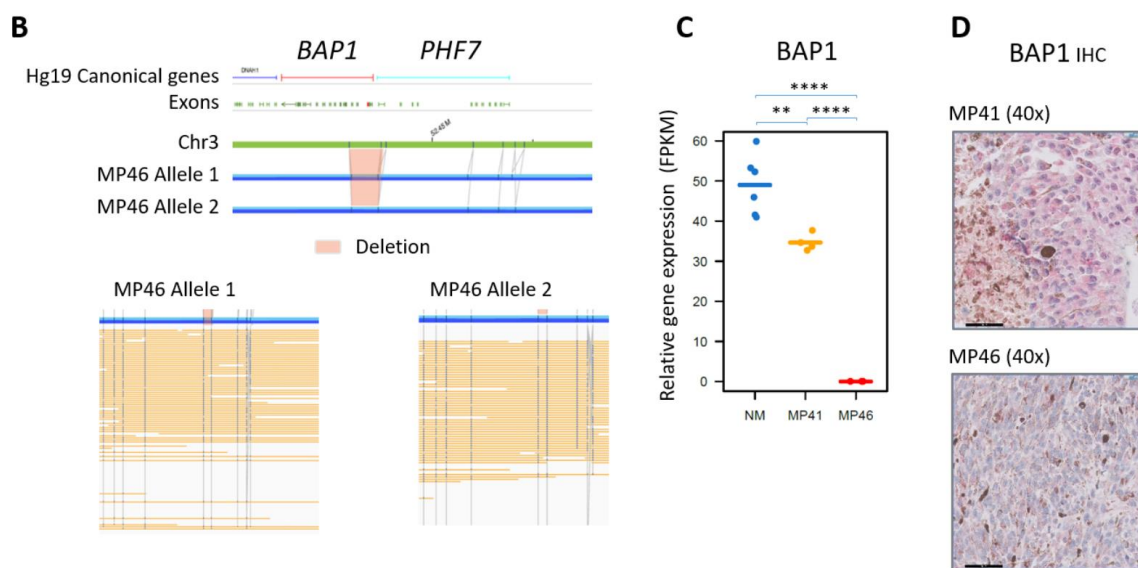
Figure 51: Analyse globale des régions méthylées et régulées entre MP41, MP46 et NM.

Extrait de Gentien et al, 2022.



Analyse globale de la méthylation de l'ADN des modèles d'UM et NM. A) Les niveaux de méthylation de l'ADN sont indiqués au niveau des promoteurs contenant des CGI, des promoteurs sans CGI, des CGI non localisés dans des promoteurs, des exons, des introns, des régions intergéniques et des répétitions, dans les mélanocytes normaux, MP41 et MP46. B) Régions différenciellement méthylées (DMR) en tant qu'hypo et hyper DMR (H- et H+) dans une fenêtre de 300kb dans MP41 vs NM, MP46 vs NM. Les DMR 'commonly regulated' correspondent aux DMR identifiées et partagées dans les comparaisons MP41 vs NM et MP46 vs NM. Les DMR ont été considérés comme communément régulés lorsqu'ils partagent la même variation (H- ou H+) et lorsque leurs coordonnées sont identiques ou se chevauchent.

Comme MP46 appartient au groupe 4 d'après la signature de méthylation du TCGA, et qu'aucune mutation ponctuelle n'avait été identifiée précédemment expliquant la perte d'expression de BAP1 au niveau protéique (Amirouchene-Angelozzi et al. 2014), nous avons focalisé notre analyse de méthylation sur le promoteur de *BAP1*. Cette analyse nous a permis de montrer que bien que le promoteur de *BAP1* soit hypométhylé dans les NM et dans MP41, une hyper-méthylation encadrant une délétion de 809bp est présente dans MP46 (Figure 52 A). Cette délétion de 809bp a été retrouvée dans les données de séquençage massif de l'ADN, et a pu être détectée par l'analyse de cartographie optique Bionano (Figure 52 B). MP46 ayant une isodisomie du chromosome 3, il est intéressant de valider par l'analyse Bionano que les deux allèles sont détectés comme portant la même délétion, estimée à 754bp.

[illegible]

L'hyper-méthylation identifiée aux bornes de la délétion de 809bp de MP46 ainsi que l'hypo-méthylation des promoteurs de NM et MP41 corrèlent avec les niveaux d'expression de BAP1 mesurés dans les mêmes échantillons en RNAseq (Figure 52 C), ou sur les PDX correspondants en IHC (Figure 52 D).

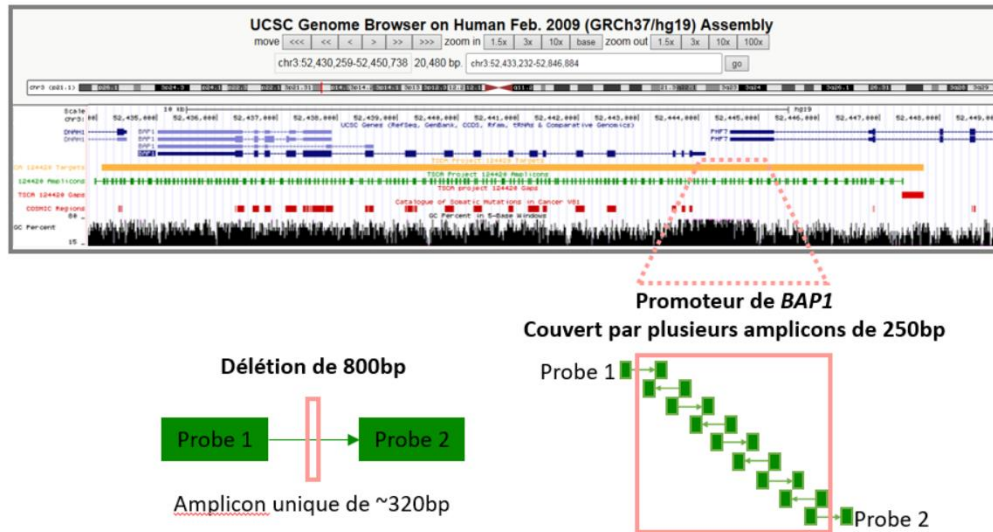
145

pour la mise en place de nouveaux modèles de PDX. La recherche de mutation a été comparée à la présence de la protéine BAP1 détectée en immunohistochimie. Deux nouveaux PDX ont présenté une délétion similaire dans la région promotrice de *BAP1* (de 526bp et 1114bp, Figure 53 B), dont la perte d'expression a été validée par immunohistochimie (Figure 54 C) (David Gentien et al. 2022). Un récent cas d'UM a été identifié dans le service de génétique de l'Institut Curie, comportant une délétion plus large que MP46 (2.2kb) grâce au programme France Medecine Génomique 2025 au sein de la plateforme SeqOIA.

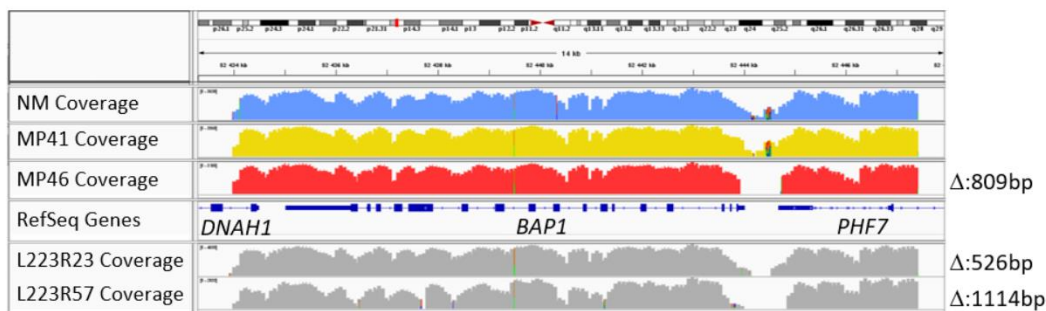
L'intégration des données d'expression aux profils de méthylation a été réalisée en considérant les gènes dont l'expression est régulée entre MP41 vs NM et MP46 vs NM. La majorité des gènes régulés en communs ne présentent pas de régulation significative de la méthylation, seuls 5% des gènes différentiellement exprimés sont hypo ou hyper méthylés au niveau de leur promoteur, parmi lesquels RASGRP3 et PRAME sont hypométhylés.

Figure 53: Identification de mutations *BAP1* par une approche de séquençage d'amplons.

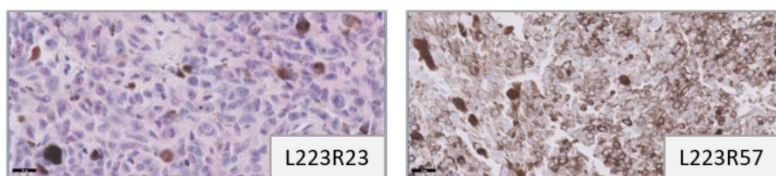
A



B



C



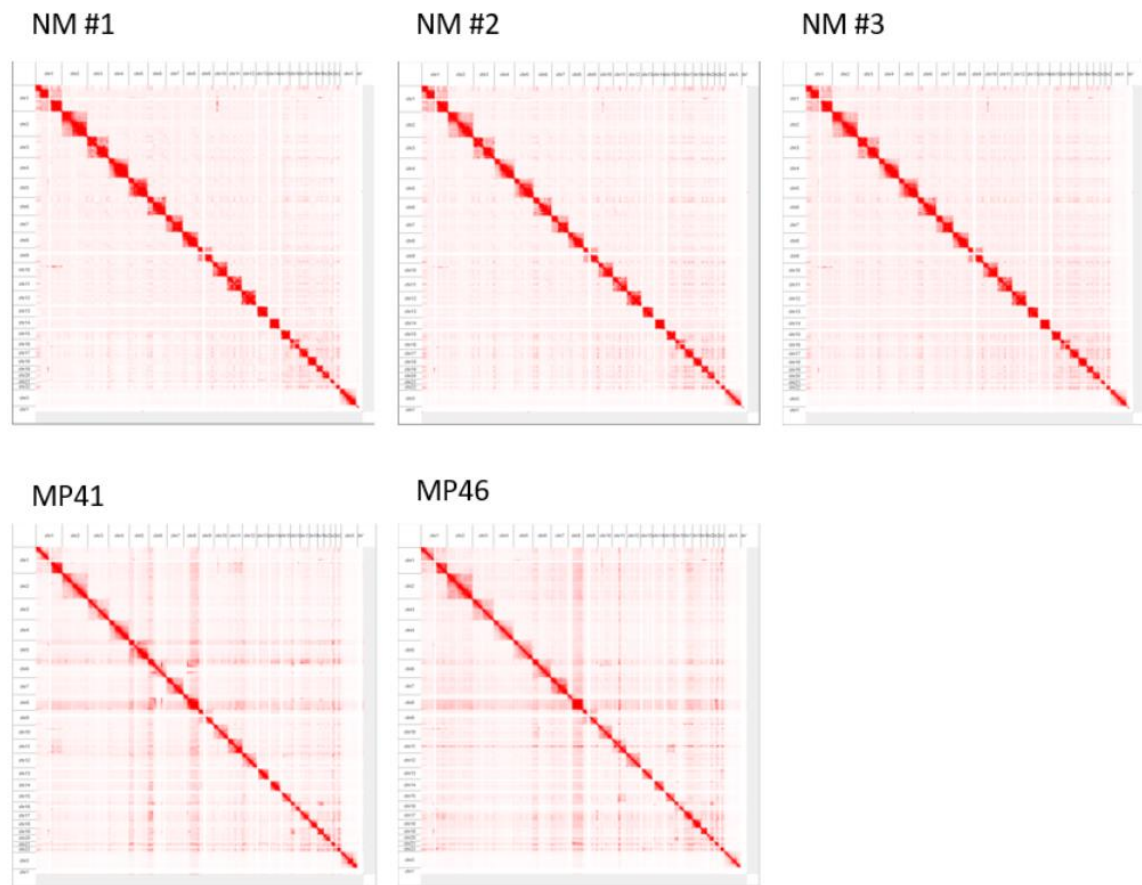
A) La visualisation de *BAP1/PHF7* à l'aide du Genome Browser de UCSC contient les annotations RefSeq de *BAP1* et *PHF7*, la région ciblée en orange du panel AmpliSeq, les amplicons de PCR en vert, les régions non ciblées du panel (première piste en rouge) les mutations somatiques référencées sous Cosmic (seconde piste en rouge), et le taux de GC en noir. Le trapèze en ligne pointillée rose correspond à la région promotrice de *BAP1/PHF7* ciblée par 9 amplicons chevauchant de 250bp et positionnés en quinconce. En cas de délétion de 800bp, un amplicon de 320bp pourrait être généré via les amorces 1 et 2. B). L'analyse sous IGV des données de séquençage ciblé pour les échantillons connus : NM, MP41 et MP46, ainsi que deux cas utilisés pour l'établissement de nouveaux PDX L223R23 et L223R54. La couverture diminue sur la région promotrice riche en GC de *BAP1/PHF7* pour les échantillons NM et MP41. La délétion de 809bp est retrouvée pour MP46. Les échantillons L223R23 et L223R27 ont également une délétion de 526 et 1114bp au niveau de la région promotrice de *BAP1/PHF7*. C) La perte d'expression nucléaire de *BAP1* est observée par immunohistochimie pour L223R23 et L223R57.

2. Analyse de la topologie et gènes différentiellement exprimés

a. Analyse globale

L'organisation spatiale de la chromatine contribue à la régulation de l'expression génique. Nous avons souhaité étudier comment cette organisation au sein du génome de mélanocytes pouvait être modifiée après transformation des mélanocytes uvéaux, et son impact sur l'expression des gènes. Pour cela, l'analyse de la conformation de la chromatine a été dans un premier temps, menée selon le protocole décrit par Job Dekker (UMASS, USA (Belton et al. 2012)), puis selon le protocole d'*in situ* Hi-C de Rao et al (S. S. P. Rao et al. 2014) de façon à améliorer l'analyse de la conformation de la chromatine. Trois échantillons de mélanocytes normaux ont été préparés en duplicat ainsi que deux réplicats biologiques pour MP41 et pour MP46 (Figure 54). Les données de séquençage ont fait l'objet de différents traitements bio-informatiques afin de corriger les effets liés aux variations du nombre de copies et en particulier avec la normalisation CAIC (Servant et al. 2018). Les interactions ont été étudiées pour caractériser les contacts entre deux régions à deux résolutions et ainsi définir les interactions à l'échelle des compartiments (résolution de 250kb, (Lieberman-Aiden et al. 2009)), et à l'échelle des domaines topologiques associés (TADs, 40kb, (Dixon et al. 2012; Nora et al. 2012)) (David Gentien et al. 2022). L'analyse des compartiments et des TADs a été interprétée avec l'outil de visualisation Juicebox (Durand et al. 2016).

Figure 54: Cartes de contacts obtenues pour NM, MP41 et MP46.



Les cartes de contacts issues des données Hi-C ont été générées à l'aide des données compilées de deux répliquats par échantillon traités selon le protocole de Rao et al, 2014, et visualisées à l'aide de Juicebox.

L'analyse des compartiments A et B (correspondant respectivement aux compartiments actifs de l'euchromatine, et inactifs de l'hétérochromatine), pour les modèles NM, MP41, et MP46, a montré que 72% des compartiments partageaient le même statut (AAA et BBB, Figure 55 A), et que 10% des compartiments des A ou B étaient partagés par un des modèles MP41 ou MP46 avec les NM. Pour simplifier l'analyse des compartiments, chaque type de compartiment annoté « ABB » correspond à l'état du compartiment dans les NM (1^e lettre), MP41 (2^e lettre) et MP46 (3^e lettre). Une faible proportion des compartiments actifs dans les NM sont inactifs dans MP41 et MP46 (4.36% sont ABB), comme d'ailleurs une faible proportion des compartiments inactifs dans les NM sont actifs dans les UM (3.64% sont BAA). La localisation des compartiments inactifs et actifs dans les modèles d'UM est présentée sur la Figure 55 C.

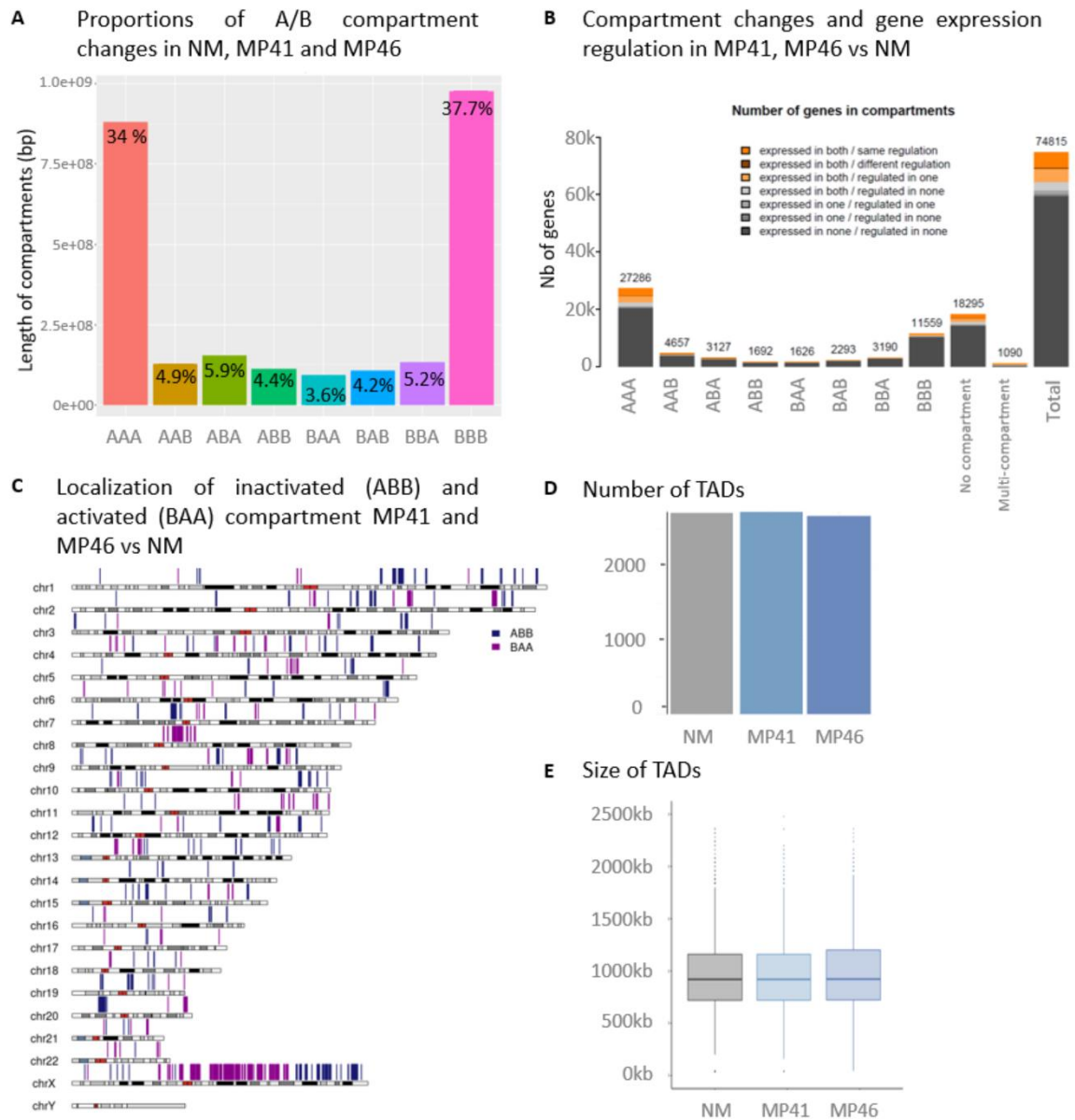
L'analyse du contenu génique des compartiments ainsi que l'expression et la variation d'expression mesurée selon l'état du compartiment est résumée sur la Figure 55 B. La majorité des gènes différentiellement exprimés et régulés en commun sont localisés dans des régions actives (AAA). Les compartiments spécifiquement inactifs et actifs dans les UM (respectivement ABB et BAA) contiennent 159 gènes différentiellement exprimés et plus précisément 96 gènes ayant la même régulation d'expression dans les compartiments inactifs dans MP41 et MP46 (ABB), et 63 gènes dans les compartiments actifs dans MP41 et MP46 (BAA) (Figure 55 C).

L'analyse des domaines topologiques associés (TADs), identifiés par la définition d'un score d'insulation défini tous les 40kb, ne montrent des différences significatives en terme de nombre, ou de taille de TAD (Figure 55 D et E).

Globalement, l'analyse de conformation de la chromatine permet de montrer que l'organisation des TAD est stable, que la majorité des gènes régulés (83%) sont localisées dans les compartiments actifs en commun entre NM, MP41 et MP46. Cependant 159 gènes dont l'expression est dérégulée appartiennent à des compartiments activés (BAA : 63/159) ou inactivés (ABB : 96/159) dans MP41 et MP46.

Figure 55: Analyse des compartiments et TAD identifiés dans NM, MP41 et MP46.

Modifié de Gentien et al, 2022.



Compartiments et domaines topologiquement associés (TAD) dans les mélanocytes normaux et les modèles de mélanome uvéal. A) Histogramme des changements de compartiments dans NM, MP41 et MP46. Compartiments identifiés à une résolution de 250kb en tant que compartiments A (euchromatine) et compartiments B (hétérochromatine) et comparés pour le statut de compartiment. 10364 compartiments ont été analysés et classés selon l'ordre NM-MP41-MP46, des compartiments actifs aux compartiments inactifs : AAA, AAB, ABA, ABB, BAA, BAB, BBA et BBB. B). Intégration des changements de compartiments et de l'expression génique entre NM, MP41 et MP46. C) Localisation des compartiments inactivés (ABB) et activés (BAA) dans MP41, MP46 vs NM sur une vue du génome entier. D) Nombre et E) taille des TADs dans NM, MP41 et MP46.

b. Modifications épigénétiques associées à la surexpression de PRAME

Pour enrichir la caractérisation de l'organisation de la chromatine et les régulations d'expression de gènes entre les mélanocytes normaux et les modèles d'UM MP41 et MP46, une analyse de marques répressives de la transcription comme H2AUb et H3K27me3, ainsi que la marque activatrice H3K4me3 ont été menées. Ces analyses supplémentaires ont été réalisées dans un premier temps à l'aide de mélanocytes normaux et deux réplicats de MP41 et de MP46 à partir de cellules fixées selon le protocole d'*in situ* Hi-C (S. S. P. Rao et al. 2014). Les immuno-précipitations de chromatine ont été réalisées par la Dr Stéphanie Le Corre dans l'équipe du Dr Raphaël Margueron (Schoumacher et al. 2016). Une seconde analyse visant la position de H3K27Ac, et CTCF a été réalisée à partir de nouvelles préparations de MP41 et MP46, que j'ai pu réaliser avec l'aide de kits Diagenode, afin d'identifier les enhancers (H3K27Ac) et les boucles d'extrusion via CTCF (Vos et al. 2021). L'ensemble des données de ChIPseq ont été analysées de façon à identifier la présence de pics grâce à l'utilisation d'ADN non immunoprécipité correspondant aux modèles testés utilisé comme « *input* ».

Afin de décrire la localisation des pics, l'analyse a porté sur la densité des marques d'histones au site de démarrage de la transcription (TSS), en amont (-2kb), au niveau des gènes (gene body), au-delà du site de terminaison de la transcription (TES) jusqu'à +2kb en aval du TES. Lorsque cela a été possible des variations entre les cellules tumorales et les cellules normales ont été analysées telles que MP41 vs NM et MP46 vs NM.

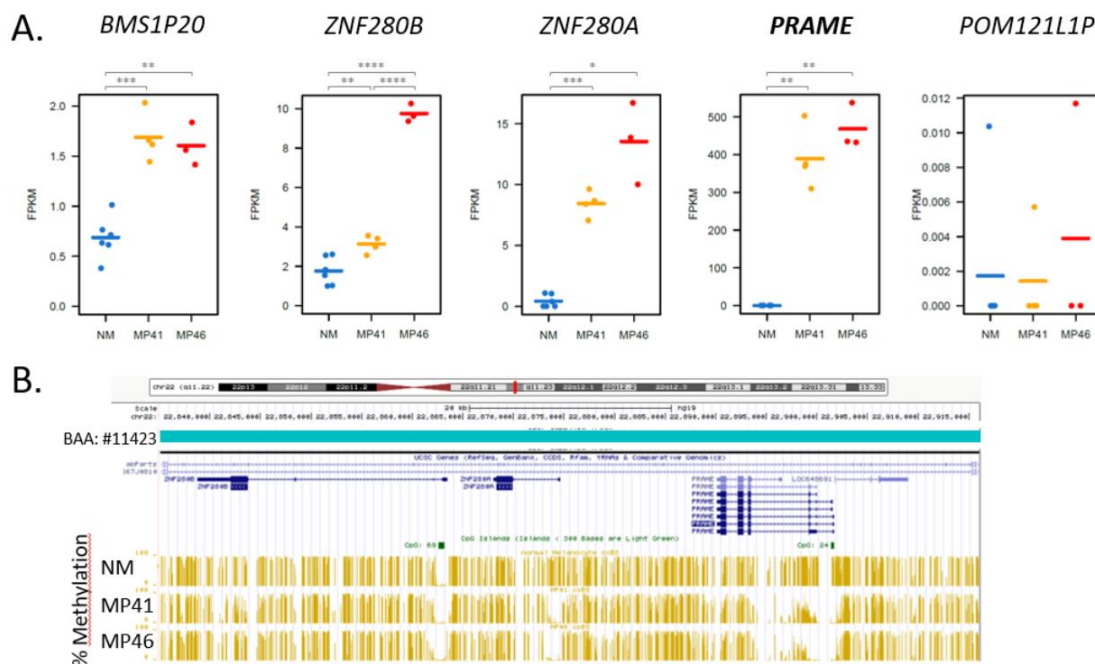
L'analyse des compartiments a permis d'identifier 371 compartiments activés en situation tumorale (BAA), lesquels contiennent 63 gènes dérégulés (37 surexprimés et 26 sous-exprimés) dans MP41 et MP46 vs NM. Parmi les 37 gènes surexprimés, 33 gènes contiennent un pic ou plusieurs pics H3K27Ac tels que *PRAME*, *ZNF280A*, *EZH2*, *HAGLR*. *PRAME* et *ZNF280A* contiennent un enrichissement en marque H3K4me3 dans MP41 et MP46 et leur promoteur est déméthylé comme celui de *ZNF280B* d'ailleurs. Parmi ces gènes surexprimés présents dans des compartiments actifs dans les modèles d'UM, 2 gènes ont perdu une marque H3K27me3 : *PITX2* and *COL4A5*. Parmi les 26 gènes sous exprimés dans ces compartiments activés, aucun est enrichi en marque H3K27me3 et n'a de promoteur hyperméthylé ; 20 gènes contiennent des marques H3K27Ac.

Parmi les gènes surexprimés, présents dans des compartiments activés, comme *EZH2*, *EPHA4* ou *PRAME*, *PRAME* est le gène le plus surexprimé (log2 fold change d'environ

12). Cette surexpression a d'ailleurs été identifiée par deux approches d'analyses transcriptomiques, l'une standard basée sur l'analyse différentielle de données RNAseq utilisant l'outil Easana (Genosplice), et une seconde basée sur l'analyse de k-mer (réalisée par les Drs Elnaz Saberi Ansari et Joshua Waterfall). *PRAME* n'est pas exprimé dans les mélanocytes normaux de la choroïde, mais présente une forte expression dans les modèles MP41 et MP46. *PRAME* est localisé sur le chromosome 22, près de deux gènes *ZNF280A* et *ZNF280B* (gènes Suppressor of Hairy Wing : *SUHW1/ZNF280A* et *SUHW2/ZNF280B*) situés en aval de *PRAME* sur le brin anti-sens comme *PRAME*. *PRAME* est lui-même situé en aval du gène *POM121LP* codant pour un ARN non codant. Dans ce locus de 170kb, seuls *ZNF280A/B* et *PRAME* sont surexprimés (Figure 56 A), et le promoteur de ces 3 gènes est hypométhylés (Figure 56 B), corrélant avec l'activation transcriptionnelle. Cette activation a d'ailleurs déjà été rapportée dans le mélanome de l'uvée (Field, Durante, et al. 2016; Schenk et al. 2007).

Figure 56: Activation de *PRAME* au niveau transcriptionnel et hypo-méthylation de son promoteur dans MP41 et MP46.

Modifié de Gentien et al, 2022.



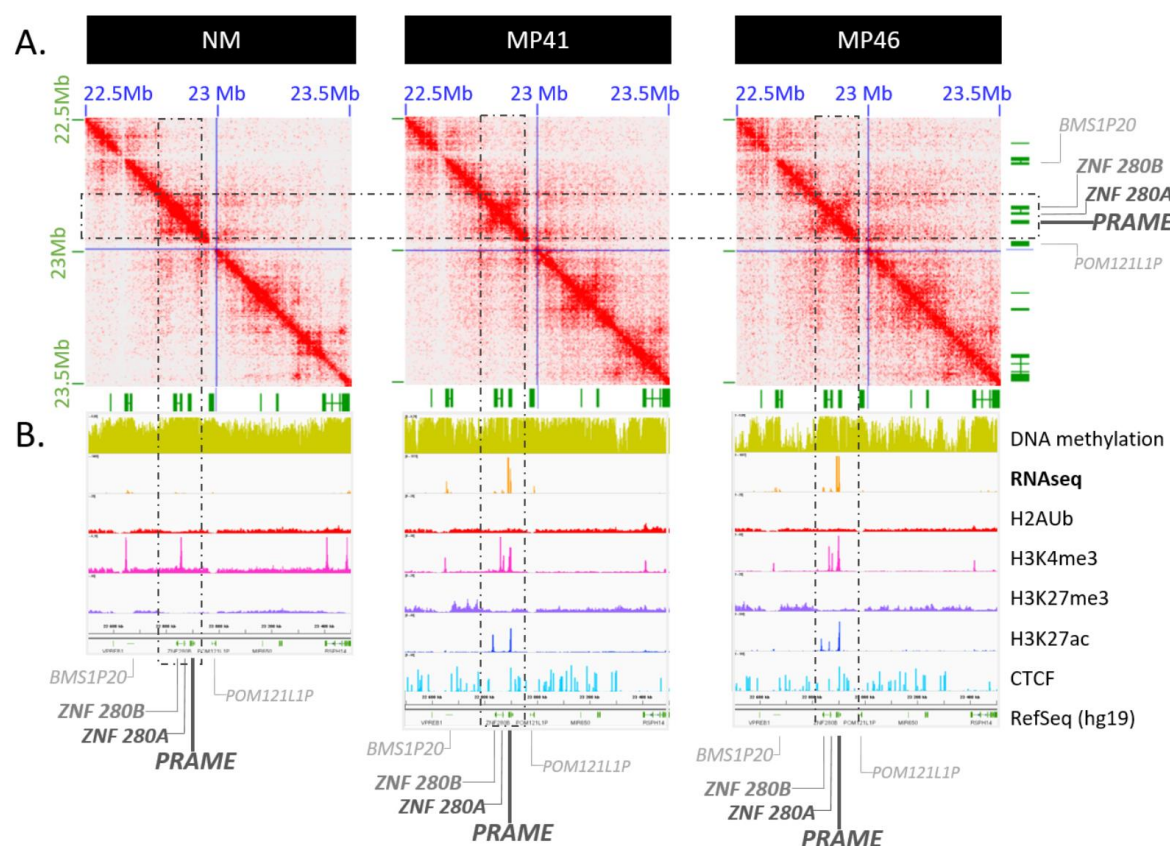
Analyse multi-omique du locus *PRAME*. A) Expression génique de *PRAME* et de ses voisins comme les gènes *BMS1P20*, *ZNF280B*, *ZNF280A* en amont et *POM121LP* en aval. Données RNAseq des réplicats NM, MP41 et MP46 (FPKM). B) Vue de l'UCSC Genome Browser (hg19) du pourcentage de méthylation de l'ADN (barres dorées).

Notre analyse sur le locus de *PRAME*, montre que le changement de compartiment à un état actif est associé à la présence de marques activatrices : H3K4me3, H3K27Ac et l'absence de marques répressives H3K27me3 et H2AUb. MP46 contient d'ailleurs un pic H3K27Ac supplémentaire dans *ZNF280A*, qui pourrait expliquer la surexpression de *ZNF280A* observée dans MP46 (Figure 57 B), comme observé dans d'autres modèles (Sungalee et al. 2021).

L'analyse de la topologie sur le locus de *PRAME* montre des contacts différents entre les mélanocytes normaux, et MP41 et MP46. Dans les deux modèles d'UM analysés, les interactions forment un motif d'anti-diagonale, au niveau des contacts de *PRAME* traduisant des contacts très étroits entre *PRAME* et *ZNF280A/B* (Figure 57 A), et dont la boucle d'ADN formerait une structure en épingle à cheveux.

Figure 57: Modification de la topologie et des marques d'histones au niveau de PRAME et ZNF280A/B.

Modifié de Gentien et al, 2022.



A) Cartes des contacts de NM, MP41 et MP46 établies à une résolution de 5 kb dans le TAD de *PRAME* (encadré en pointillés noirs). B) Vue intégrative du TAD de *PRAME* pour NM, MP41 et MP46 dans UCSC Genome Browser avec les gènes RefSeq, la méthylation de l'ADN, log2 RNAseq, H2Aub, H3K4me3, H3K27me3, H3K27ac et les pics CTCF.

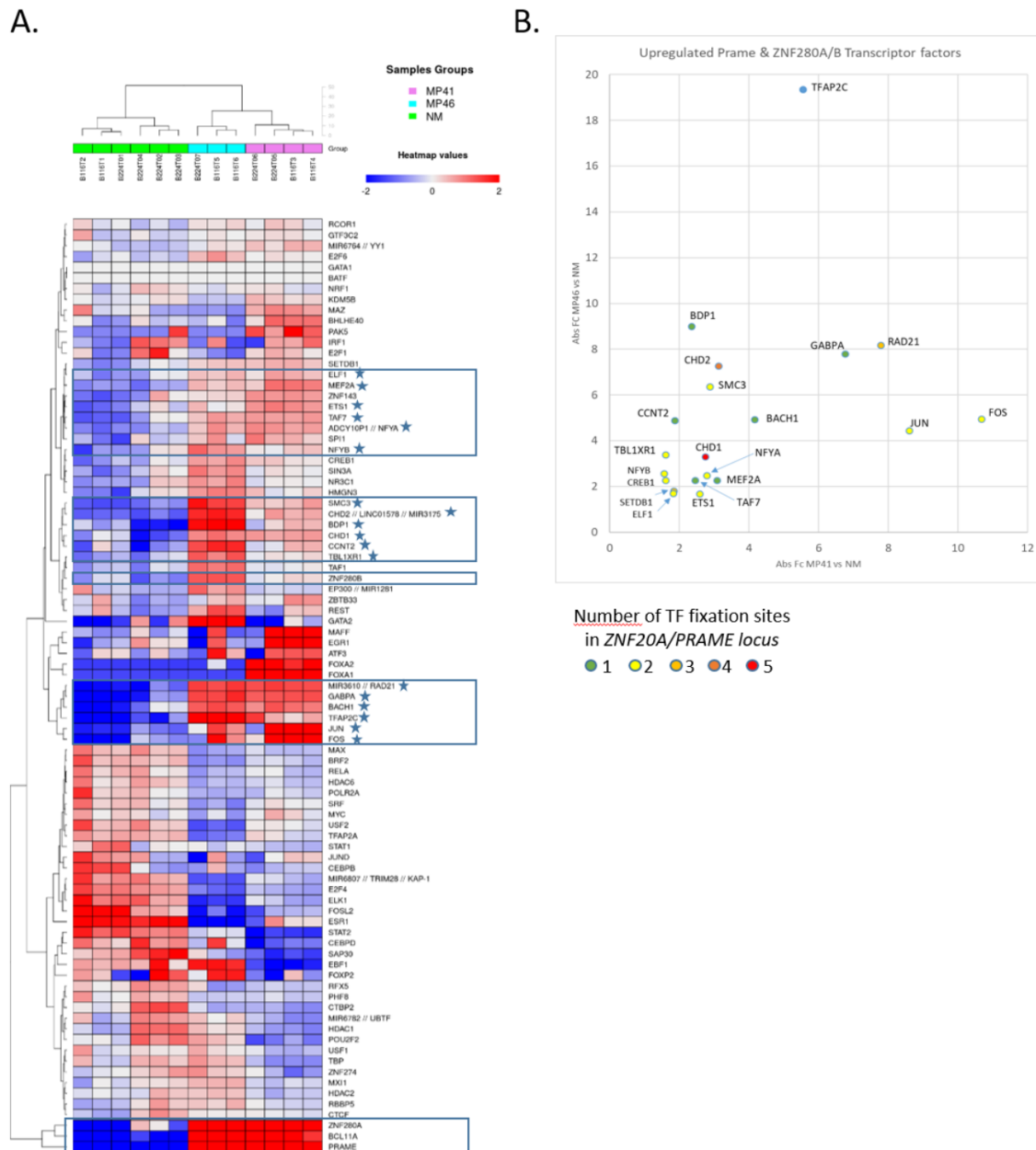
Grace à la base de données Encode contenant des données de ChIPseq pour différentes marques épigénétiques (Davis et al. 2018), 128 sites de fixation de facteurs de transcription ont été identifiés entre *ZNF280A/B* et *PRAME*. Parmi les 85 facteurs de transcriptions identifiés (Figure 58 A), 20 sont significativement surexprimés dans nos analyses à la fois dans MP41 et MP46 (Figure 58 B). Deux facteurs de liaison à l'ADN participant à l'organisation de la chromatine, RAD21 et SMC3, impliqués dans le complexe Cohesin pourraient contribuer à former cette boucle d'ADN ayant cette structure en épingle à cheveux sur la région de *PRAME* dans les modèles d'UM. De plus CHD1 et CHD2, impliqués dans la modification de l'organisation de la chromatine sont

également surexprimés. Ces 4 protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine pourraient participer à la surexpression de PRAME.

Ces résultats ont été publiés en mars 2022 à BioRxiv : doi: <https://doi.org/10.1101/2022.03.11.483767>. La version ci-après contient des modifications mineures, et la mise en forme a été adaptée pour soumission à Cancer Research. Dans le même temps, cette version à jour remplacera la première version soumise à BioRxiv.

Figure 58: Facteurs de transcription identifiés comme facteurs de transcription de PRAME-ZNF280A via Encode.

Extrait de Gentien et al, 2022.



Facteurs de transcription (TF) du locus *PRAME*, surexprimés dans les modèles d'UM. A) Regroupement hiérarchique des TF *PRAME* - *ZNF280A* enrichis par ENCODE. Les étoiles bleues indiquent les TF significativement régulés dans MP41 et dans MP46 par rapport à NM. B) Comparaison des FC absolus des TF *PRAME* significativement régulés obtenus dans les comparaisons MP41 vs NM (axes des abscisses) et MP46 vs NM (axe des ordonnées). Les TF sont colorées en fonction du nombre de sites de liaison identifiés à partir d'ENCODE.

Multi-omics comparison of malignant and normal uveal melanocytes reveals novel molecular features of uveal melanoma.

Authors:

David Gentien^{1,2,*}, Elnaz Saberi-Ansari^{1,3}, Nicolas Servant⁴, Ariane Jolly⁵, Pierre de la Grange⁵, Fariba Némati^{1,6}, Géraldine Liot⁷, Simon Saule^{7,8}, Aurélie Teissandier⁹, Deborah Bouchis⁹, Elodie Girard⁴, Jennifer Wong¹⁰, Julien Masliah Planchon¹⁰, Manuel Rodrigues^{11,12}, Laure Villoing Gaudé^{1,2}, Cécile Reyes^{1,2}, Matéo Bazire^{1,2}, Thomas Chenegros^{1,2}, Mylene Bohec¹³, Sylvain Baulande¹³, Radhia M'kacher¹⁴, Eric Jeandidier¹⁵, André Nicolas¹⁶, Didier Decaudin^{1,6}, Nathalie Cassoux^{10,17}, Sophie Piperno-Neumann¹¹, Marc-Henri Stern¹², Johan Harmen Gibcus¹⁸, Job Dekker¹⁹, Edith Heard²⁰, Sergio Roman-Roman^{1,Ω,*}, Joshua J. Waterfall^{1,3,Ω,*}.

Affiliation:

1. Translational Research Department, Research Center, Institut Curie, Paris Sciences et Lettres (PSL) Research University, 75005 Paris, France
 2. Genomics Platform
 3. INSERM U830, Research Center, Institut Curie, PSL Research University, 75005 Paris
 4. INSERM U900, Mines ParisTech, 75248 Paris, France
 5. GenoSplice, Paris, France.
 6. Preclinical Investigation Laboratory.
 7. Institut Curie, PSL Research University, CNRS, INSERM, UMR3347, U1021, Orsay, France;
 8. Université Paris-Saclay Centre National de La Recherche Scientifique, UMR 3347, Unité 1021, Orsay, France.
 9. INSERM U934, CNRS UMR 3215, 75005 Paris, France.
 10. Department of Diagnostic and Theranostic Molecular Pathology, Unit of Somatic Genetic, Hospital, Institut Curie, Paris, France.
 11. Department of Medical Oncology, Institut Curie, PSL Research University, F-75005, Paris, France.
 12. INSERM U830, DNA Repair and Uveal Melanoma (D.R.U.M.), Equipe Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, Department of Genetics, Institut Curie, PSL Research University, F-75005 Paris, France.
 13. Institut Curie Genomics of Excellence (ICGex) Platform, Institut Curie Research Center, PSL Research University, Paris, France.
 14. Cell Environment, DNA Damage R&D, 75020 Paris, France.
 15. Laboratoire de Génétique, Groupe Hospitalier de la Région de Mulhouse Sud-Alsace, Mulhouse, France
 16. Pathex, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France.
 17. Department of Ocular Oncology, Faculty of Medicine, Institut Curie, Université de Paris Descartes, F-75005 Paris, France.
 18. Department of Systems Biology, University of Massachusetts Chan Medical School, Worcester, MA 01605, USA.
 19. Howard Hughes Medical Institute, Department of Systems Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biotechnology, University of Massachusetts Chan Medical School, Worcester, MA 01605, USA.
 20. Director's Unit, European Molecular Biology Laboratory, 69117 Heidelberg, Germany.
- Ω. Co-senior Authors.
*. Correspondence: dgentien@curie.fr; sergio.roman-roman@curie.fr; joshua.waterfall@curie.fr

Abstract

Uveal Melanoma (UM) is a rare cancer resulting from transformation of melanocytes residing in the uveal tract. Integrative analysis has identified four molecular and clinical subsets in UM. To improve our molecular understanding of UM we performed extensive multi-omics characterization comparing two aggressive UM patient-derived xenograft models with normal choroidal melanocytes, including DNA optical mapping, specific histone modifications, and DNA topology analysis by Hi-C. Our gene expression and cytogenetic analyses suggest that genomic instability is a hallmark of UM. We also identified a recurrent deletion in the *BAP1* promoter resulting in loss of expression and associated with high risk of metastases in UM patients. Hi-C revealed chromatin topology changes associated with up-regulation of *PRAME*, an independent prognostic biomarker in UM and potential therapeutic target. Our findings illustrate how multi-omics approaches can improve the understanding of tumorigenesis and reveals two novel mechanisms of gene expression dysregulation in UM.

Introduction

Uveal Melanoma (UM) is a rare cancer (5-7 cases per million per year) which affects mainly adults and represents 5% of all melanoma [1]. UM results from the malignant transformation of melanocytes of the uveal tract of the eye, which comprises the iris, the ciliary body, and choroidal membrane [2]. UM primary tumors are well controlled by surgery and/or radiotherapy but more than 30% of the patients develop metastases, mainly in the liver, with a very poor prognosis. Improvement in the understanding of aggressive UM is essential for identifying efficient new therapeutic approaches.

The vast majority of UM display activating mutations of *GNAQ* [3] or its paralog *GNA11* [4], their upstream activator *CYSLTR2* [5] or downstream effector *PLCB4* [6]. These mutually exclusive $G\alpha/q$ -related mutations present in 98% of UM are recognized as a primary event of UM oncogenesis [7] and lead to the activation of $G\alpha/q$ signaling pathway [8], [9]. Mutations in *BAP1*, *EIF1AX*, *SF3B1*, and *SRSF2*, [10]–[13] were identified as a secondary mutational event necessary for malignant transformation. Mutations in *BAP1*, *SF3B1*, and *EIF1AX* (so called BSE events) are associated with distinct delays in the appearance of metastasis with the shortest delay associated with *BAP1* [14].

Over the last two decades, a number of recurrent chromosomal abnormalities have been identified in UM, including monosomy 3 (M3), gains of 6p and 8q, as well as loss of 6q and 8p. These abnormalities are associated with adverse clinical outcome and are currently used for clinical prognosis [15]–[18]. Monosomy 3 and gain of chromosome 8 correlate with an intermediate risk of metastasis and the highest risk of metastasis is associated with combined M3 and gain of 8q [16], [18]. Integrative analysis including copy number variations, DNA methylation, recurrent mutations, and gene expression profiles has identified four molecular and clinical subsets in UM [18].

To improve our understanding of tumor oncogenesis, we performed extensive multi-omic and FISH characterization of two aggressive UM PDX with distinct mutational and chromosomal rearrangement patterns as well as short term culture of normal choroidal melanocytes (NM) for comparison. In addition to investigating somatic DNA alterations and performing RNA sequencing and DNA topology analysis, we also performed whole genome DNA methylation sequencing and chromatin immunoprecipitation (ChIP-seq) of histone marks associated with activating (H3K4me3), repressing (H2A119Ub, H3K27me3) or enhancing (H3K27Ac) gene expression. These complementary analyses improved the characterization of regulated genes and pathways in aggressive UM.

Results

Samples studied

We sorted UM cells from two aggressive PDX models, MP41 and MP46 [19]–[21], to obtain both a pure tumor population and a sufficient number of cells [22]. The MP41 model was generated from enucleation of a UM occurring in a 50-year-old female patient who had a metastasis 31 months after initial diagnosis and who died 43 months after diagnosis from multiple metastases (including bones, lung, and subcutaneous lesions). The MP46 model was established from enucleation of a tumor occurring in a 69-year-old male patient. This patient developed a liver metastasis 6 months after diagnosis of the primary tumor, and died 7 months from initial diagnosis (Figure 1A). These two aggressive models harbor canonical activating mutations in *GNAQ/11* genes and share 8q and 6p gains. MP46 displays monosomy of chromosome 3 and is deficient in *BAP1* by immunohistochemistry (IHC) (Figure 1B), even though no *BAP1* mutations were identified by Sanger

sequencing. MP41 is BAP1 proficient by IHC (Figure 1B) and no mutations were identified in either *BAP1*, *SF3B1* or *EIF1AX*.

Whole genome sequencing and copy number analysis confirmed MP41 and MP46 as high risk UM.

First, MP41 and MP46 were subjected to whole genome sequencing (WGS) to perform single nucleotide variant (SNV) and copy number analyses. To facilitate the identification of somatic alterations, WGS was also conducted on matched healthy tissue adjacent to original primary tumors.

Somatic point mutation analysis revealed less than one somatic mutation per Mb (0.42 and 0.37 SNV/Mb in MP41 and MP46 respectively) as observed previously in UM [18]. Based on Cancer Genome Interpreter [23] and VarSome [24] classification, a unique known driver mutation associated to a pathogenic role was retrieved in both MP41 (*GNA11* c.626A>T, allele frequency (AF):43%) and MP46 (*GNAQ* c.626A>T, AF: 43%). Supplementary Tables 1 and 2 list all the SNVs labelled as passenger mutations, having a moderate to high impact on amino acid sequence, or affecting ncRNAs for MP41 and MP46, respectively. Additional mutations identified in MP41 included a premature stop codon in *KMT2C* (*KMT2C*:[p.Tyr987*]), a known driver mutation and 13 passenger mutations (based on oncodrive MUT algorithm). In MP46, we identified 21 passenger mutations in 19 genes of which 8 were predicted to be pathogenic.

The comprehensive TCGA UM study distinguished four copy number subtypes that had diverse aneuploid events and divided D3-UM and M3-UM into two subgroups, based on somatic copy number alterations [18]. Somatic copy number alterations as losses (L) and gains (G) identified from WGS of MP41 and MP46 models include notably for MP41: M3, G6p, L6q, L8p, G8q, and for MP46: Isodisomy 3, G6p, L8p, G8q as published [21] (Supplementary Table 3). Based on the TCGA copy number subtypes of uveal melanomas, MP41 and MP46 were classified in group 2 and group 4 respectively [18]. The classification of MP46 is consistent with the inclusion of BAP1-deficient tumors in group 4. Although TCGA group 2 is enriched in *SF3B1*-mutated UM, no *SF3B1* or *SRSF2* mutation and no *SF3B1* splicing patterns were observed in MP41 [13].

Overall, WGS analysis of MP41 and MP46 models confirmed the presence of a unique oncogenic driver mutation in the $G\alpha q$ pathway, the presence of M3 and G8q, and an association of TCGA copy number group 2 for MP41 and group 4 for MP46.

Gene expression analysis reveals upregulation of well-known genes and highlights DNA repair pathways.

We performed a gene expression analysis to compare the transcriptome of UM models to normal choroidal melanocytes. The RNAseq dataset was composed of five normal melanocytes cell lines (NM) including a technical replicate, four MP41 biological replicates and three MP46 biological replicates. Using unsupervised principal components analysis (PCA) and hierarchical clustering of all differentially expressed genes compared to NM controls ($\log_2$ fold change (FC) > 1.5, p -value $\leq 5\%$) we found a high reproducibility of the replicates and clear separation between UM models and NM (Figure 2A-B).

To identify consistently differentially expressed genes (DEG) in aggressive UM, we compared each PDX to the NM and then compared the resulting gene lists (Figure 2C, Supplementary Table 4). For MP41, a total of 8,212 DEG were identified (4,149 up and 4,063 down). Among the 9,368 genes identified in MP46, 4,337 were over-expressed and 5,031 were under-expressed. The overlapping 3,066 downregulated genes and 2,334 upregulated genes between MP41 and MP46 (Figure 2D, Supplementary Figure 1) were subjected to further analysis.

Cancer testis antigens were significantly enriched among the consistently over-expressed genes in MP41 and MP46, with *PRAME* [25] as the highest cancer testis antigen expressed in both MP41 and MP46 ($\log_2$ FC: ~ 12). *PLCB4* and *RASGRP3*, two key genes in UM oncogenesis were among the top 50-upregulated genes. A small percentage of UM patients display activating mutations in the PKC regulator *PLCB4* which are mutually exclusive with *GNAQ/GNA11/CYSLTR2* mutations [6]. The overexpression of *PLCB4* suggests a potential contribution to the activation of $G\alpha q$ pathway in the absence of *PLCB4* activating mutations.

RASGRP3 has been shown to mediate MAPK pathway activation in UM [8], [9]. We identified an additional GPCR downstream pathway gene, *RAPGEF4*, as significantly upregulated in both models.

Ranking the consistent DEGs by fold change indicated that the top 50 most upregulated genes in MP41 and MP46 were quite similar (Table 1A-B). Several non-coding RNAs including HAGLR and TRPM2-AS, which have been previously reported to participate in oncogenesis [26]–[30], were found over-expressed. This suggests that other consistently over-expressed genes may also play functional roles in UM. The overlap between differentially downregulated genes in MP41 and MP46 was less pronounced (Table 1C and D). Only eight of the top 50 most downregulated genes were shared between models. Consistent with the IHC result, BAP1 was the most downregulated gene in MP46.

We identified 101 cytobands that contained DEG (Supplementary Figure 1) most frequently located on 8q (18%). Up-regulated genes were significantly associated with copy number increases on chromosomes 8q, 1q, 21q in MP41 and MP46. We also found upregulated genes on cytobands from 5q and 4q, which have normal copy numbers (CN) in MP41 and MP46, and on cytobands from 2p/2q and 7q that were gained only in MP46. Down-regulated genes were associated with loss of 1p, 3p, 8p and 16q in MP41 and MP46. Yet, we also found significantly downregulated genes on 9q, 10q, 19p/q, lost only in MP41, and on 12q and 17q that were lost only in MP41 and MP46 respectively.

We next used Reactome [31] analysis to identify enriched pathways in the DEG. The top 50 dysregulated pathways are shown in Figure 2E. These pathways include proliferation-related pathways (cell cycle, mitosis, checkpoints) as well as chromatin maintenance and DNA repair pathways (DNA double strand break repair, Fanconi anemia) ($p < 1.5 \times 10^{-4}$, Supplementary Figures 2). DNA damage and repair (DDR) pathways were found to be enriched, and within DDR pathways, the Homologous Recombination (HR, Supplementary Figure 2B) pathway was the most significantly enriched ($p: 5.99 \times 10^{-9}$) based on the enrichment of DNA damage sensors and repair enzymes genes. Additionally thirteen genes from within the Fanconi Anemia pathway (FA, Supplementary Figure 2C) were consistently enriched after comparing UM to NM (min p-value: 2.94×10^{-4}).

In summary, these analyses revealed a list of DEG from two UM models compared to NMs with notably the over-expression of two GNA11/GNAQ pathway downstream genes: RAPGEF4 and PLCB4. Interestingly, DNA damage repair pathways were significantly enriched and PRAME, a marker of aggressiveness in UM, was among the most upregulated genes in both MP41 and MP46.

Optical mapping and FISH analyses reveal major chromosomal aberrations.

To further investigate genomic aberrations related to UM, we performed optical mapping with the Bionano platform [32], [33] as well as telomere and centromere staining followed by M-FISH (TC+M-FISH [34]) on MP41 and MP46. The optical mapping achieved 500bp resolution and a minimum coverage of 97X per sample, which revealed long-range DNA alterations including translocations, insertions, duplications, and small deletions in both models (Figure 3A, B and C). In MP41, optical mapping revealed both intra- and inter-chromosomal translocations (t(19;19) t(1;12) and t(6;8)). In MP46, intra-chromosomal translocations for chr19 and the inter-chromosomal translocation t(1;22) were identified. Structural variants (SVs) including deletions, insertions, and duplications were also identified and summarized in Figure 3C.

TC+M-FISH revealed a hyper-triploid genome for MP41 (Figure 3D) with dicentric chromosomes (dic(14;16), i(8q), dic(1;11;8)). We also identified four telomeric-related losses dic(1;11;6;8), dic(1;11), dic(6;8;14) and dic(6;8;17), and one interstitial telomeric sequence dic(6;8;17) (Supplementary Figure 3). Chromosomal end-to-end fusions are often associated with dicentric chromosomes and aberrant chromosomal structures. MP46 also displays a complex karyotype (Figure 3E): a hyper-diploid genome with multiple dicentric chromosomes: dic(1;17), dic(6;10), dic(8;21) and dic(13;22), dic(16;20); dic(20;22). Two translocations were also identified in MP46: t(1;22) and der(15)t(11;15). In addition to chromosome structural alterations, we repeatedly found ring chromosomes derived from chromosomes 1, 8, and 11 in MP41 and from chromosomes 9 and 21 in MP46 (Supplementary Figure 3E).

We next analyzed the RNAseq data for potential fusions using multiple algorithms and confirmed with RT-PCR and Sanger sequencing. In most cases, SVs were directly associated with the presence of fusion RNAs. For example, an insertion-duplication on 12q24 in both MP41 and in MP46, led to the fusion of MAPKAPK5-

ACAD10 in MP41 and KDM2B-RHOF in MP46. Both events occurred within the replication fragile site FRA12E [35] which has also been associated with germline structural polymorphisms [36]. In MP46, a t(1;22) translocation between CABIN1 and MPRS21 led to the fusion RNA CABIN1-MPRS21.

Interestingly, a complex translocation t(6;8) in MP41 resulted in two fusion RNAs: *GPAT4-NCOA7* and *POMK-RSPO3*. From FISH, we determined that the fusion was located on derivative chromosomes 6: der(6)t(6;8); dic(der(6)t(6;8);14); dic(der(6)t(6;8);16); dic(der(6)t(6;8);17), and derivative chromosomes 8: der(8)t(6;8), ider(8)(q10)t(6;8)x2, dic(1;11;8;6)x2, and on a ring chromosome r(dic1;11;8;6). In MP41, we specifically probed *NCOA7* and *RSPO3* (both on chromosome 6), as well as *GPAT4*, and *POMK* (both on chromosome 8) (Supplementary Figure 4A). We found that, contrary to dicentric chromosome 6, which was labelled with all four probes, normal chromosomes 6 only stained with *NCOA7* and *RSPO3* probes (Supplementary Figure 4B, C and D). On chromosome 8 we could stain the native genes *GPAT4* and *POMK* as well as chromosome 6 derived *NCOA7* (but not *RSPO3*) (Supplementary Figure 4E). Isochromosome 8 was only labelled with *GPAT4* and *NCOA7*, as dic(1;11;8;6) (Supplementary Figure 4E and F). A potential model for the generation of these complex patterns is in Supplementary Figure 4G.

We next investigated structural genomic aberrations in additional models of aggressive UM (Mel202, MM66, OMM1, and OMM2.3) through optical mapping and FISH analyses (Supplementary Figure 5A). Major SVs were detected in all tested UM models (Supplementary Figure 5B). Telomere aberrations were present in all tested UM cell lines (MP41, MP46, Mel202, MM66, OMM1 and OMM2.3 [37], [38]) and absent in normal controls (Supplementary Figure 5C). Translocations and dicentric chromosomes were detected in the cellular models (Mel202, MM66; OMM1; OMM2.3, Supplementary Figure 5D-G). Derivative chromosomes were also associated with complex SVs identified with optical mapping.

To summarize, high resolution DNA optical mapping combined with TC+M-FISH shows that high levels of genomic instability are a recurrent pattern in diverse aggressive UM models.

DNA methylation analysis reveals differences in CpG island (CGI) patterns and identifies BAP1 promoter deletion.

To characterize DNA methylation patterns, OxBS sequencing (Cambridge Epigenetix) was performed on both UM and NM. Oxidative bisulfite sequencing [39] was found to be more robust in our samples, particularly for the normal melanocytes, most probably due to the abundance of melanin.

First, a random forest analysis placed MP41 and MP46 in the TCGA methylation group 2 (corresponding to BAP1 proficient) and group 4 (BAP1 deficient) respectively. We next categorized methylation levels with respect to the following genomic localizations: CGI promoters, non-CGI promoters, exons, introns, intergenic regions and repeat elements (identified by RepeatMasker annotations [40]). As illustrated in Figure 4A, whereas CGI-promoters are generally equally demethylated in UM samples and NM, tumor samples are globally less methylated in non-CGI promoters as compared to normal samples across all genomic localization categories [41], [42].

Next, we identified differentially methylated regions (DMR) in each PDX compared to NM (Figure 4B). Most DMRs are hypomethylated (H-) in agreement with global methylation patterns (Figure 4A). We focused our analysis on DMRs which are consistent in MP41 and MP46. As expected most shared DMR are H- (28,735 / 29,427 - 98%). Notably, half of MP41 DMRs are shared with MP46, but MP46 shares less than a third of its DMR with MP41 (H-: 21%, H+ :28%). Interestingly, while H- genomic localizations are strongly enriched at repeat elements in each model independently, the shared H- are strongly depleted at repeat elements in each model independently, the shared H- are strongly depleted for this elements (Figure 4B). Genomic localizations of H+ DMRs are differently distributed in MP41 and MP46 with the largest differences occurring in repetitive elements and CpG islands. The localization of the 692-shared H+ is primarily in repeat elements and a subset is located in both CGI- and non-CGI promoters (Figure 4B).

As mentioned before, MP46 clusters with the DNA methylation group 4 of TCGA [18], which includes BAP1-deficient and monosomy 3 UM tumors. We analyzed the status of *BAP1* promoter methylation, because we did not find *BAP1* mutations in MP46 [21] despite the absence of BAP1 protein. Although MP41 displays a hypo-methylated promoter similar to NM, consistent with expression levels (Supplementary Figure 6 A), MP46 shows a specific hyper-methylation pattern in the promoter (CpG129, UCSC genome browser (hg19; chr3:52,443,678-52,445,104) that co-localized with the boundary of a 809bp deletion identified in the whole genome OxBS data (Figure. 4C). The *BAP1* promoter is a bidirectional promoter shared between *BAP1* and *PHF7*. In MP46, the *BAP1* promoter was deleted, and deletion boundaries were hyper-methylated.

Furthermore, both *BAP1* and *PHF7* were not expressed in MP46 (Supplementary Figure 6A and B). This large deletion was also confirmed in our DNA labeling, optical mapping and WGS data.

BAP1 promoter deletion has not been described in the 1346 ClinVar records or in the Cosmic database. To investigate if promoter deletion explains other cases of BAP1 deficiency, a targeted NGS approach based on tiling amplicon-sequencing covering BAP1 was performed on 53 tumor samples (Supplementary Figure 6C). We identified two additional cases with a similar deletion in the *BAP1* promoter (Supplementary Figure 6D), for which immunohistochemistry confirmed the absence of BAP1 expression (Supplementary Figure 6E). A recent UM case has also been identified internally harboring a deletion of *BAP1/PHF7* promoter, wider than that observed in MP46 (2.2kb). In the tumor, BAP1 could not be detected by IHC and the promoter deletion was confirmed by long range PCR (Supplementary Figure 7). This recent UM case was analyzed as part of the French initiative *France Medecine Genomique 2025* and made possible by the SeqOIA platform (<https://pfmg2025.aviesan.fr/en/>).

Next, we analyzed the methylation status of the consistent DEG in MP41 and MP46. Most of the DEG did not have a significant methylation switch, since only 5% of DEG displaying hypo or hyper-methylation of their promoters. However, several of the most differentially expressed genes, such as *RASGRP3* and *PRAME* discussed above, were part of this minority.

DNA topology analysis reveals stable compartments and TADs containing most differentially expressed genes.

The spatial organization of melanocyte genomes and in particular physical interactions may contribute to the regulation of gene expression during transformation. We performed chromosome conformation capture (Hi-C) to elucidate if gene expression changes are associated with chromatin organization and DNA folding in MP41 and MP46 (Figure 5A). To account for background from copy number alterations (Supplementary figure 8), we first compared multiple computational approaches for normalization. We found that CAIC was less sensitive to copy number variations than ICE and LOIC (Supplementary Figure 9 and 10) similar to previously analyzed breast cancer cell lines [43]. Genome folding presents itself at multiple length scales: chromosome

territories contain physically separated euchromatic and heterochromatic regions known as A and B compartments [44] and topologically associated domains (TADs) that result from loop extrusion [45]–[48]. First, we performed a compartment analysis at 250 Kb resolution [44], in NM, MP41 and MP46 (and refer to each window with a three letter code for its compartment status in NM, MP41 and MP46 respectively). Most compartments (~72%) shared the same status between our 3 models: A compartments (labelled as "AAA", 34.04%) and B compartments (BBB: 37.72%) (Figure 5B). Of note, the CAIC normalization allowed equal detection of A/B compartments irrespective of copy number status (Supplementary Figure 10C). The other compartment patterns are roughly frequent, accounting for 3.5-6% of windows (Figure 5B). A karyotype view was used to illustrate the position of compartment assignment changes in NM and UM models (Figure 5C). We further analyzed whether changes in compartment status overlapped with gene content and gene expression (Figure 5D). Most of the DEG were located in the constitutive A compartments (AAA), this enrichment was not significant when corrected for the total number of genes and the number of genes per compartment. The ABB and BAA compartments contained 159 DEGs (same regulation, 96 in ABB and 63 in BAA), but this was not statistically significant (Supplementary Table 5). Second, TADs were analyzed in both UM models using insulation score analysis in 40kb bins [49]. No significant differences in the number or size of TADs were observed between UM and NM (Figure 5E, 5F).

In summary, no differences in TAD structures were found and most differentially expressed genes (83%) were found in compartments that did not change status from NM to UM (Figure 4C). However, 159 DEG (~3%) were associated with changes in compartment status: 63 DEG belong to active compartments in MP41 and MP46, and 96 DEG belong to inactive compartments, indicating that differences in topology could underly differences in gene expression.

Chromatin topology and histone marks changes are associated with up-regulation of *PRAME*.

To further enrich our understanding of chromatin organization and gene expression regulation in NM, MP41 and MP46, chromatin immunoprecipitation (ChIP) and sequencing analysis were carried against the active

epigenetic mark H3K4me3, and repressive marks H2Aub and H3K27me3. Additionally, in MP41 and MP46, we used H3K27Ac to find active enhancers and CTCF to study cohesin-mediated loop extrusion [50].

As depicted in Figure 5D, 371 active compartments were identified specifically in tumor setting (BAA) containing 63 consistently DEG (37 higher and 26 lower) in MP41 and MP46 versus NM. Among the 37-upregulated genes in activated compartments, *PRAME* and *ZNF280A* were found enriched in H3K4me3. Also, 33 genes (including *PRAME*, *ZNF280A/B*, *EZH2*) display H3K27Ac peaks, 2 genes lost H3K27me3 marks (*PITX2* and *COL4A5*) and 4 were demethylated in their promoter. Among the 26 downregulated genes, none were enriched in H3K27me3 marks in both UM models, only one gene (*ZC4H2*) lost H3K4me3, 20 genes contain H3K27Ac marks, and no gene displays a hyper methylated promoter.

Upregulated genes associated with activated compartments include *EZH2*, *EPHA4*, and *PRAME*. Among the major regulated genes, *PRAME* is associated with a particularly high fold change (log2 Fold Change ~12.1 in MP41 and 11.9 in MP46 vs NM). *PRAME* upregulation was identified through a standard differential gene expression analysis RNAseq (Easana, Figure 6A). Although an absence of *PRAME* expression is observed in our NM, a huge number of *PRAME* counts are present in MP41 and MP46.

The *PRAME* gene is situated on 22q11.22 (hg19 chr22:22,890,123-22,900,022) between tandem Zinc finger proteins *ZNF280A* and *ZNF280B* previously identified as Suppressor of Hairy Wing (*SUHW1/ZNF280A* and *SUHW2/ZNF280B*) downstream of *PRAME* and a gene encoding a putative membrane glycoprotein (*POM121L1*) upstream of *PRAME* as illustrated on Figure 6D. In this locus, only *ZNF280A*, *ZNF280B* and *PRAME* are upregulated in a compartment being activated in our UM models compared to NM (Figure 6A). We also observed hyper methylation of the *PRAME* promoter in normal melanocytes and an hypomethylation in MP41 and MP46 tumor models (Figure 6B), which correlates with the activation of *PRAME* expression in UM (Figure 6A and 6D) [51]. The *PRAME* promoter methylation status has previously been described in UM as a marker of aggressiveness [52].

Our analysis of histone marks at the *PRAME* locus in MP41 and MP46, revealed the presence of active transcription histone marks (H3K4me3, H3K27Ac), and the absence of repressed transcription histone marks such as H3K27me3. In MP46 an additional H3K27Ac peak is observed in *ZNF280A*, which potentially also

contributes to *ZNF280A* expression. In NM, H3K4me3 and H3K27me3 peaks were not observed on the *PRAME* promoter (Figure 6D).

Chromatin conformation analysis at the *PRAME* locus revealed a different pattern in NM compared to UM MP41 and MP46 models. In both tumor models, the DNA topology analysis reveals tight contacts forming an anti-diagonal pattern on the contact map at the *PRAME* locus (Figure 6C). Such tight contacts could be caused by a hairpin structure of a single DNA loop.

Analyzing the ENCODE resource of transcription factor ChIP-seq experiments [53], [54], 128 transcription factor recognition sites were identified between *ZNF280A/B* and *PRAME* corresponding to 85 different DNA binding factors involved in chromatin and transcription regulation. Among these, 20 are also significantly upregulated in our gene expression analysis (Supplementary Figure 12). Expressed and upregulated *PRAME* DNA binding factors include cohesin components RAD21 and SMC3, which may contribute to this hairpin like topology. Chromatin organization modifiers such as DNA binding helicases CHD1 and CHD2, were also found upregulated in our analysis. All of these proteins are associated with chromatin remodeling and may contribute to *PRAME* overexpression in our UM models.

Overall, we have identified a novel pattern of chromatin conformation associated with striking overexpression of *PRAME* in UM.

Discussion

We report an extensive multi-omics approach comparing two aggressive UM models with short-term cultured normal choroidal melanocytes. The multi-omics analysis includes whole genome somatic mutations, transcriptome, copy number, methylome, DNA optical mapping, FISH, histone modifications, and DNA topology analysis by Hi-C. The MP41 tumor does not display any identifiable BSE event, expresses BAP1 and is classified in the TCGA copy number group enriched in SF3B1-mut UM. The second tumor sample, MP46, belongs to the TCGA high-risk group and does not express BAP1 despite the absence of mutations in the BAP1 coding sequence.

Although disomy 3 UM patients display a favorable outcome some of them develop metastases. This is the case of the patient from whom MP41 was derived. Interestingly in the TCGA cohort a third of disomy 3 UM samples (13 out of 38) do not display a BSE event whereas the absence of BSE event is rare in the monosomy samples (3 out of 42). Given the absence of a BSE mutational event in MP41 we carefully analyzed the whole genome sequencing data for mutations potentially explaining tumor progression in MP41. In addition to *GNA11* mutation, a nonsense truncating mutation in *KMT2C* was predicted as an oncogenic driver. This gene is altered in about 5% of cancers but *KMT2C* mutations have not been described in UM [55]. The RNA level of *KMT2C* in MP41 is not significantly different of that displayed by NM and we observed a very high expression of this gene in MP46 (data not shown). Further functional studies restoring the wild-type allele of *KMT2C* in cell lines derived from MP41 need to be performed to explore the potential contribution of the nonsense *KMT2C* mutation in UM. MP41 may thus serve as an informative model of aggressive UM outside the classical BSE context.

Our gene expression profiling compared to normal uveal melanocytes revealed several interesting patterns of gene expression changes. The list of differentially expressed genes can help to identify new players in UM oncogenesis and potential new therapeutic targets. Interestingly, *PLCB4* and *RASGRP3* were among the top 50 upregulated genes in both tumor models. Whereas activating mutations of *PLCB4* have been described in UM, our data suggests that high expression can also contribute to over-activation of the PKC pathway. The increase in expression of *RASGRP3* in UM samples is also of particular interest given that this protein has been shown to mediate MAPK pathway activation in UM [8], [9]. In the current study we have identified an additional GPCR downstream pathway gene, the Rap guanine nucleotide exchange factor *RAPGEF4* which is significantly upregulated in both UM PDX as compared to NM. Further functional studies must be conducted to evaluate the potential role of this protein in UM.

UM is classically considered to display a relatively simple pattern of karyotypic alterations in comparison with other solid tumors. Interestingly DNA repair is among the most deregulated pathways in our dataset. The TCGA consortium described an activation of DNA damage repair in transcription-based cluster 4, which is enriched for patients with the poorest prognosis. Consistent with activation of these pathways at the gene

expression level, our structural DNA analysis combining optical mapping and FISH revealed multiple chromosome aberrations including intra and inter chromosomal translocations, insertion-duplications, telomeres shortening and telomere aberrations. Importantly, we observed chromosomal aberrations by optical mapping and FISH approaches in six other UM cell lines strongly suggesting that genomic / chromosomal instability is a hallmark of aggressive UM.

Bi-allelic inactivation of *BAP1* is associated with an increased risk of metastasis in patients with uveal melanoma. In this work, we describe a novel genomic source of *BAP1* deficiency consisting of a deletion on the *BAP1* promoter and boundary hyper methylation. A targeted NGS approach identified two other cases of UM displaying deletion in the same genomic area resulting in the lack of *BAP1* expression indicating recurrence of this mechanism. Given the correlation of *BAP1* deficiency with the risk of developing metastases, our results indicate that in UM patients it will be informative to look at the *BAP1* promoter when mutations or indels in the coding sequence are not detected. This has been recently implemented in Institut Curie where NGS is performed on UMs as part of the National initiative "*France Medecine Genomique 2025*". Within this initiative, we have recently detected an additional UM case displaying the deletion of the *BAP1* promoter.

DNA topology was investigated by using an in situ Hi-C approach. Most changes in gene expression between NM and our two UM models were not accompanied with changes in compartment status. An important exception to this general pattern could be observed at the PRAME locus, where striking over-expression is accompanied by compartment switching and a qualitative change in the intra-TAD contact pattern with an anti-diagonal pattern of associations suggesting a potential hairpin-like structure associated with gene activation. This finding highlights the relevance of using a multi-omics approach that combines chromatin conformation alterations and RNA expression. Further investigation of repositioned compartments identified in our comparison could help address questions of compartment specificity recently identified in other tumor types [56].

In summary, our study illustrates how multi-omics integrative approaches conducted in a limited number of samples can improve the understanding of tumorigenesis and reveals two novel mechanisms of gene expression dysregulation in UM with potential clinical implications.

Methods

Isolation of UM cells from PDX.

As described before [19], [20], [22], MP41 and MP46 xenograft tumors were harvested before they reached a volume of 1 cm³ following ethical rules, and processed immediately for dissociation, immunolabelling and sorting based on Petit et al protocol[57]. To avoid isolation of heterogeneous UM cell populations in batches of experiments, immunostaining was conducted with the anti Muc18 containing a rabbit Fc: clone 8H2rFc, also with anti CEACAM1 (8G5hFc) and anti NG2 (14A7hFc) as characterized previously [22]. Secondary antibodies were anti rabbit Fc-AF647nm to reveal Muc18 labelling, and anti-human Fc to reveal at the same time CEACAM1 and NG2 labelling. Cell sortings were conducted with the help of cytometry platforms of Institut Curie on single live cells. In total, 15-20 mice were grafted per model, generating 225x10⁶ cells for MP41 and 133x10⁶ cells for MP46. Twelves batches of dissociation and cell sorting were carried out for MP41 and 10 batches for MP46 generating in total 225x10⁶ and 133x10⁶ cells respectively for MP41 and MP46. After each cell sorting, a fraction of cells was kept for DNA and RNA extraction, and most cells were fixed according Rao et al protocol.

Normal uveal melanocytes from two healthy donors and 3 preparations obtained after enucleations were dissociated and maintained in culture from choroidal membranes from Pr Simon Saule's lab and Dr Geraldine Liot. After enzymatic (with collagenase) and mechanical dissociation, primary cells were cultured in HAM/F12 supplemented with 10% FBS, Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 U/mL, 2mM L-glutamine, 2.5µg/mL Amphotericin B. Extemporaneously completed media was supplemented with 0.1mM IBMX, 10ng/µL of Cholera toxin (10 ng/ml final), and 10mg/mL βFGF and filter with a 0.22µm filter. Cell were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C , and culture medium was exchanged twice a week.

Quality control of isolated cells.

To monitor each fraction of MP41/MP46 isolated cells, DNA and RNA were extracted as described before, and tested for chromosomal copy number alterations and gene expression using Affymetrix microarrays respect to previous analysis done on primary tumor or pdx samples [22].

Based on this analysis, pools of MP41 cells and MP46 cells were used for whole genome sequencing, RNAseq, DNA methylation, *in situ* Hi-C, ChIPSeq experiments, and to allow replicates of *in situ* Hi-C and ChIPSeq analyses.

Whole genome analysis.

Genomic DNA was extracted using QIAamp DNA Mini kit, and quality controls were achieved using a Nanodrop ND1000 to evaluate DNA purity and Qubit™ dsDNA BR/HS Assays to evaluate double strand DNA concentration. 250ng of gDNA from MP41 and MP46 sorted cells were characterized using Affymetrix/Thermo Cytoscan HD microarrays to monitor copy number and LOH. Next, two micrograms of MP41 and MP46 DNAs were used to prepare paired-end 100bp Illumina libraries for whole genome sequencing. Genomic DNA from healthy surrounding tissue was sequenced according to approval by ethic committee of Institut Curie to filtered germline mutations.

Whole genome sequencing was conducted on genomic DNA extracted from PDX derived UM cells and from normal tissue preserved from enucleation. Illumina short read sequencing was achieved in two-separated runs due to availability of DNAs. The alignment of the sequenced reads to hg19 was performed with Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM v0.7.10). MuTect2 from the Genome Analysis Toolkit (GATK v3.5) was used in "Tumor with matched normal" mode to call somatic variants. Somatic point mutation analysis of whole genome sequencing revealed 1348 and 1186 single nucleotide variants in MP41 and MP46 respectively representing less than one somatic mutation per Mb (0.42 and 0.37 SNV/Mb) as observed in UM [18]. Detected variants with a frequency in the normal sample greater than 20% were filtered out. Variants in UM models were selected according coverage (>10), read counts (>20) and allele frequency (>20%) in UM models. Cancer Genome Interpreter (CGI, [23]) and VarSome tools (containing 10 pathogenic predictions, [24]) were combined to characterize variants.

Whole genome DNA methylation analysis was carried out with a Cambridge Epigenetics kit (TrueMethyl kit) that corresponds to an oxidative bisulfite reaction, to identify and analyze only 5-methylcytosine (5-mC). Briefly 400ng of genomic DNA were used to first perform an oxidation reaction, that converts 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) to 5-formylcytosine(5fC), thus after a bisulfite conversion, unmodified C and 5fC will be converted into uracils and sequenced as thymines contrary to 5mC that remains sequence as a cytosine. Libraries were sequenced on an Illumina Hiseq as paired end 100bp. Paired-end reads were trimmed with fastx toolkit v0.0.13 with these parameters : -f 8 -Q 33. Adapters were removed using Cutadapt v1.8-2. Cleaned reads were aligned with bismark v0.12.5 with default parameters onto the Human reference Genome Hg19. Only reads mapping uniquely on the genome were conserved. Methylation calls were extracted after duplicate removal. Only CG dinucleotides covered by a minimum of 5 reads were conserved for the rest of the analysis. Differentially methylated regions (DMR) were assigned when a methylation difference of 30% occurs at least on 10 CpGs in a minimum of 500bp windows; windows are merged if distant between two DMRs is less than 500bp. DMR calling was performed using the Bioconductor package DSS [58].

Chromatin structure analysis.

We performed *in situ* Hi-C in duplicate for 3 normal melanocytes (NM) and 2 UM models (MP41 and MP46) as described by Rao et al [59] Briefly, after cell sorting of MP41 and MP46, 3×10^6 NM and UM cells were fixed in 1% formaldehyde and stored at -80°C until further processing. Fixed cells were permeabilized, and an overnight digestion with MboI was conducted. DNA overhangs were filled in in the presence of biotin-14-dATP before proximal ends were ligated with T4 DNA ligase for 4 hours. After crosslink reversal with Proteinase K, DNA was purified using phenol/chloroform, quantified and sheared to a size of 400-500bp. Next, biotinylated DNA was pulled down with Dynabeads MyOne streptavidin T1 beads (Thermo Fisher) and DNA was repaired for 30 minutes with a mixture of T4 DNA ligase (NEB), T4 DNA polymerase I (NEB), large fragment of DNA polymerase I (NEB), and T4 Polynucleotide Kinase (NEB). Beads were washed and separated on a magnet before dA-tailing with Klenow exo minus (NEB). A final wash was performed before Illumina adaptor ligation. PCR amplification with Illumina primers was performed for 12 cycles and product

was collected with AMPure. An equimolar pool of libraries was sequenced on an Illumina HiSeq - rapid Run, generating 250-436x10⁶ read pairs. Hi-C data were processed using HiC-Pro [60] before comparing 3 different normalization algorithms (CAIC, LOIC and ICE methods, [43]).

DNA Optical mapping and cytogenetics analysis.

SVs analysis was conducted with Bionano DNA optical mapping from 1.5x10⁶ MP41 and MP46 cell pellets. A direct labelling on CTTAAG motif (DLE1) was conducted according to Bionano recommendations. Labelled DNA were analyzed on a Saphyr system. A De novo assembly was carried out using the Bionano serve 1.6. Molecule N50 was 407.8kbp for MP41, label density was 16.3 per 100kbp and effective coverage of the assembly was 71.9X. For MP46, molecule N50 was 325.6kbp, label density was 16.9/100kbp and effective coverage of assembly was 84.5X.

Telomere and centromere staining followed by M-FISH technique were applied on cytogenetics slides after colcemid (0.1µg/mL) treatment of MP41 and MP46 cells as described previously [34], [61] to identify numerical and structural chromosomal alterations as well as telomere instability. Briefly, UM cells were cultured in T75 in DMEM with 10-20% SVF depending on models (10% SVF: MP41, Mel202, OMM1, OMM2.3; 20%: MP46). Forty-eight hours after passage, medium was supplemented with colcemid (0.1 µg/mL) for a 3h incubation to arrest dividing cells in metaphase. Cells were harvested, washed, suspended in 10mL DMEM with 0.075 M potassium chloride (Merck, Kenilworth, NJ, USA) and incubated for 20 min in a 37°C water bath (hypotonic shock) and fixed as previously described [34]. Next a telomeres and centromeres followed by M-FISH technique (Metasystems probes, Germany) were performed as previously described [62]. The quantification of telomere FISH signal intensity in interphase cells was performed using Metacyte software (MetaSystems, version 3.9.1, Altussheim, Germany) and TeloScore Software (Cell Environment, Evry, France).

The mean fluorescence intensity (FI) of telomeres was automatically quantified in 10,000 nuclei on each slide. The settings for exposure and gain remained constant between captures. The experiments were performed in triplicate.

Analysis of metaphase spreads allowed detection of telomere abnormalities and chromosomal aberrations using ChromoScore Software (Cell Environment, Evry France) and Isis software (MetaSystems, Altussheim, Germany). The images of metaphases were captured using automated acquisition module Autocapt software (MetaSystems, version 3.9.1) and a ZEISS Plan-Apochromat 63x/1.40 oil (Zeiss, Oberkochen, Germany) and CoolCube 1 Digital High Resolution CCD Camera (MetaSystems, Altussheim, Germany) with constant settings for exposure and gain.

For each UM model, telomere and chromosomal aberrations were analyzed automatically on 100 metaphases. The scored telomere abnormalities were (i) sister telomere loss, likely occurring in G2, and defined as a telomere signal-free end at a single chromatid, (ii) telomere deletion defined as the loss of two telomere signals on the same chromosome arm (likely resulting from the loss of one telomere in G1/S), an aberration considered to represent double strand breaks, leading to activation of DNA damage response. The scored chromosomal aberrations were dicentric chromosomes, centric rings, translocations, insertions and deletions.

Whole transcriptome analysis.

Total RNA was extracted using miRNeasy kits following supplier recommendations, including a DNase step. Quality controls were achieved using a Nanodrop ND1000 to evaluate RNA purity and concentration, and on automated electrophoresis to monitor RNA integrity (Bioanalyzer RNA 6000 Nano/Pico kits). PolyA RNASeq was conducted on total RNA (RIN>7), treated with DNase. An absolute fold change higher than 1.5 and a p-value below to 0.05 were selected as parameters for detecting differentially expressed genes. Splicing analysis was conducted with 5 different pipelines: deFuse, SOAPfuse, JAFFA, FusionCatcher, TopHat-Fusion. Fusion RNAs were identified present in at least 2 algorithms, and found in at least 2 replicates per model.

Histone Modifications.

ChIPSeq against H2Aub, H3K4me and H3K27me3 were conducted in triplicate in NM, MP41 and MP46 as published in [52]. ChIPSeq against H3K27Ac and CTCF, were conducted in duplicated in MP41 and MP46

to implement multiomics analysis. 5 million cells were fixed according the protocol used for in situ Hi-C experiments for H2Aub, H3K4me3, and H3K27me3, and for H3K27ac and CTCF. The chromatin was prepared using the iDeal ChIP seq kit from Diagenode for Transcription Factor protocol. Shearing conditions were setup as 10 minutes using the following settings: 10 cycles of 30" [ON] 30" [OFF]. The shearing efficiency was monitored after reversion of the crosslinking and purification of the DNA. For increased sensitivity, an automated capillary electrophoresis system Fragment Analyser was used for chromatin shearing assessment (High sensitivity NGS fragment kit). ChIP assays were performed as defined in the optimizations using 10 µg or 1µg of chromatin per IP with the optimal antibody quantity resulting in the higher enrichment and lower background (CTCF 1µg, H3K27ac 1µg) IPs with a negative control isotype (IgG) were performed in parallel. For each sample, a library preparation was performed on ChIP and input DNA using the MicroPLEX v3 protocol. A control library was processed in parallel with the samples using a control Diagenode ChIP DNA. Five cycles of pre-amplification were performed and 1 µl of each library was analyzed by qPCR in order to determine the optimal amplification cycles required to obtain enough DNA for sequencing. Libraries were then loaded on Fragment Analyzer to check if enough material was generated. After the amplification, the libraries have been purified using AMPure beads and eluted in Tris. Then, the purified libraries were quantified using the Qubit ds DNA HS kit and analyzed on the Fragment Analyzer to assess their size. Using the quantification values from the Qubit and the size measurement generated by the Fragment Analyzer, the molar concentration of each library was calculated.

The quality control of the fastq files was performed using FastQC. The sequences were aligned on hg19 assembly using bowtie2. Duplicates were marked and filtered out using Picard tools MarkDuplicates and samtools. The peak calling was performed using macs2 callpeak function. The parameter --broad was used for the Histone samples, not for the transcription factor samples. The affinity binding scores were obtained using DiffBind package in R, TMM normalization was applied. Peaks found in at least 50% of the samples from the same condition were kept. The peaks were annotated using FAST DB.

Acknowledgements

The authors thanks the members of the Institut Curie animal facility involved in UM projects, the members of the cytometry platform of Institut Curie and Hospital Saint Louis in Paris for their support of UM cell sorting, the members of the recombinant protein and nanobodies platforms of Institut Curie, the Pathex platform of Institut Curie for BAP1 immunochemistry, the biological resources center for providing UM samples for the BAP1 analysis. The author thank the Unit of Somatic Genetic at the hospital of Institut Curie for the analysis done on NM. The authors thank the genomics platform of Institut Curie for assistance in STR profiling, copy number analysis, DNA optical mapping of UM samples (Audrey Rapinat, Matéo Bazire), with the support of the Region Ile France (SESAME 2019 grant). High-throughput sequencing was performed by the ICGex NGS platform of the Institut Curie supported by the grants ANR-10-EQPX-03 (Equipex) and ANR-10-INBS-09-08 (France Génomique Consortium) from the Agence Nationale de la Recherche ("Investissements d'Avenir" program), by the ITMO-Cancer Aviesan (Plan Cancer III), and by the SiRIC-Curie program (SiRIC grant INCa-DGOS-4654). This work was supported too with a grant from the National Human Genome Research Institute to Job Dekker (HG003431). Job Dekker is an investigator of the Howard Hughes Medical Institute. The authors also thank the Bionano Genomics company and the GENTYANE platform in Clermont Ferrand for the first analysis of MP41 and MP46 models using optical mapping.

Author Contributions

DG, EH, SRR, JJW, conceived and designed the study. DG, NS, CR, LVG, MB, TC, SB, RM, EJ, AN, collected the data. DG, ESA, NS, AJ, PDLG, GL, SS, AT, DB, RM, EJ, AN, MHS, JHG, JD, JW, JMP, LVG, SRR and JJW analyzed and interpreted the data. DG, SRR and JJW wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the final version of the submitted report.

Data availability

Supplementary table 1 is available upon request. Sequencing data generated in this work will be deposited on a public portal.

Bibliography

- [1] M. Rodrigues *et al.*, « Evolutionary Routes in Metastatic Uveal Melanomas Depend on MBD4 Alterations », *Clin Cancer Res*, vol. 25, n° 18, p. 5513-5524, sept. 2019, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1215.

- [2] B. A. Krantz, N. Dave, K. M. Komatsubara, B. P. Marr, et R. D. Carvajal, « Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease », *Clin Ophthalmol*, vol. 11, p. 279-289, 2017, doi: 10.2147/OPTH.S89591.
- [3] C. D. Van Raamsdonk *et al.*, « Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi », *Nature*, vol. 457, n° 7229, p. 599-602, janv. 2009, doi: 10.1038/nature07586.
- [4] C. D. Van Raamsdonk *et al.*, « Mutations in GNA11 in uveal melanoma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, n° 23, p. 2191-2199, déc. 2010, doi: 10.1056/NEJMoa1000584.
- [5] A. R. Moore *et al.*, « Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor CYS2TR2 in uveal melanoma », *Nat Genet*, vol. 48, n° 6, p. 675-680, juin 2016, doi: 10.1038/ng.3549.
- [6] P. Johansson *et al.*, « Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in PLCB4 », *Oncotarget*, vol. 7, n° 4, p. 4624-4631, déc. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.6614.
- [7] J. Ma, L. Weng, B. C. Bastian, et X. Chen, « Functional characterization of uveal melanoma oncogenes », *Oncogene*, vol. 40, n° 4, p. 806-820, janv. 2021, doi: 10.1038/s41388-020-01569-5.
- [8] X. Chen *et al.*, « RasGRP3 Mediates MAPK Pathway Activation in GNAQ Mutant Uveal Melanoma », *Cancer Cell*, vol. 31, n° 5, p. 685-696.e6, 08 2017, doi: 10.1016/j.ccell.2017.04.002.
- [9] A. R. Moore *et al.*, « GNA11 Q209L Mouse Model Reveals RasGRP3 as an Essential Signaling Node in Uveal Melanoma », *Cell Rep*, vol. 22, n° 9, p. 2455-2468, 27 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.081.
- [10] J. W. Harbour *et al.*, « Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas », *Science*, vol. 330, n° 6009, p. 1410-1413, déc. 2010, doi: 10.1126/science.1194472.
- [11] M. Martin *et al.*, « Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3 », *Nat. Genet.*, vol. 45, n° 8, p. 933-936, août 2013, doi: 10.1038/ng.2674.
- [12] J. W. Harbour, E. D. O. Roberson, H. Anbunathan, M. D. Onken, L. A. Worley, et A. M. Bowcock, « Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma », *Nature Genetics*, vol. 45, n° 2, Art. n° 2, févr. 2013, doi: 10.1038/ng.2523.
- [13] S. Alsafadi *et al.*, « Cancer-associated SF3B1 mutations affect alternative splicing by promoting alternative branchpoint usage », *Nat Commun*, vol. 7, p. 10615, févr. 2016, doi: 10.1038/ncomms10615.
- [14] S. Yavuzytigitoglu *et al.*, « Uveal Melanomas with SF3B1 Mutations: A Distinct Subclass Associated with Late-Onset Metastases », *Ophthalmology*, vol. 123, n° 5, p. 1118-1128, mai 2016, doi: 10.1016/j.ophtha.2016.01.023.
- [15] T. van den Bosch *et al.*, « Higher Percentage of FISH-Determined Monosomy 3 and 8q Amplification in Uveal Melanoma Cells relate to Poor Patient Prognosis », *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 53, n° 6, p. 2668-2674, mai 2012, doi: 10.1167/jovs.11-8697.
- [16] N. Cassoux *et al.*, « Genome-wide profiling is a clinically relevant and affordable prognostic test in posterior uveal melanoma », *Br J Ophthalmol*, vol. 98, n° 6, p. 769-774, juin 2014, doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-303867.
- [17] B. Royer-Bertrand *et al.*, « Comprehensive Genetic Landscape of Uveal Melanoma by Whole-Genome Sequencing », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 99, n° 5, p. 1190-1198, nov. 2016, doi: 10.1016/j.ajhg.2016.09.008.
- [18] A. G. Robertson *et al.*, « Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma », *Cancer Cell*, vol. 32, n° 2, p. 204-220.e15, 14 2017, doi: 10.1016/j.ccell.2017.07.003.
- [19] F. Némati *et al.*, « Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors », *Clin. Cancer Res.*, vol. 16, n° 8, p. 2352-2362, avr. 2010, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3066.
- [20] C. Laurent *et al.*, « Patient-derived xenografts recapitulate molecular features of human uveal melanomas », *Mol Oncol*, vol. 7, n° 3, p. 625-636, juin 2013, doi: 10.1016/j.molonc.2013.02.004.
- [21] N. Amirouchene-Angelozzi *et al.*, « Establishment of novel cell lines recapitulating the genetic landscape of uveal melanoma and preclinical validation of mTOR as a therapeutic target », *Mol Oncol*, vol. 8, n° 8, p. 1508-1520, déc. 2014, doi: 10.1016/j.molonc.2014.06.004.
- [22] R. Crépin *et al.*, « Nanobodies against surface biomarkers enable the analysis of tumor genetic heterogeneity in uveal melanoma patient-derived xenografts », *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 30, n° 3, p. 317-327, 2017, doi: 10.1111/pcmr.12577.
- [23] D. Tamborero *et al.*, « Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations », *Genome Med*, vol. 10, n° 1, p. 25, mars 2018, doi: 10.1186/s13073-018-0531-8.
- [24] C. Kopanos *et al.*, « VarSome: the human genomic variant search engine », *Bioinformatics*, vol. 35, n° 11, p. 1978-1980, juin 2019, doi: 10.1093/bioinformatics/bty897.
- [25] M. G. Field *et al.*, « PRAME as an independent biomarker for metastasis in uveal melanoma », *Clin Cancer Res*, vol. 22, n° 5, p. 1234-1242, mars 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2071.

- [26] C. Yang *et al.*, « Long noncoding RNA HAGLR acts as a microRNA-143-5p sponge to regulate epithelial-mesenchymal transition and metastatic potential in esophageal cancer by regulating LAMP3 », *FASEB J*, vol. 33, n° 9, p. 10490-10504, sept. 2019, doi: 10.1096/fj.201802543RR.
- [27] R. F. Gillespie *et al.*, « Retinoid Regulated Association of Transcriptional Coregulators and the Polycomb Group Protein SUZ12 with the Retinoic Acid Response Elements of Hoxa1, RAR β 2, and Cyp26A1 in F9 Embryonal Carcinoma Cells », *J Mol Biol*, vol. 372, n° 2, p. 298-316, sept. 2007, doi: 10.1016/j.jmb.2007.06.079.
- [28] M. Sauvageau *et al.*, « Multiple knockout mouse models reveal lincRNAs are required for life and brain development », *eLife*, vol. 2, déc. 2013, doi: 10.7554/eLife.01749.
- [29] U. Orfanelli, A.-K. Wenke, C. Doglioni, V. Russo, A. K. Bosserhoff, et G. Lavorgna, « Identification of novel sense and antisense transcription at the TRPM2 locus in cancer », *Cell Res*, vol. 18, n° 11, p. 1128-1140, nov. 2008, doi: 10.1038/cr.2008.296.
- [30] J. Xiao *et al.*, « Long noncoding RNA TRPM2-AS acts as a microRNA sponge of miR-612 to promote gastric cancer progression and radioresistance », *Oncogenesis*, vol. 9, n° 3, mars 2020, doi: 10.1038/s41389-020-0215-2.
- [31] M. Gillespie *et al.*, « The reactome pathway knowledgebase 2022 », *Nucleic Acids Research*, vol. 50, n° D1, p. D687-D692, janv. 2022, doi: 10.1093/nar/gkab1028.
- [32] E. T. Lam *et al.*, « Genome mapping on nanochannel arrays for structural variation analysis and sequence assembly », *Nat Biotechnol*, vol. 30, n° 8, p. 10.1038/nbt.2303, août 2012, doi: 10.1038/nbt.2303.
- [33] S. Chan *et al.*, « Structural Variation Detection and Analysis Using Bionano Optical Mapping », *Methods Mol Biol*, vol. 1833, p. 193-203, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-8666-8_16.
- [34] R. M'kacher *et al.*, « Telomere and Centromere Staining Followed by M-FISH Improves Diagnosis of Chromosomal Instability and Its Clinical Utility », *Genes (Basel)*, vol. 11, n° 5, avr. 2020, doi: 10.3390/genes11050475.
- [35] R. Kumar, G. Nagpal, V. Kumar, S. S. Usmani, P. Agrawal, et G. P. S. Raghava, « HumCFS: a database of fragile sites in human chromosomes », *BMC Genomics*, vol. 19, n° Suppl 9, p. 985, avr. 2019, doi: 10.1186/s12864-018-5330-5.
- [36] R. Holt *et al.*, « CNVs leading to fusion transcripts in individuals with autism spectrum disorder », *Eur J Hum Genet*, vol. 20, n° 11, p. 1141-1147, nov. 2012, doi: 10.1038/ejhg.2012.73.
- [37] K. G. Griewank *et al.*, « Genetic and Molecular Characterization of Uveal Melanoma Cell Lines », *Pigment Cell Melanoma Res*, vol. 25, n° 2, p. 182-187, mars 2012, doi: 10.1111/j.1755-148X.2012.00971.x.
- [38] M. J. Jager, J. A. B. Magner, B. R. Ksander, et S. R. Dubovy, « Uveal Melanoma Cell Lines: Where do they come from? (An American Ophthalmological Society Thesis) », *Trans Am Ophthalmol Soc*, vol. 114, p. T5, août 2016.
- [39] M. Kernaleguen *et al.*, « Whole-Genome Bisulfite Sequencing for the Analysis of Genome-Wide DNA Methylation and Hydroxymethylation Patterns at Single-Nucleotide Resolution », *Methods Mol Biol*, vol. 1767, p. 311-349, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-7774-1_18.
- [40] S. Tempel, « Using and understanding RepeatMasker », *Methods Mol Biol*, vol. 859, p. 29-51, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-603-6_2.
- [41] M. A. Gama-Sosa *et al.*, « The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. », *Nucleic Acids Res*, vol. 11, n° 19, p. 6883-6894, oct. 1983.
- [42] A. P. Feinberg et B. Vogelstein, « Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts », *Nature*, vol. 301, n° 5895, p. 89-92, janv. 1983, doi: 10.1038/301089a0.
- [43] N. Servant, N. Varoquaux, E. Heard, E. Barillot, et J.-P. Vert, « Effective normalization for copy number variation in Hi-C data », *BMC Bioinformatics*, vol. 19, sept. 2018, doi: 10.1186/s12859-018-2256-5.
- [44] E. Lieberman-Aiden *et al.*, « Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome », *Science*, vol. 326, n° 5950, p. 289-293, oct. 2009, doi: 10.1126/science.1181369.
- [45] J. R. Dixon *et al.*, « Integrative detection and analysis of structural variation in cancer genomes », *Nature Genetics*, vol. 50, n° 10, Art. n° 10, oct. 2018, doi: 10.1038/s41588-018-0195-8.
- [46] E. P. Nora *et al.*, « Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre », *Nature*, vol. 485, n° 7398, p. 381-385, avr. 2012, doi: 10.1038/nature11049.
- [47] G. Fudenberg, M. Imakaev, C. Lu, A. Goloborodko, N. Abdennur, et L. A. Mirny, « Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion », *Cell Rep*, vol. 15, n° 9, p. 2038-2049, mai 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.085.
- [48] S. S. P. Rao *et al.*, « Cohesin loss eliminates all loop domains », *Cell*, vol. 171, n° 2, p. 305-320.e24, oct. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.026.
- [49] E. Crane *et al.*, « Condensin-driven remodelling of X chromosome topology during dosage compensation », *Nature*, vol. 523, n° 7559, Art. n° 7559, juill. 2015, doi: 10.1038/nature14450.

- [50] E. S. M. Vos *et al.*, « Interplay between CTCF boundaries and a super enhancer controls cohesin extrusion trajectories and gene expression », *Molecular Cell*, vol. 81, n° 15, p. 3082-3095.e6, août 2021, doi: 10.1016/j.molcel.2021.06.008.
- [51] T. Schenk, S. Stengel, S. Goellner, D. Steinbach, et H. P. Saluz, « Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies », *Genes, Chromosomes and Cancer*, vol. 46, n° 9, p. 796-804, 2007, doi: <https://doi.org/10.1002/gcc.20465>.
- [52] M. G. Field *et al.*, « Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in Class 1 and Class 2 uveal melanomas », *Oncotarget*, vol. 7, n° 37, p. 59209-59219, juill. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10962.
- [53] I. Dunham *et al.*, « An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome », *Nature*, vol. 489, n° 7414, p. 57-74, sept. 2012, doi: 10.1038/nature11247.
- [54] C. A. Davis *et al.*, « The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update », *Nucleic Acids Res*, vol. 46, n° D1, p. D794-D801, janv. 2018, doi: 10.1093/nar/gkx1081.
- [55] R. Zhang, H.-X. Wu, M. Xu, et X. Xie, « KMT2A/C mutations function as a potential predictive biomarker for immunotherapy in solid tumors », *Biomark Res*, vol. 8, p. 71, déc. 2020, doi: 10.1186/s40364-020-00241-0.
- [56] Y. Liu *et al.*, « Systematic inference and comparison of multi-scale chromatin sub-compartments connects spatial organization to cell phenotypes », *Nat Commun*, vol. 12, n° 1, p. 2439, mai 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22666-3.
- [57] V. Petit *et al.*, « Optimization of tumor xenograft dissociation for the profiling of cell surface markers and nutrient transporters », *Lab Invest*, vol. 93, n° 5, p. 611-621, mai 2013, doi: 10.1038/labinvest.2013.44.
- [58] H. Feng et H. Wu, « Differential methylation analysis for bisulfite sequencing using DSS », *Quant Biol*, vol. 7, n° 4, p. 327-334, déc. 2019, doi: 10.1007/s40484-019-0183-8.
- [59] S. S. P. Rao *et al.*, « A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping », *Cell*, vol. 159, n° 7, p. 1665-1680, déc. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.11.021.
- [60] N. Servant *et al.*, « HiC-Pro: an optimized and flexible pipeline for Hi-C data processing », *Genome Biol*, vol. 16, p. 259, déc. 2015, doi: 10.1186/s13059-015-0831-x.
- [61] R. M'kacher *et al.*, « The Transition between Telomerase and ALT Mechanisms in Hodgkin Lymphoma and Its Predictive Value in Clinical Outcomes », *Cancers (Basel)*, vol. 10, n° 6, mai 2018, doi: 10.3390/cancers10060169.
- [62] R. M'kacher *et al.*, « New tool for biological dosimetry: reevaluation and automation of the gold standard method following telomere and centromere staining », *Mutat Res*, vol. 770, p. 45-53, déc. 2014, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.09.007.

Legends

Figure 1: Principal characteristics of MP41 and MP46 PDXs established from aggressive uveal melanomas. A) Clinical characteristics of UM cases. B) Main molecular characteristics of corresponding patient derived xenograft models established and characterized previously [21]. Mutational status was assessed with Sanger sequencing (*GNAQ/GNA11*, *BAP1*, *SF3B1*, *EIF1AX*), with Cytoscan HD microarrays for copy number analysis and BAP1 immunohistochemistry from FFPE tissue section.

Figure 2: Gene expression global overview. A) Principal component analysis of RNASeq of 6 normal choroidal melanocyte samples (blue), 4 preparations of MP41 UM cells (red) and 3 preparations of MP46 UM cells (green). B) Hierarchical clustering of same profiles. C) Differential gene expression analysis of MP41 vs NM and MP46 vs NM to identify genes with a Log2 fold change greater than 1.5 and a p-value lower than 0.05. D) Heatmap of commonly

regulated genes in MP41 vs NM and MP46 vs NM. E) 50 most highly regulated pathways by Reactome analysis of commonly regulated genes listed according the significance ($-\log_2(p\text{-value} + 1 \times 10^{-10})$).

Figure 3: DNA optical mapping and FISH analysis of MP41 and MP46. Circos plot of aberrations in A) MP41 and B) MP46. From the central to the periphery of the circos plot: whole genome view summarizes intra and inter chromosomal translocations (pink lines), copy number gains and losses listed on the first internal layer of the circos, and SVs (insertion, deletion inversion and duplication) are labelled as colored dots in the intermediate layer of the circos. Gene density, cytobands and chromosomes are composing the outer layers of the circos. C) Number of insertions, deletions, inversions and duplications and inter and inter translocations are detailed for MP41 and MP46 defined by Bionano optical mapping. Telomere and M-FISH from analysis of D) MP41 and E) MP46 are derived from two different FISH analyses. Upper left panels show telomere (red signal) and centromere (green signal) staining and counter labelled with DAPI (blue). Lower left panels show M-FISH analysis. Main panels correspond to the karyotype view.

Figure 4: Whole genome DNA methylation analysis of UM models and normal melanocytes. A) DNA methylation levels based on oxidative bisulfite DNA treatment followed by whole genome sequencing, is shown at CGI promoters, non-CGI promoters, non-promoters CGI, exons, introns, intergenic regions, and on repeats, in normal melanocytes, MP41 and MP46. B) Differentially Methylated Regions (DMRs) as hypo and hyper DMRs (H- and H+) in 300kb window in MP41 vs NM, MP46 vs NM. Commonly regulated DMR correspond to DMR identified in MP41 vs NM and MP46 vs NM comparisons. DMR were considered as commonly regulated where sharing the same variation (H- or H+) and when their coordinates were identical or overlapping. C) Percentage of CpG methylation in MP41, MP46 and NM in *BAP1* locus through UCSC Genome Browser is represented in yellow. CpG Island 129 overlaps the *BAP1/PHF7* promoter.

Figure 5: Compartments and TADs in NM and UM. A) Contacts maps derived from in situ Hi-C at the whole genome level for NM, MP41 and MP46. B) Histogram of compartment changes in NM, MP41 and MP46. A- and B-compartments identified at a 250kb resolution. C) Localization of inactivated (ABB) and activated (BAA) compartment in MP41, MP46 vs NM on a whole genome view. D) Integration of compartment changes and gene expression between NM, MP41 and MP46. E) Number and F) size of TADs in NM, MP41 and MP46.

Figure 6: Multiomics analysis of *PRAME* locus. A) Gene expression of *PRAME* and its neighbors as *BMS1P20*, *ZNF280B*, *ZNF280A* upstream genes and *POM121LP* downstream. RNAseq data of NM, MP41 and MP46 replicates (FPKM). B) UCSC Genome Browser view (hg19) of percentage of DNA methylation (golden bars). C) DNA contacts maps of NM, MP41 and MP46 at 5kb resolution in *PRAME* TAD (blue square). D) UCSC Genome Browser view of the *PRAME* locus showing DNA methylation, RNAseq (log2), H2Aub, H3K4me3, H3K27me3, H3K27Ac, CTCF and RefSeq genes.

Supplementary Figure 1: Localization of shared regulated genes in MP41 and MP46 vs NM. Localization of the 2334 upregulated genes and the 3066 down regulated genes are represented respectively in red and green on a chromosome view.

Supplementary Figure 2: Main regulated pathways from the regulated genes shared in MP41 and MP46 vs NM. Gene names are colored depending on their regulation: non-regulated gene are in white boxes, upregulated genes in red boxes and downregulated genes in green boxes. Light colors indicate a significant regulation in MP41 vs NM or in MP46 vs NM, and dark colors indicate a significant regulation observed in both comparisons. A) Cell cycle pathway (HSA04110, KEGG). B) Homologous recombination (HR) pathway (HSA03440, Kegg). C) Fanconi Anemia pathway (FA, HSA03460, Kegg). D) Non-homologous end joining pathway (NHEJ, HAS03450, Kegg). E) P53 signaling pathway (HSA04115, KEGG). F. Apoptosis pathway (HSA04115, KEGG).

Supplementary Figure 3: Telomere analysis of MP41, MP46 and normal fibroblasts. A) Telomere fluorescence intensities of the 3 models is function of cell area. B) Rate of telomere loss per chromosome in MP41, MP46 compared to controls. Yellow stars highlight telomere loss on 3 chromosomes of MP41. C) Frequency of telomere loss and deletion per chromosome in MP41 and MP46. D) Example of telomere defects as interstitial telomere observed on dicentric (6;8;17) in MP41, and on a derivative chr15. Telomere deletion on dic(14;16) , i8q, and chr6, and chr 14q are illustrated. E. A dic(1)t(1;11;6;8) and a ring chromosome probably coming from a breakpoint on 1q21 leading to a ring chromosome (r(dic(1;11;6;8))). F A ring chromosome in MP46 (r(21)).

Supplementary Figure 4: FISH analysis of chromosome 6 and 8 in MP41 model. A) Specific probes (Empire Genomic, USA) designed for the detection of 4 genes: *NCOA7* (orange), *RSPO3* (blue), *GPAT4* (green), and *POMK* (red). FISH probes are represented on the optical map showing the t(6;8) generated from the Bionano analysis. B) the presence of *RSPO3* and *NCOA7* in chromosome 6 without rearrangements (C) dic(6;8;17) showing the presence of *GPAT4* and

27

POMK genes in addition to *RSPO3* and *NCOA7* in the breakpoint of this aberration. (D) dic(6;8;16) showing the presence of *GPAT4* and *POMK* genes in addition to *RSPO3* and *NCOA7* (E) the i(8q) shows the presence of *GPAT4* and *NCOA7*. (F) dic(1;11;6;8) shows the insertion of the *GPAT4* and *NCOA7* in the breakpoint of this rearrangement (G) possible mechanisms in the formation of these rearrangements implicated chromosome 6 and 8.

Supplementary Figure 5: DNA optical mapping and multispectral FISH highlight chromosome aberrations and DNA rearrangements in UM models. A) Log2 ratio generated from Cytoscan HD microarrays of chr8 in UM models. B. Circos plot generated from DNA optical mapping illustrated main SVs as translocations. C. Telomere aberrations per chromosome on UM cell models as MP41, MP46 Mel202, MM66, OMM1, OMM2.3 and normal fibroblasts as controls. Main derivative and dicentric chromosomes of D) Mel202, E) MM66, F) OMM1, G) OMM2.3. FISH and TC pictures of derivative and dicentric chromosomes are presented. Blue triangles point small parts of a donor chromosome.

Supplementary Figure 6: Identification of *BAP1* deletion leading to *BAP1* loss of expression. Gene expression detection based on RNAseq analysis (FPKM counts) of A) *BAP1* and B) *PHF7* in NM, MP41 and MP46 samples. C) Targeted sequencing based on tilling amplicons (250bp) to characterize *BAP1* mutations in a series of 53 UM recently grafted for new UM PDX at Institut Curie. D) Detection of *BAP1/PHF7* promoter deletion in IGV. Blue track corresponds to NM sample, yellow track corresponds to MP41 and red track corresponds to MP46. Gray tracks correspond to new UM cases with a low coverage on *BAP1* promoter associated to a loss of *BAP1* protein expression assessed by IHC (E).

Supplementary Figure 7: Example of *BAP1* promoter deletion identified in clinical daily practice. A) Identification of *BAP1* promoter deletion (2.2kb) based on exome analysis. B. Validation of the loss of *BAP1* expression in nucleus by IHC. C. Confirmation of the deletion of *BAP1* promoter by long range PCR in MP46 and new patient's tumor.

Supplementary Figure 8: Comparison of WGS and Hi-C copy number profiles for MP41 and MP46. Two whole genome copy number views established with WGS (upper panel) or with Hi-C seq (lower panel) for A) MP41 and B) MP46. Copy number status as normal, gains and losses are shown respectively in green, red and blue.

Supplementary Figure 9: Effect on compartment interaction scores after different normalization methods applied to Hi-C data generated for MP41, MP46 and NM. Log2 Hi-C interaction scores are depicted across copy number status defined at a 250kb window resolution. Interactions score generated on A) raw data, or after B) ICE, C) CAIC and D) LOIC normalization. Per boxplot graph, each color corresponds to a specific copy number.

Supplementary Figure 10: Normalization of Hi-C Data and comparison of compartment interaction scores per type of compartment, and interaction score distribution per copy number status and number of A/B compartments. From each normalization methods of Hi-C data generated for MP41, MP46 and NM, interactions scores for all compartments were separated on upon A/B status, and undefined status. Log2 Hi-C interaction scores are depicted across copy number status defined at a 250kb window resolution. Interactions score from A) raw data, or after B) ICE, C) CAIC and D) LOIC normalization are compared for MP41, for MP46 and for NM. Per UM and NM panels, box plots and histograms show respectively compartment interaction scores and number of interactions. Green, blue and grey box plots and bars correspond respectively to euchromatin / A compartment, heterochromatin / B compartment, and not defined compartments.

Supplementary Figure 11: *PRAME* locus transcription factors (TF) upregulated in UM models. Hierarchical clustering of TF enriched at *PRAME* locus in ENCODE. Blue stars indicate significantly upregulated TFs in MP41 and in MP46 vs NM.

Table 1 : Top 50 of regulated genes in UM models vs NM. Gene are ranked according log 2 fold changes. A and B. Top 50 of over-expressed genes in MP41 and MP46 respectively. C and D Top 50 of down under-expressed genes in MP41 and MP46 respectively. Genes written in bold are regulated with the same variation in both comparisons. Genes written in red were previously identified in UM studies.

Supplementary Table 1: MP41 WGS analysis and list of SNV annotated

Supplementary Table 2: MP42 WGS analysis and list of SNV annotated

Supplementary Table 3: Somatic copy number alterations in UM models identified by WGS

Supplementary Table 4: Gene expression analysis between MP41 vs Normal Melanocytes (NM) and MP46 vs NM.

Supplementary Table 5: Number of genes in compartments. A: Euchromatin, B Heterochromatin; "AAA" letters correspond to A or B status in NM, MP41 and MP46 respectively.

Figure 1: Main characteristics of two PDXs established from aggressive uveal melanomas

A. Clinic features

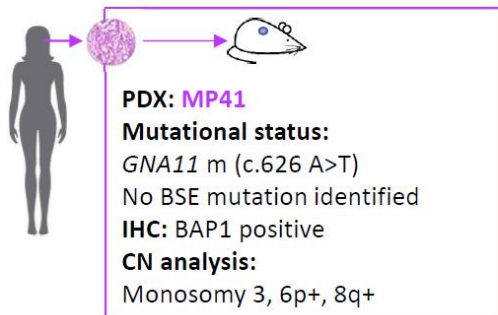
Patient #1 :

- ❑ Woman diagnosed with localized uveal melanoma at 50 y/o
- ❑ Treatment: enucleation
- ❑ Phenotype: epithelioid
- ❑ Die at 53y/o, due to bones, lung, and subcutaneous metastasis

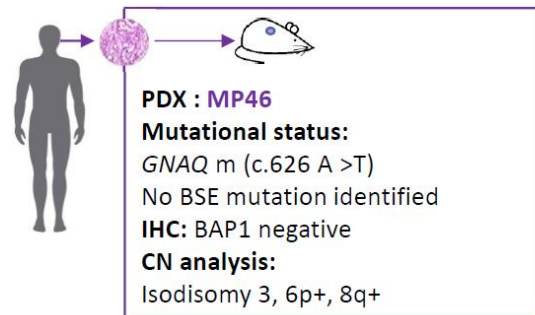
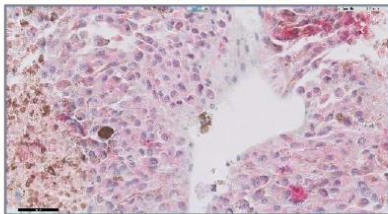
Patient #2 :

- ❑ Man diagnosed with localized uveal melanoma at 69y/o
- ❑ Treatment: enucleation
- ❑ Phenotype : epithelioid
- ❑ Die at 71y/o, due to liver metastasis

B. PDX characteristics



BAP1 IHC on MP41 (40x)



BAP1 IHC on MP46 (40x)

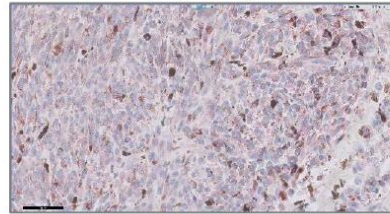


Figure 2: Gene expression global overview

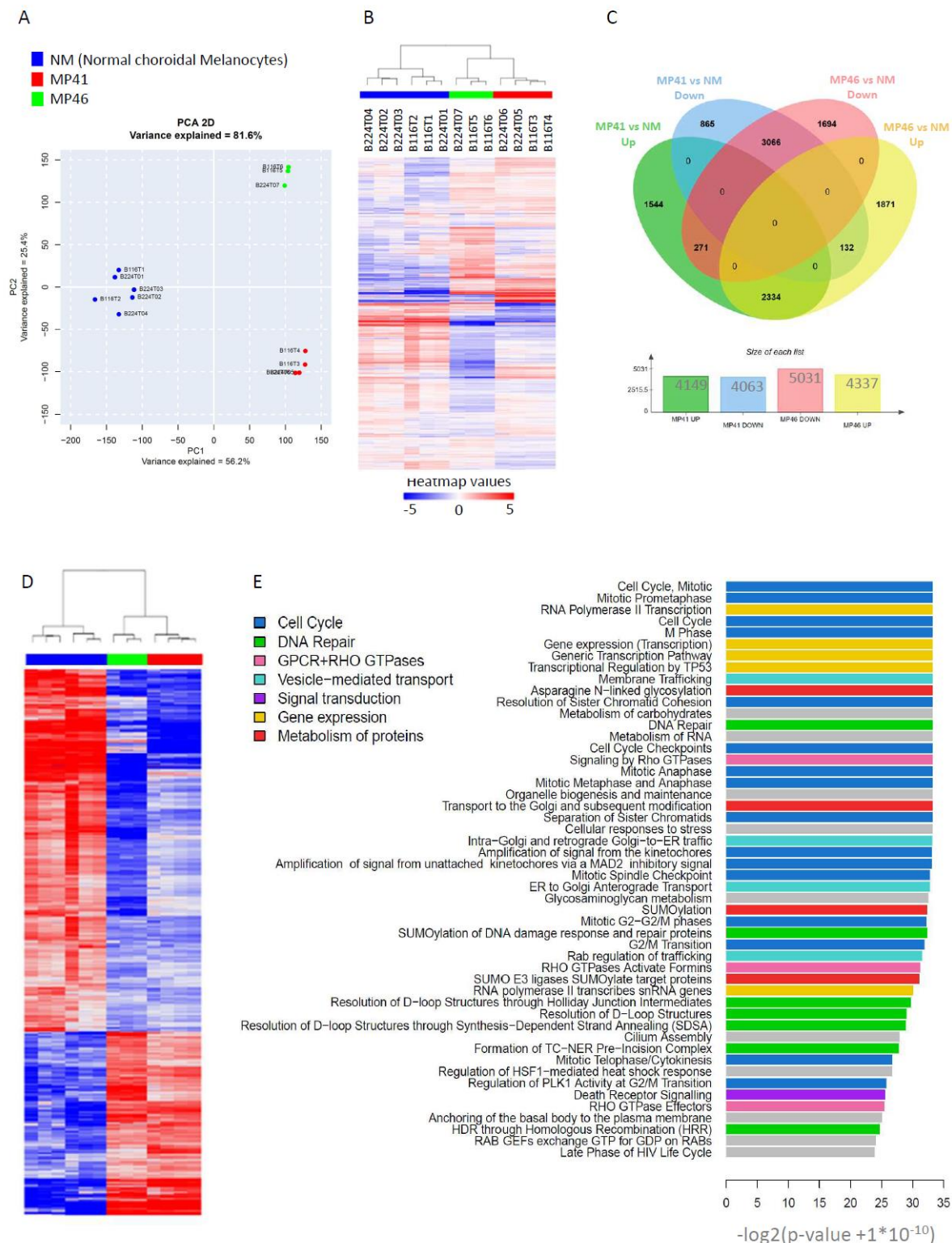


Figure 3: DNA optical mapping and FISH highlight chromosome aberrations and DNA rearrangements in MP41 and MP46.

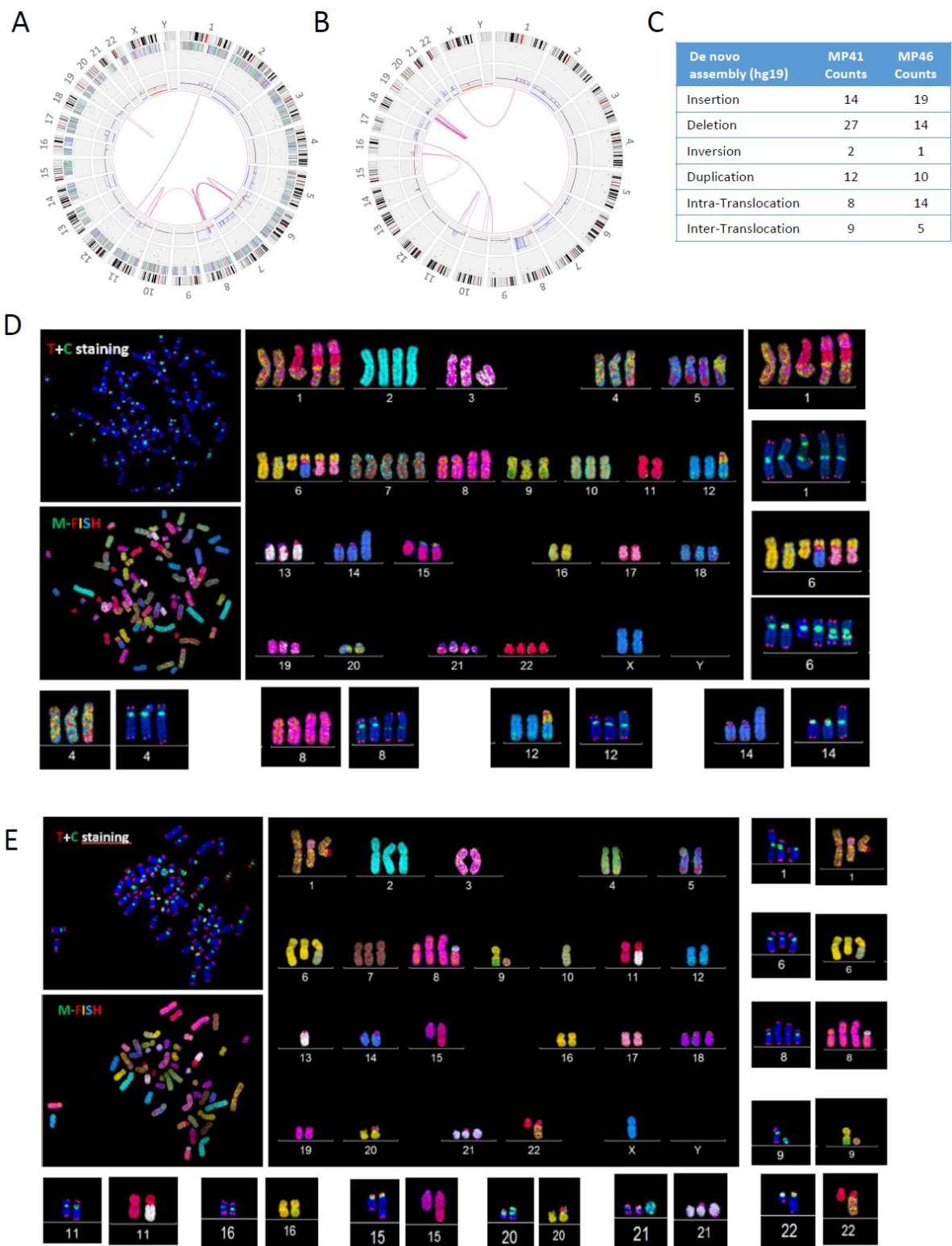


Figure 4: Whole genome DNA methylation reveals differences between UM models and Normal melanocytes

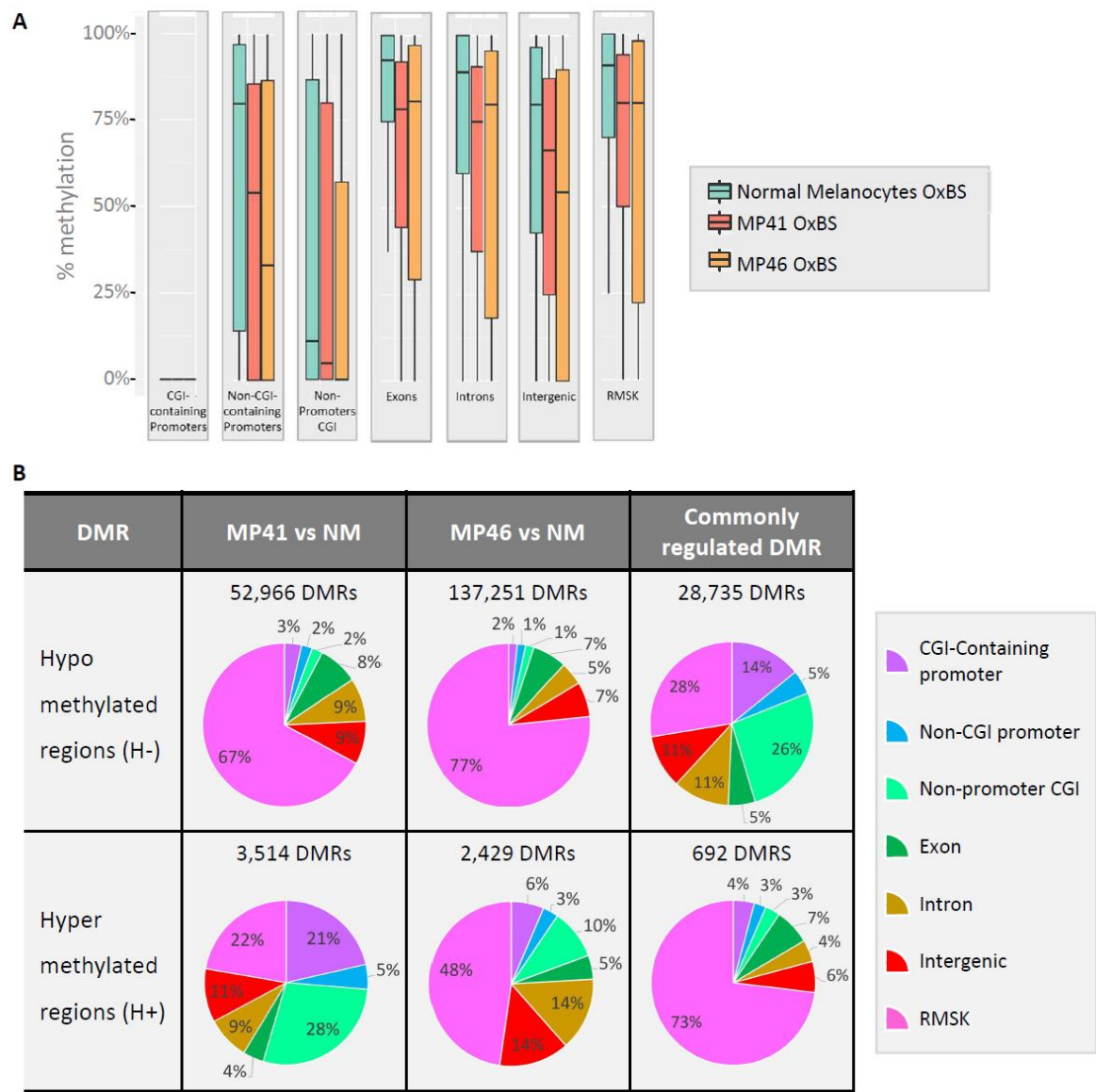


Figure 5 : Compartments and Topologically Associated Domains (TAD) in normal melanocytes and uveal melanoma models

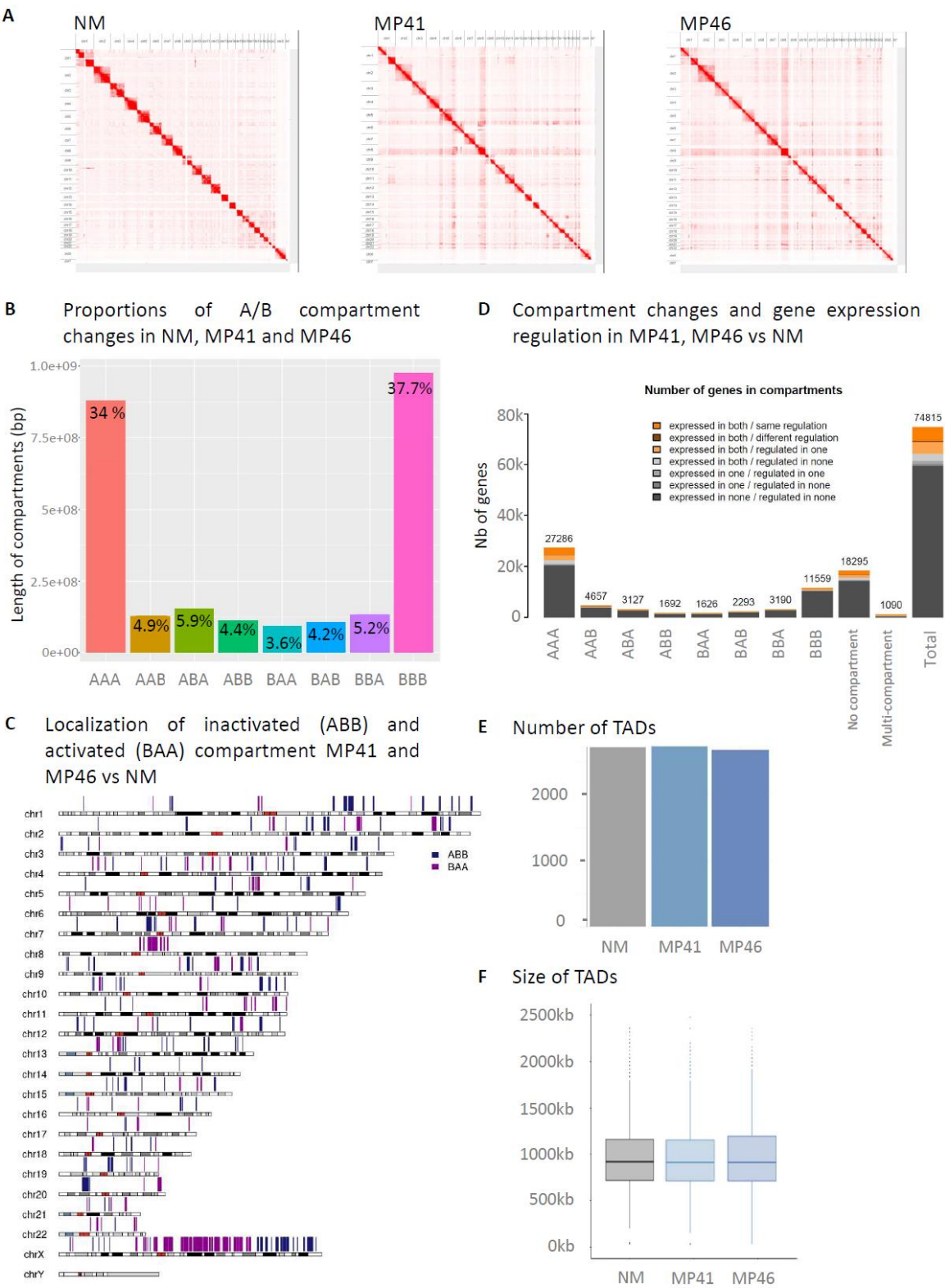
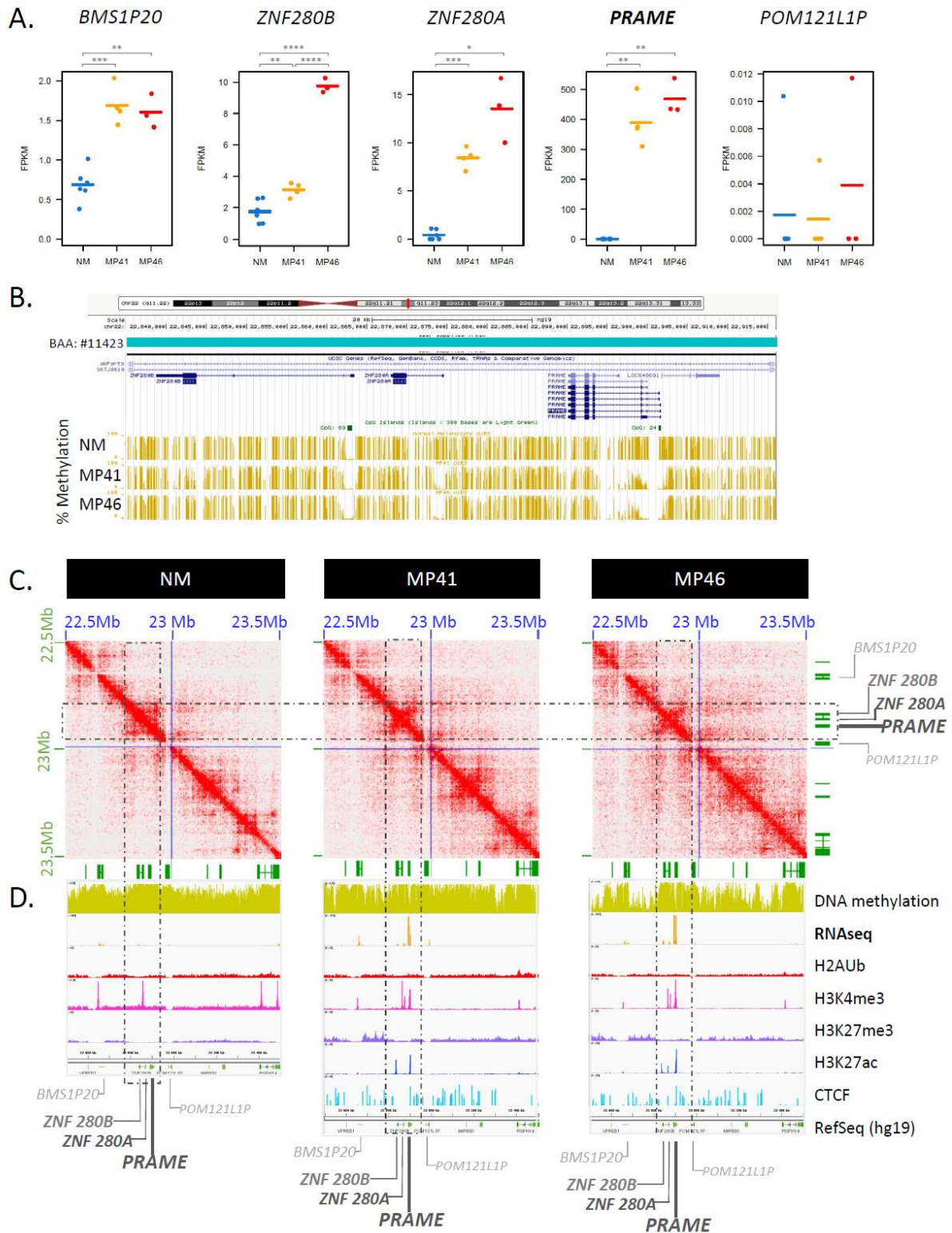
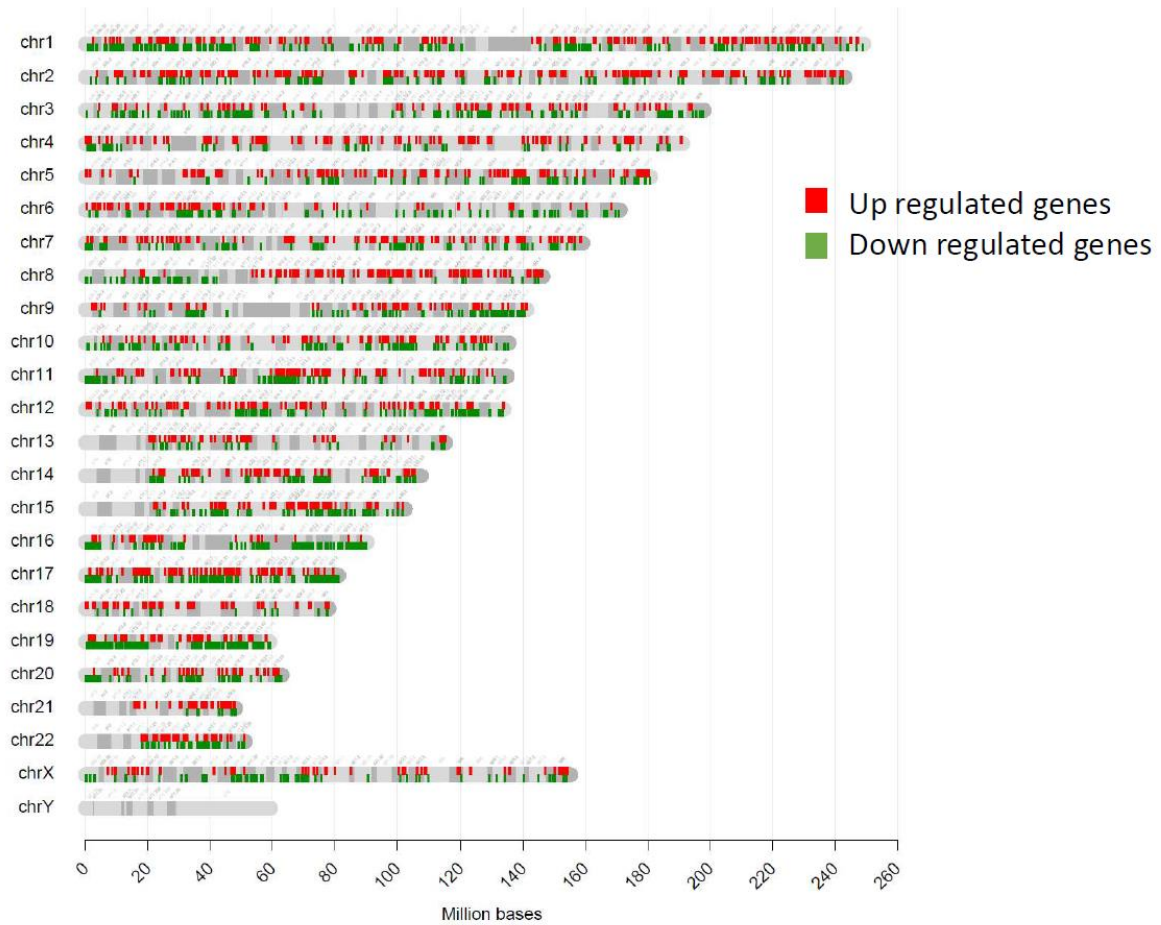


Figure 6: Multiomics analysis revealed a specific *Prame* activation pattern

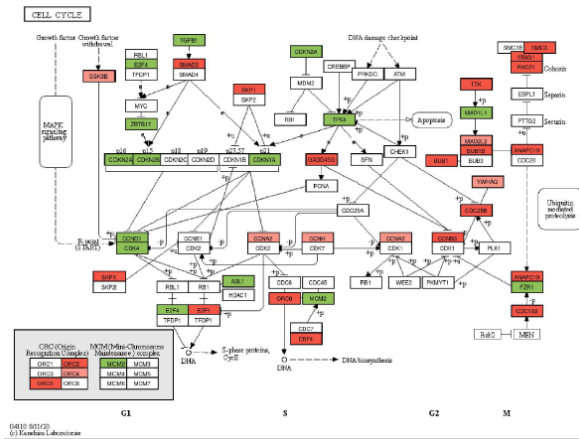


Supplementary Figure 1: Localization of shared regulated genes in MP41 and MP46 vs NM



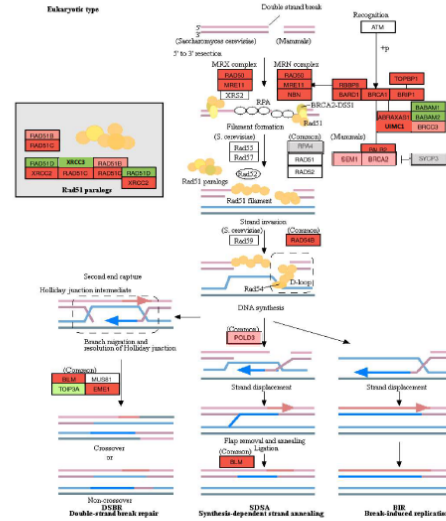
Supplementary Figure 2: Main regulated pathways from the regulated genes shared in MP41 and MP46 vs NM

A. Cell cycle (HSA04110, KEGG)



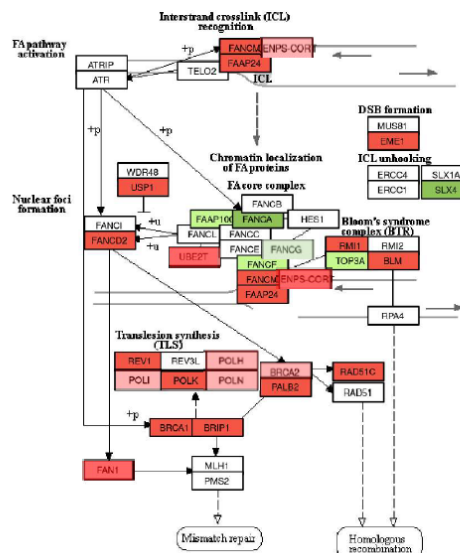
43 regulated genes out of 124 genes in the Cell cycle pathway, min p-value: 5.30×10^{-07} (28 Up & 15 Down)

B. Homologous recombination (HSA03440, KEGG)



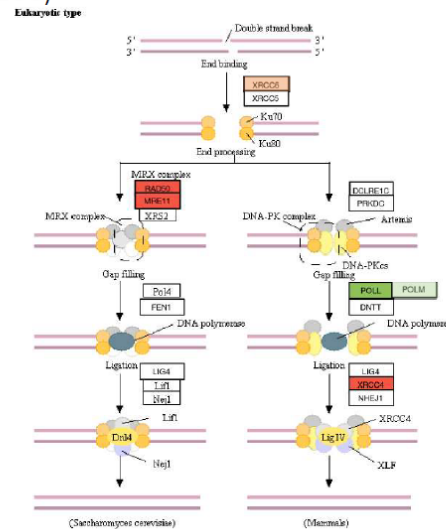
21 regulated genes out of 41 genes in the Homologous recombination pathway, min p-value: 5.99×10^{-09} (17 Up & 4 Down)

C. Fanconi Anemia (HSA03460, KEGG)



19 regulated genes out of 54 genes in the FA pathway, min p-value: 2.94×10^{-4} (13 Up & 6 Down)

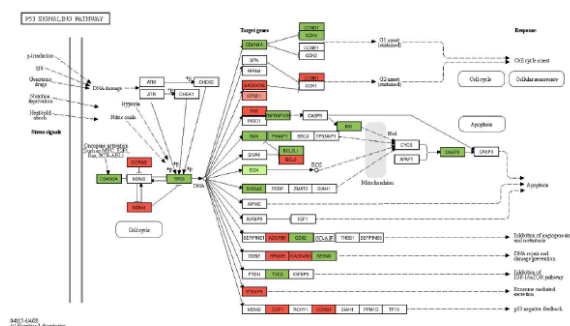
D. Non-Homologous End-Joining (HSA 03450, KEGG)



4 regulated genes out of 13 genes in the NHEJ pathway, min p-value: 8.22×10^{-2} (3 Up & 1 Down)

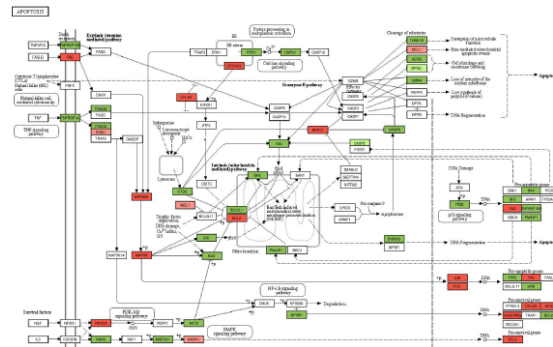
Supplementary Figure 2: Main regulated pathways from the regulated genes shared in MP41 and MP46 vs NM

E. p53 signaling pathway (HSA04115, KEGG)



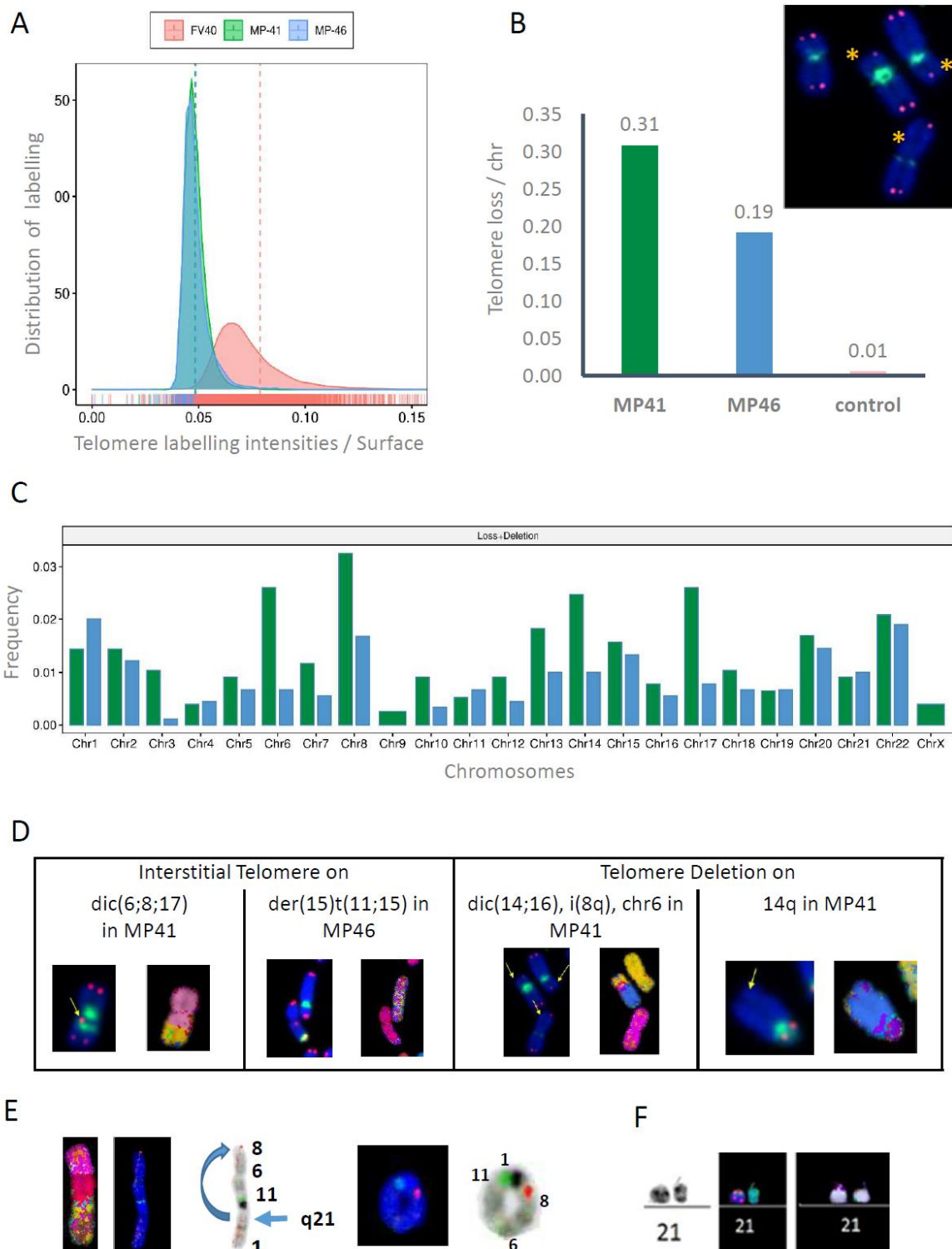
32 regulated genes out of 72 genes in the p53 signaling pathway, min p-value: 1.18×10^{-6} (14 Up & 18 Down).

F. Apoptosis pathway (HSA04210, KEGG)



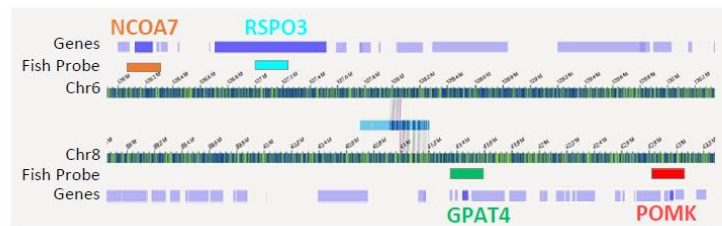
52 regulated genes out of 136 genes in the apoptosis pathway, min p-value: 2.47×10^{-7} (20 Up & 32 Down)

Supplementary Figure 3: Evaluation of telomere instability based on T/C + M-FISH analysis.

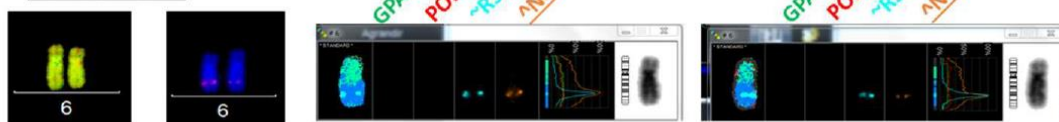


Supplementary Figure 4: FISH analysis of chromosome 6 and 8 in MP41 model.

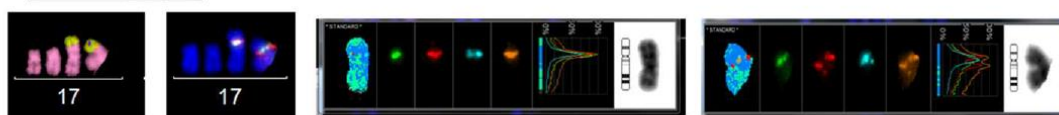
A Custom FISH probes



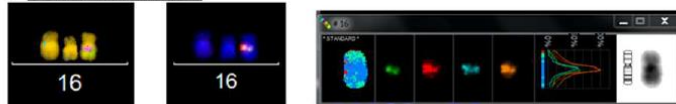
B Chromosome 6



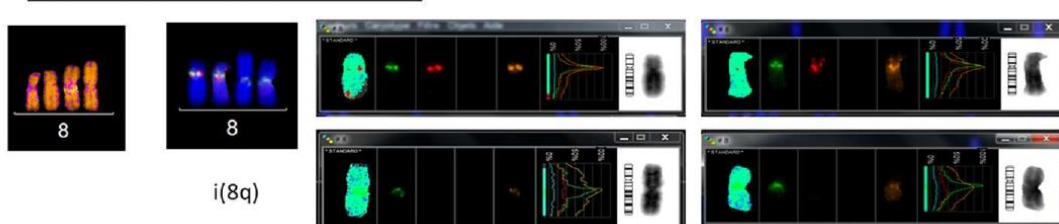
C Dicentric (6;8;17)



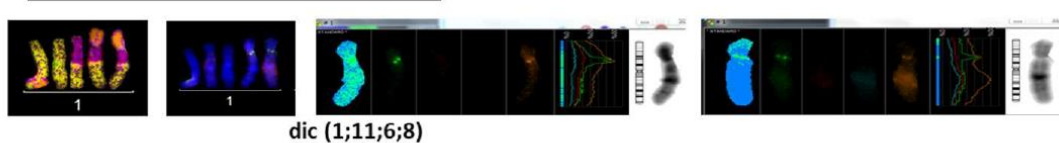
D Dicentric (6;8;16)



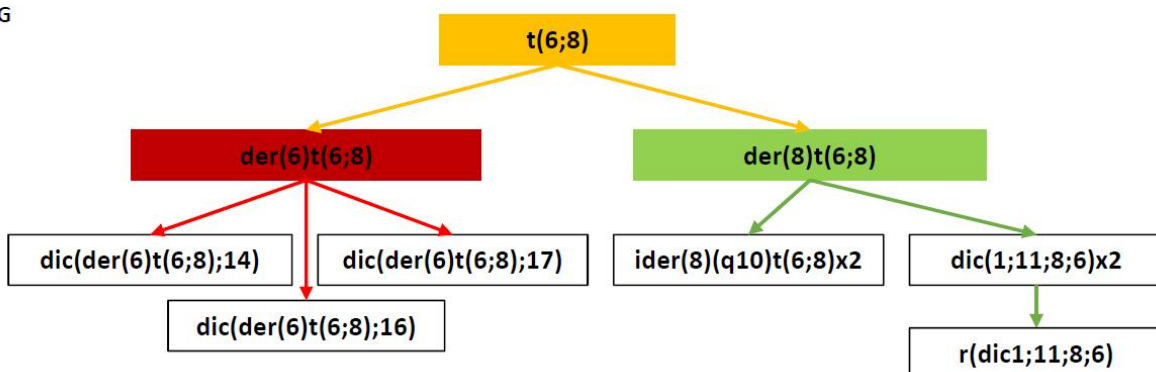
E Chromosome 8 and isochromosome 8q



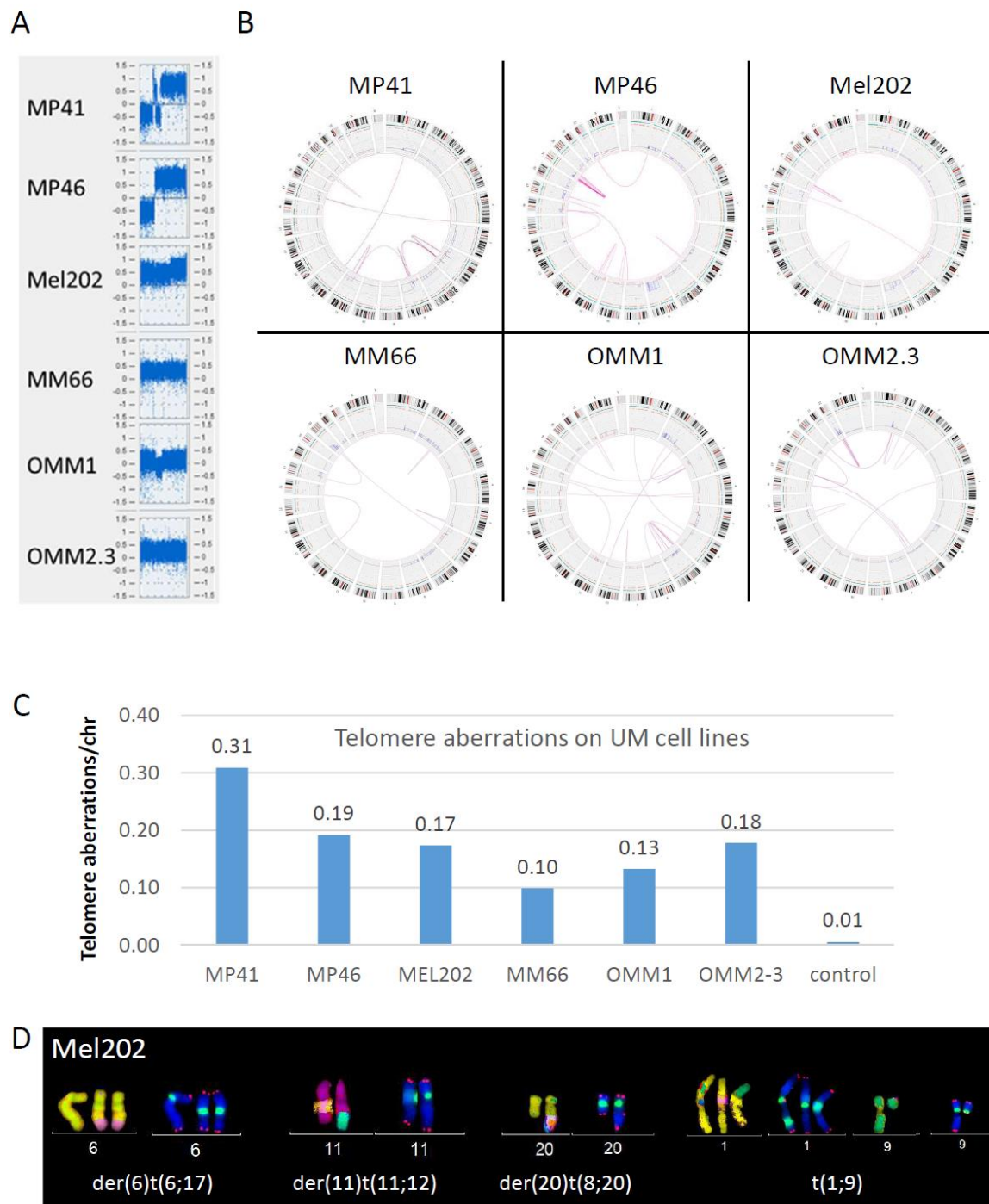
F Chromosome 1 : dicentric chromosome 1



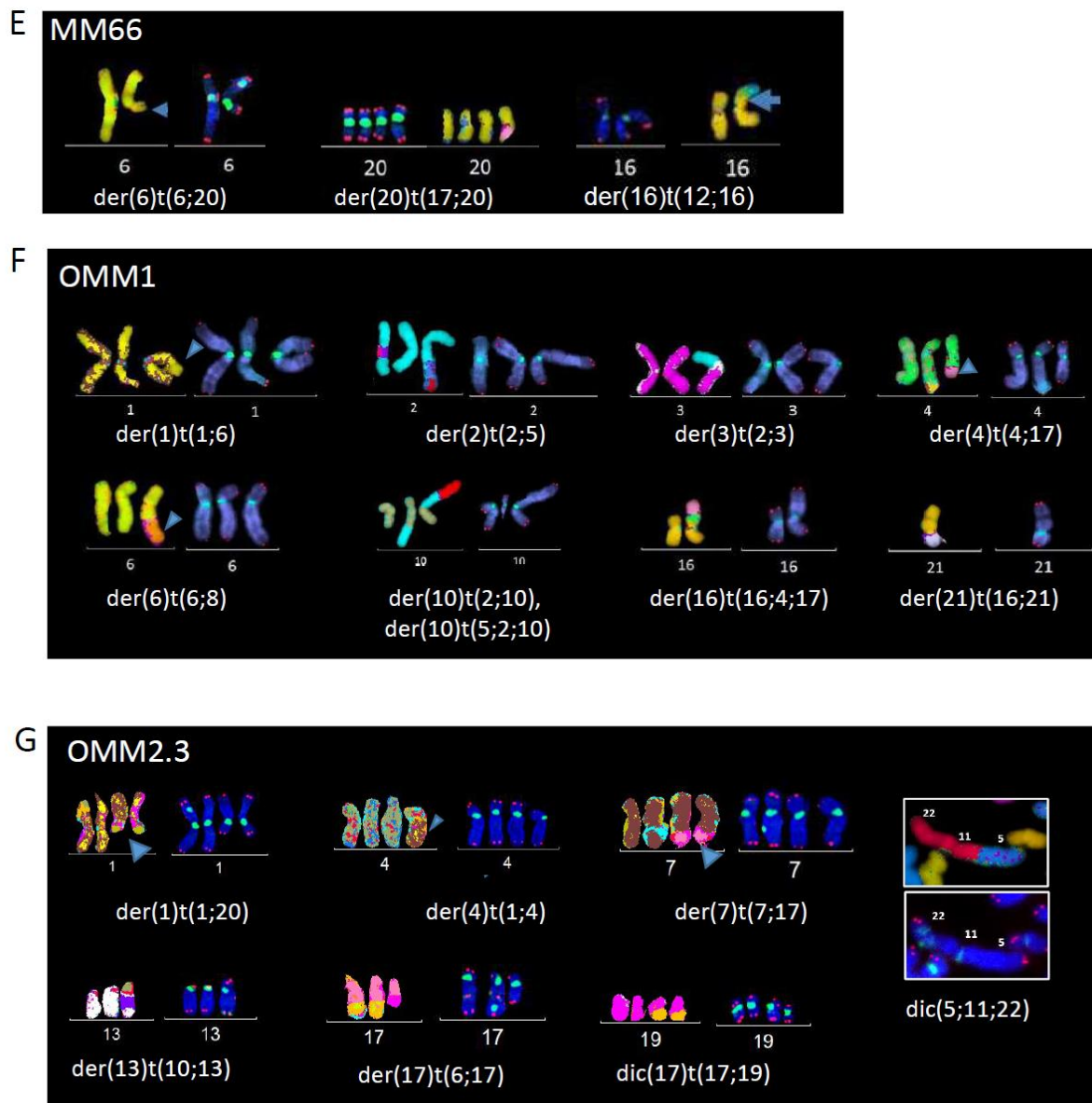
G



Supplementary Figure 5: DNA optical mapping and multispectral FISH in UM models

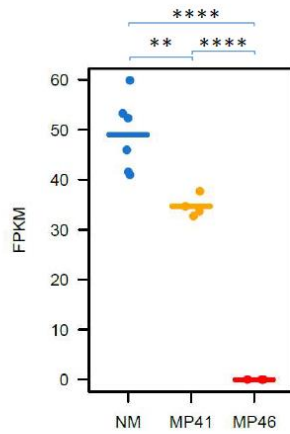


Supplementary figure 5: DNA optical mapping and multispectral FISH in UM models

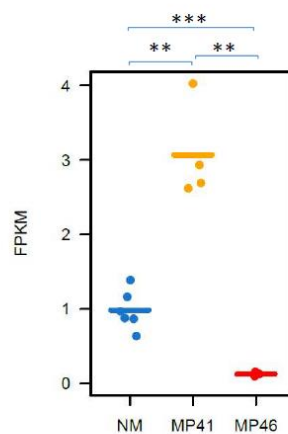


Supplementary Figure 6: identification of *BAP1* deletion leading to BAP1 loss of expression

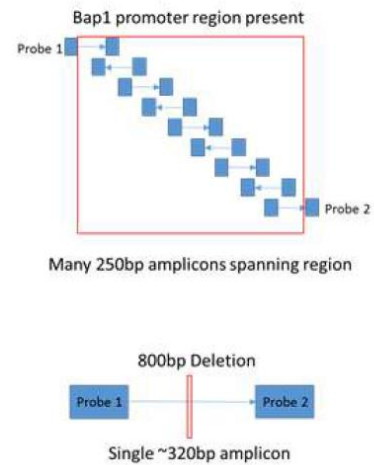
A. *BAP1* gene expression



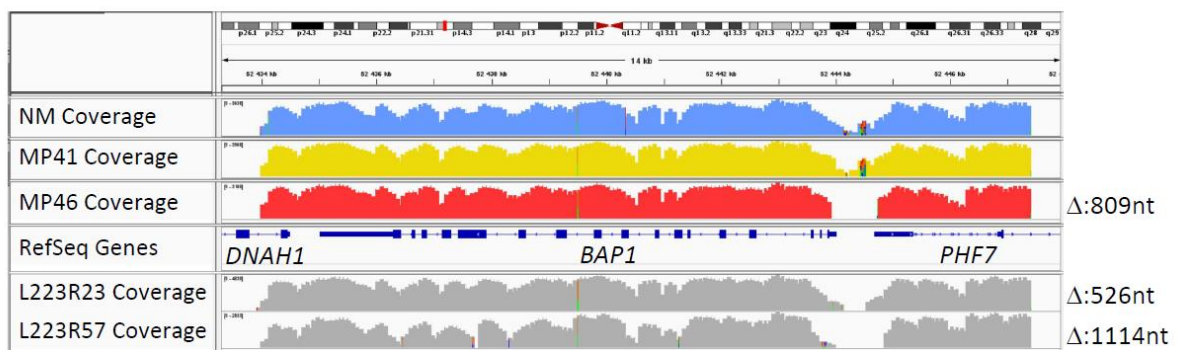
B. *PHF7* gene expression



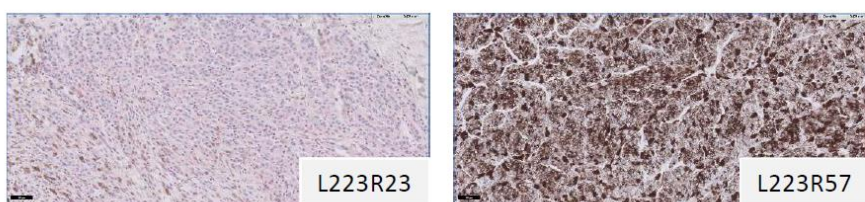
C. *BAP1* amplicon sequencing



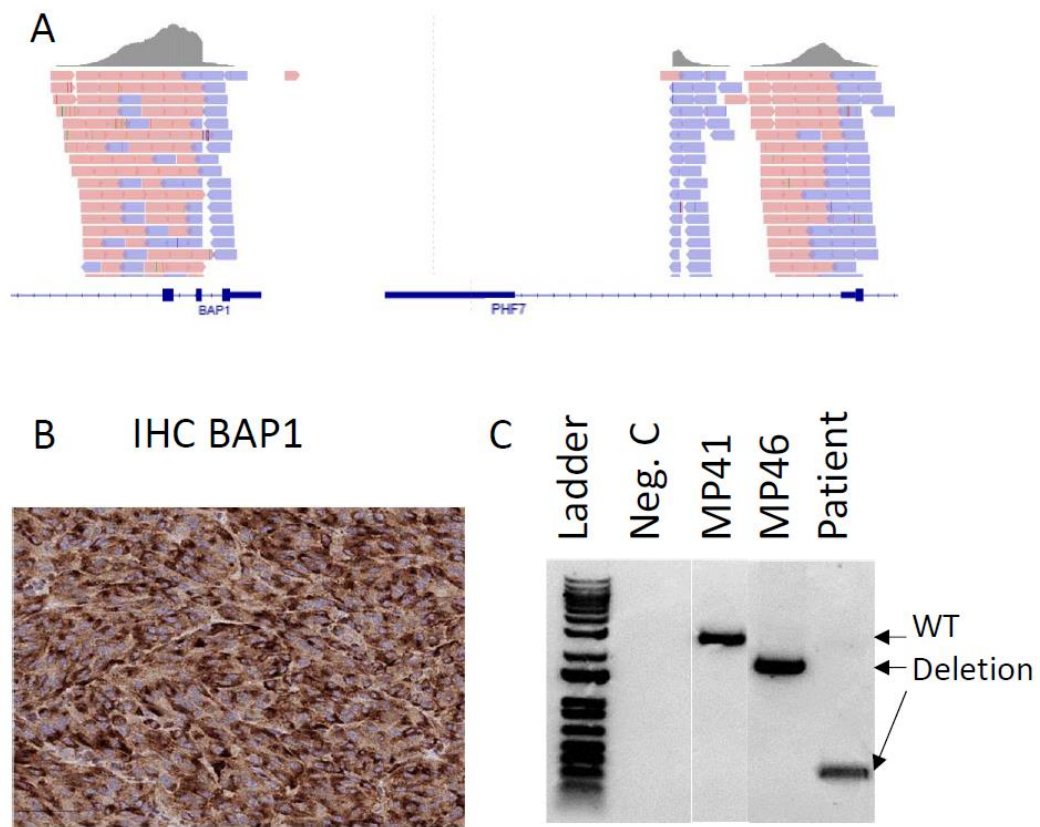
D. *BAP1* targeted DNA sequencing



E. *BAP1* IHC (40X)

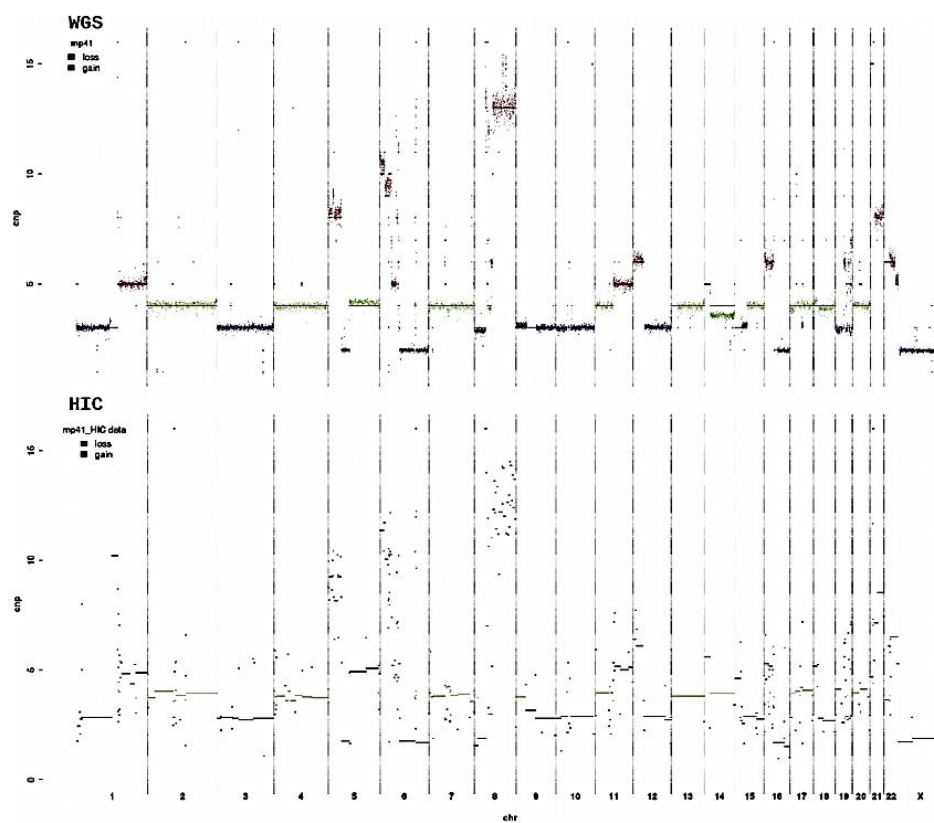


Supplementary Figure 7: Example of *BAP1* promoter deletion identified in clinical daily practice

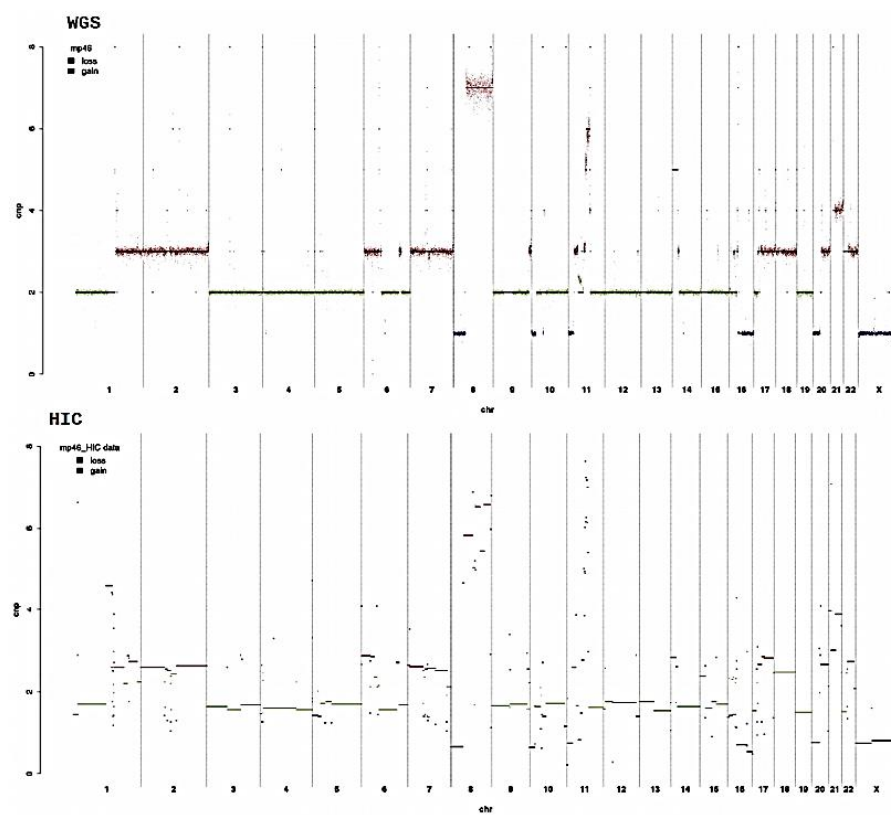


Supplementary Figure 8: Comparison of WGS and Hi-C copy number analysis for MP41 and MP46.

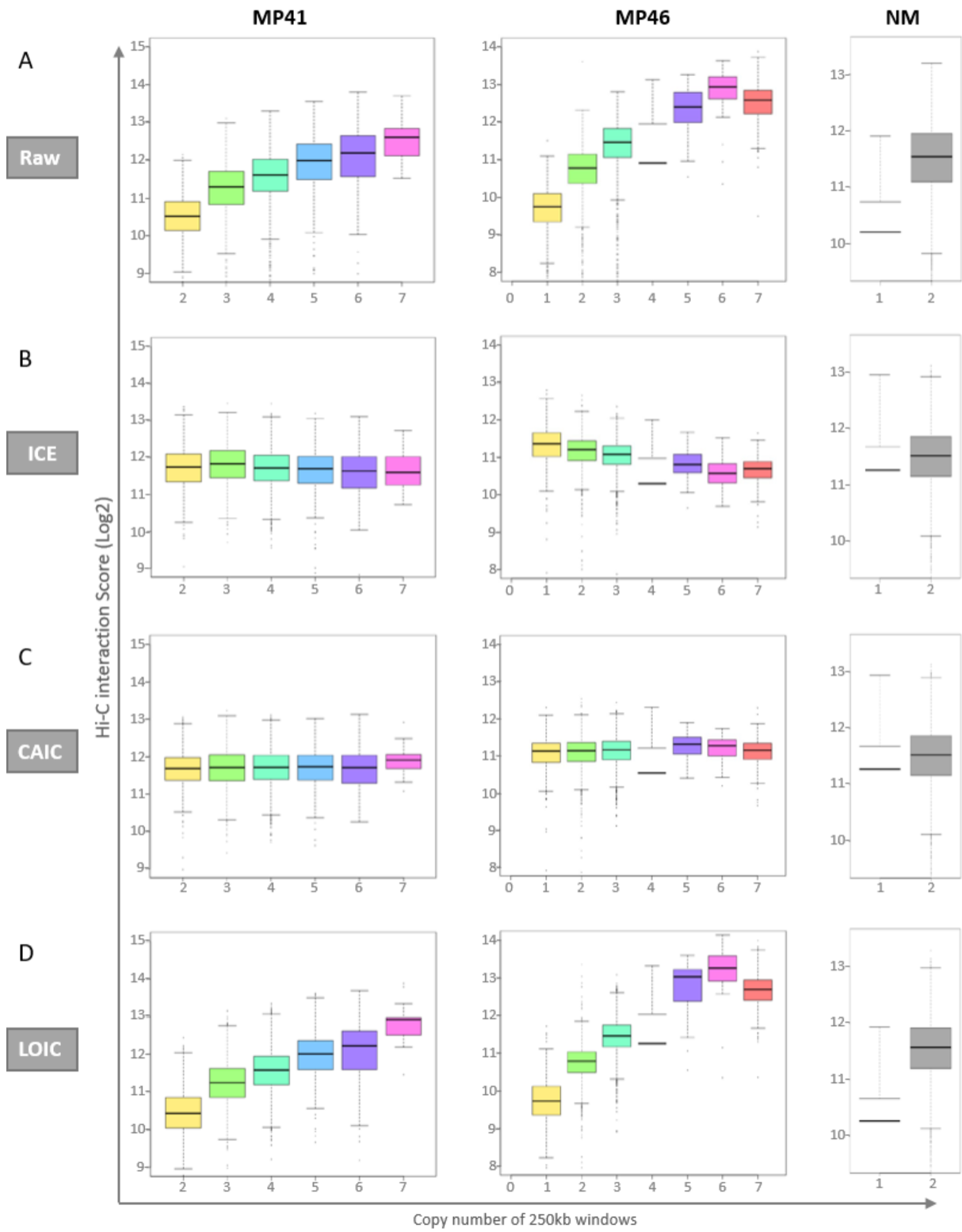
A



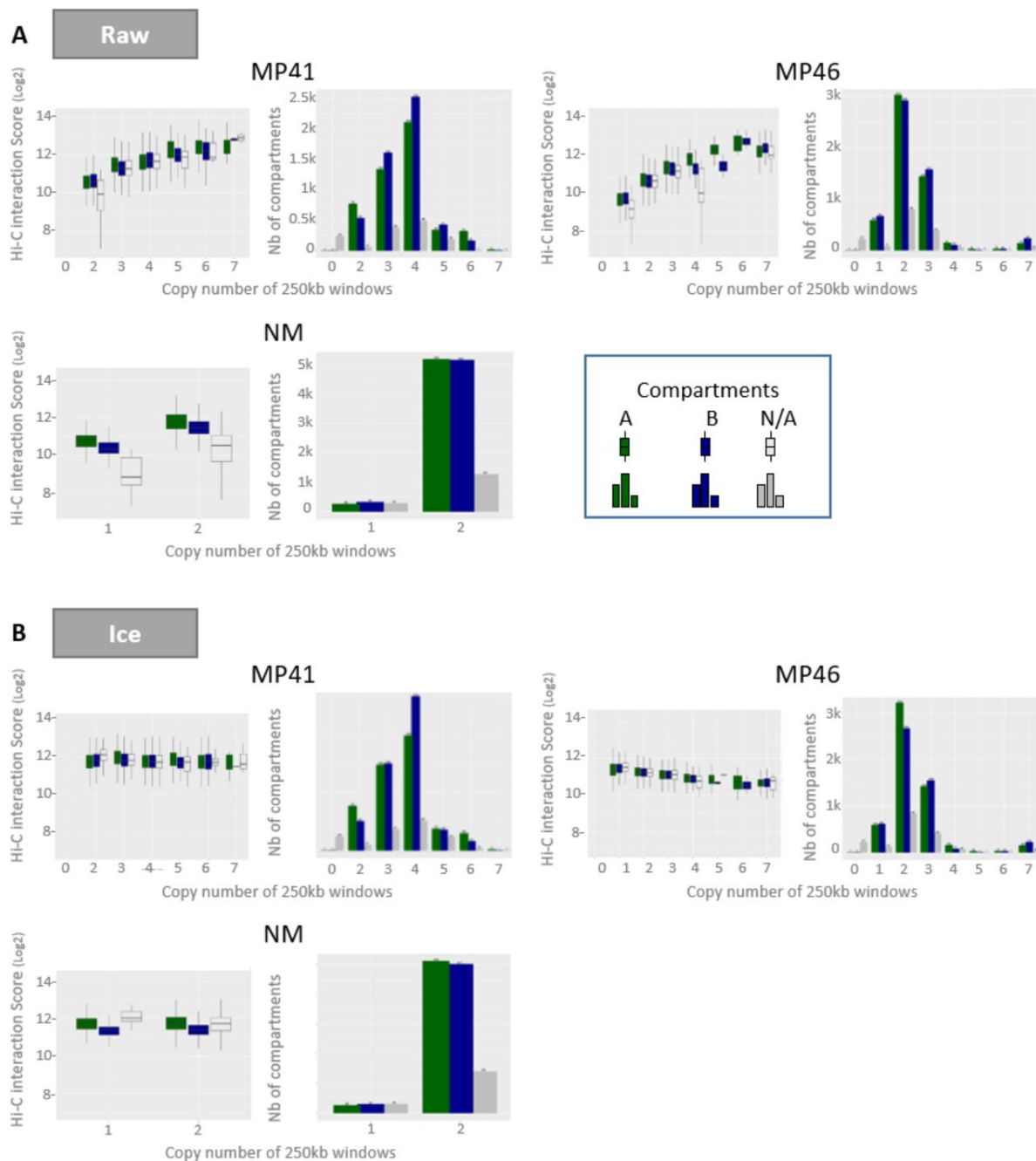
B



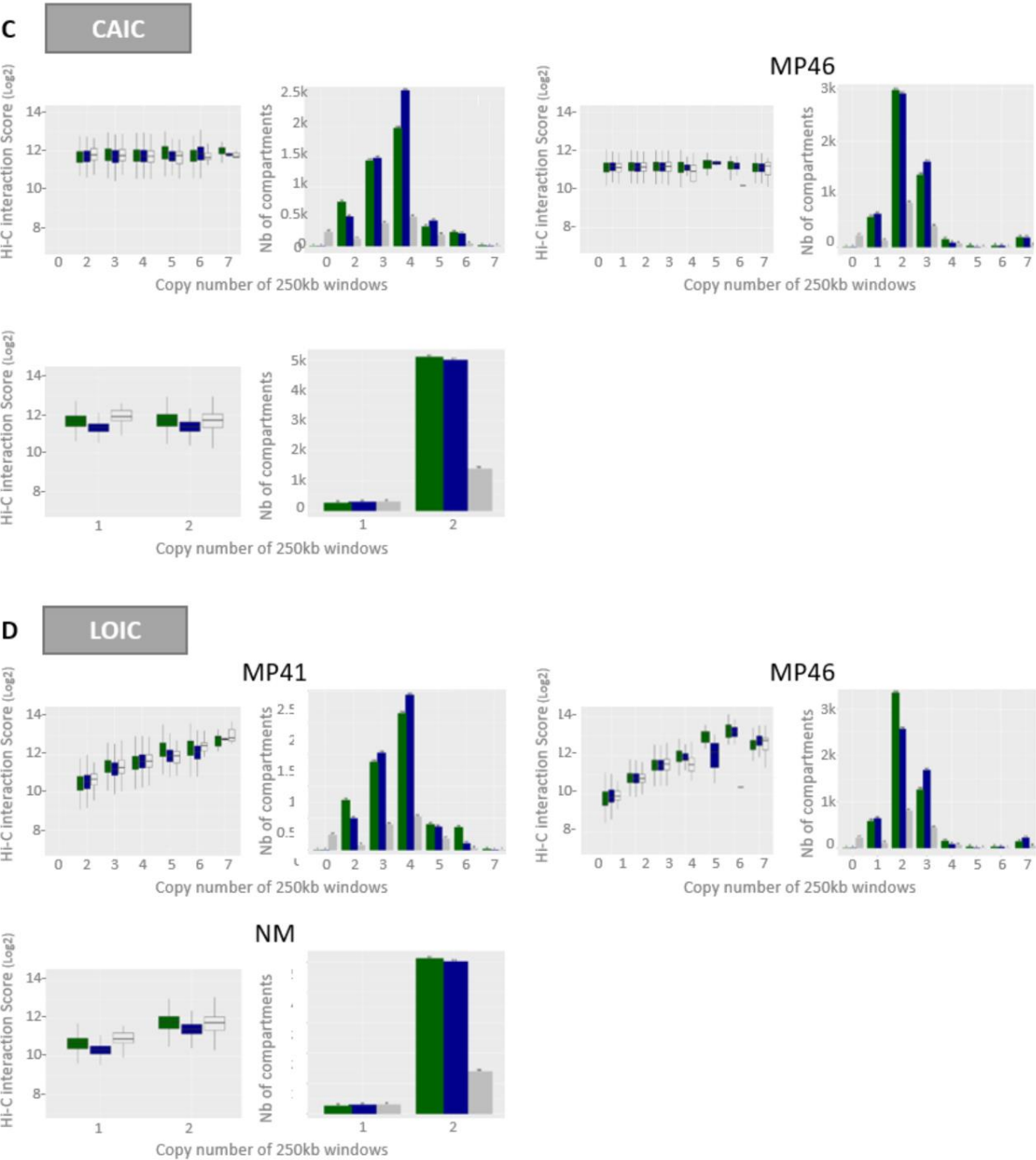
Supplementary Figure 9: Effect on compartment interaction scores after different normalization methods applied on Hi-C data generated for MP41, MP46 and NM.



Supplementary Figure 10: Euchromatin and Heterochromatin compartments remain stable after CAIC normalization



Supplementary Figure 10: Euchromatin and Heterochromatin compartments remain stable after CAIC normalization



Supplementary Figure 11: Prame transcription factors upregulated in UM models vs NM

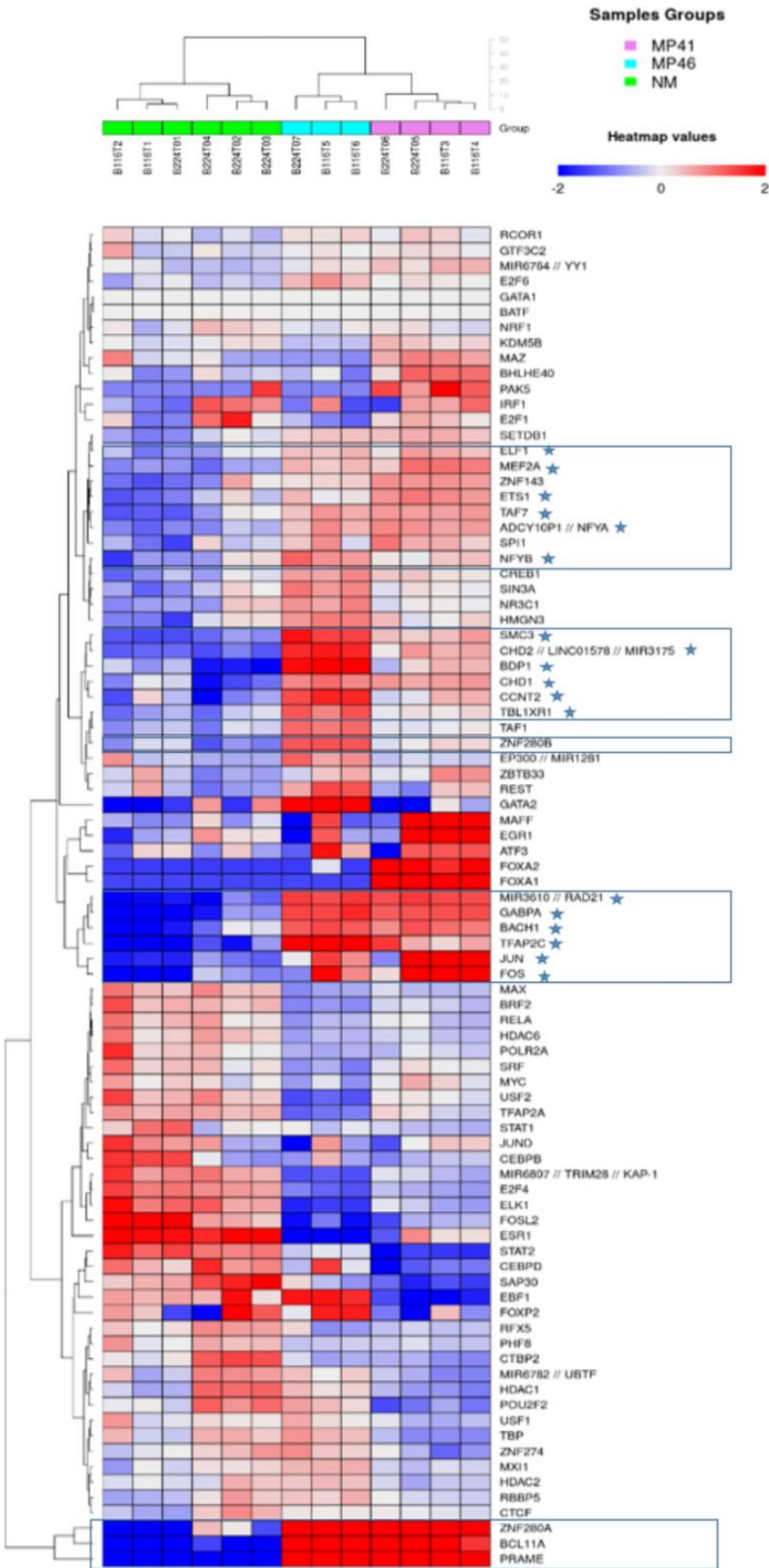


Table1 : Top 50 of regulated genes in UM models vs NM

Most regulated genes shared in the comparisons of MP41 vs Nm and MP46 vs NM are listed in 4 sub-tables. Gene are ranked according log 2 fold changes. A and B lists are the top 50 of regulated genes in MP41 vs NM and in MP46 vs NM. C and D tables are the top 30 of down regulated genes in MP41 vs Nm and MP46 vs NM. Genes written in bold are regulated with the same variation in both comparisons. Genes written in red were previously identified in UM studies.

A. Up regulated genes in MP41

Gene name	Ranked Log2FC in MP41	MP41 vs. NM: Log2FC	MP41 vs. NM: padj
HAGLR	1	12.16	2.44E-63
TRPM2-AS	2	12.12	9.08E-29
PRAME	3	12.11	3.78E-138
MT1M	4	11.7	1.77E-25
ASB11	5	11.24	5.77E-55
KLHL30	6	10.73	8.10E-118
NRN1	7	10.56	2.21E-19
TRPM2	8	10.44	5.56E-16
CCSER1	9	9.98	9.12E-53
RASGRP3	10	9.96	1.95E-77
HIF3A	11	9.46	1.41E-57
HOKA9 // HOKA10	12	9.45	2.59E-87
PAQR5	13	9.38	7.74E-33
LMX1B	14	9.31	3.28E-30
HOKA11	15	9.29	8.02E-38
EPHA4	16	9.04	7.55E-124
HOKA4 // HOKC5 // HOKC6	17	8.91	1.65E-09
IGLL3P	18	8.79	4.08E-24
LINC00482	19	8.6	2.51E-103
PGAM2	20	8.6	3.28E-182
PLCB4	21	8.59	1.43E-13
PNLDC1	22	8.56	1.19E-99
MAL2	23	8.43	3.04E-24
TTC39A	24	8.17	1.72E-164
SERPINB9P1	25	8.01	1.98E-65
RBP7	26	7.96	5.93E-21
LINC01531	27	7.77	5.71E-106
RAPGEF4	28	7.71	3.11E-39
SCIN	29	7.67	2.26E-82
TIAM2	30	7.64	1.21E-45
KIF17	31	7.6	3.03E-190
CACNA2D2	32	7.58	6.51E-70
EPHA8	33	7.51	6.15E-53
TWIST1	34	7.46	2.18E-48
LRRN2	35	7.12	1.89E-38
ENO3	36	7.04	0.00E+00
PITX2	37	6.82	5.05E-19
CYP26B1	38	6.79	1.94E-35
ITGB2	39	6.67	7.50E-31
GGT1	40	6.62	4.70E-89
SIX4	41	6.6	3.65E-33
VAMPB8	42	6.58	7.33E-112
LTK	43	6.57	1.09E-19
GABRA3	44	6.56	2.94E-05
HIST1H2BC	45	6.47	8.04E-43
CHST9	46	6.47	1.11E-143
MGAT4A	47	6.38	3.23E-44
ART5	48	6.27	2.90E-97
WDFC1	49	6.21	5.25E-15
HAS2	50	6.17	5.40E-44

B. Up regulated genes in MP46

Gene name	Ranked Log2FC in MP46	MP46 vs. NM: Log2FC	MP46 vs. NM: padj
HAGLR	1	12.48	3.56E-62
PRAME	2	11.92	1.46E-113
HOKA9 // HOKA10	3	10.85	9.40E-108
RASGRP3	4	10.84	5.23E-77
MAL2	5	10.6	2.43E-32
ASB11	6	10.59	3.51E-47
PLCB4	7	10.28	3.01E-16
KLHL30	8	10.16	9.85E-100
HOKA11	9	10.1	5.99E-42
CCSER1	10	9.74	1.10E-48
LINC01531	11	9.65	9.41E-141
IGLL3P	12	9.59	7.85E-26
TKTL1	13	9.43	1.60E-34
TRPM2-AS	14	9.33	3.29E-47
RAPGEF4	15	9.09	5.34E-46
MT1M	16	8.93	6.35E-15
CYP26B1	17	8.34	3.88E-49
EPHA4	18	8.1	5.07E-90
LMX1B	19	8.09	2.54E-22
TWIST1	20	8.01	1.59E-52
HOKC4 // HOKC5 // HOKC6	21	7.75	1.82E-06
TRPM2	22	7.73	5.83E-08
NRN1	23	7.68	3.35E-09
EPHA8	24	7.52	1.83E-48
HIF3A	25	7.48	1.31E-34
TTC39A	26	7.42	2.68E-120
ITGB2	27	7.37	5.36E-32
LRRC39	28	7.25	1.86E-80
PAQR5	29	7.14	7.21E-19
PITX2	30	6.89	1.88E-16
AFON	31	6.78	2.02E-32
SERPINB9P1	32	6.69	2.66E-41
LTK	33	6.55	1.25E-16
TEX14	34	6.5	1.05E-84
STUM	35	6.45	3.56E-19
LINC00482	36	6.4	1.90E-49
KCNE3	37	6.32	1.47E-20
HAS2	38	6.32	8.15E-39
SLC9A3	39	6.29	2.91E-50
RERE3	40	6.27	7.93E-05
GABRA3	41	6.21	2.80E-04
PNLDC1	42	6.2	2.55E-46
CACNA2D2	43	6.09	1.45E-38
IGFBPL1	44	5.95	4.69E-43
PNMA3	45	5.93	7.32E-70
LRRN2	46	5.93	1.01E-22
FAM174B	47	5.8	1.45E-26
TMEM200C	48	5.78	7.37E-04
AMN	49	5.72	2.49E-44
MGAT4A	50	5.71	7.25E-30

C. Down regulated genes in MP41

Gene name	Ranked Log2FC	MP41 vs. NM: Log2FC	MP41 vs. NM: padj
CYBRD1	1	-11.6	3.65E-87
LEF1	2	-11.11	6.43E-60
GPR173	3	-11	1.76E-34
CPQ	4	-10.8	2.38E-135
NLGN1	5	-10.62	7.67E-21
DPG6	6	-10.15	2.66E-48
TNFRSF10D	7	-9.88	5.46E-25
FAM50B	8	-9.78	9.53E-51
IGFBP5	9	-9.75	4.84E-61
ZNF667	10	-9.6	2.32E-44
MAP1B	11	-9.45	1.80E-97
ANTXR1	12	-9.12	8.38E-78
FN1	13	-8.95	4.30E-96
UCHL1	14	-8.83	3.23E-32
CHL1	15	-8.81	7.66E-50
SLC35G2	16	-8.79	2.97E-24
LHFP3-AS1	17	-8.79	2.24E-41
ANGPTL2	18	-8.77	1.10E-38
NR2F1	19	-8.66	7.40E-14
PRUNE2	20	-8.65	2.81E-133
NTNG1	21	-8.58	4.33E-48
NAALAD2	22	-8.52	1.39E-11
GFR3A	23	-8.52	1.13E-13
ABCA8	24	-8.4	2.02E-47
SCN1B	25	-8.31	5.38E-97
ADCV1	26	-8.28	3.23E-123
OCLAD2	27	-8.16	8.44E-13
PMPEA1	28	-8.13	2.64E-72
FAM19A5	29	-8.1	1.39E-65
KNOC1	30	-8.06	6.37E-30
MBNL3	31	-7.88	1.23E-11
RBMS3	32	-7.81	1.30E-14
NID1	33	-7.79	1.95E-92
JAM3	34	-7.72	9.59E-105
CHST2	35	-7.61	2.30E-76
HS3ST1	36	-7.56	3.29E-21
SLITRK2	37	-7.54	3.14E-51
SCD5	38	-7.53	1.09E-107
SGCE	39	-7.53	1.39E-65
GABRG3	40	-7.51	1.09E-32
CTSK	41	-7.49	4.27E-157
PXDN	42	-7.39	6.48E-41
SLCO3A1	43	-7.38	1.28E-57
SDC2	44	-7.29	6.87E-52
IGFBP7	45	-7.24	2.93E-51
TMEM169	46	-7.22	1.49E-31
SLC15A3	47	-7.17	2.62E-91
DCCLK1	48	-7.16	3.13E-26
MGMT	49	-7.11	1.78E-28
HCN2	50	-7.07	3.72E-74

D. Down regulated genes in MP46

Top 30 MP46 vs NM	Ranked Log2 FC : MP46 vs NM	MP46 vs. NM: Log2FC	MP46 vs. NM: padj
BAP1	1	-14.48	3.63E-57
SFRP1	2	-12.45	4.49E-59
FAM19A5	3	-12.13	1.92E-49
HLA-C	4	-11.2	9.73E-41
PALM	5	-10.63	2.15E-59
PCSKIN	6	-10.59	1.34E-34
PTPRH	7	-10.37	2.19E-23
HS3ST1	8	-10.2	2.13E-15
SLFN12	9	-9.95	2.07E-19
ABCA8	10	-9.91	3.14E-43
TTYH1	11	-9.8	6.83E-10
APOBEC3C	12	-9.67	4.70E-87
FAM171A1	13	-9.64	9.61E-14
IL27RA	14	-9.4	1.19E-30
PRKCB	15	-9.26	1.63E-46
SLAMP9	16	-9.21	3.95E-08
LINC01443	17	-9.17	4.76E-14
ANXA1	18	-9.01	1.03E-29
ZNF667	19	-8.96	1.89E-50
MGMT	20	-8.86	7.47E-35
SYT5	21	-8.82	1.14E-07
FCRLA	22	-8.81	9.90E-39
LINC01314	23	-8.75	2.17E-41
GFR3A	24	-8.56	1.58E-13
EHD2	25	-8.51	3.04E-78
SCN1B	26	-8.45	2.62E-86
DHH	27	-8.43	1.40E-12
PMPEA1	28	-8.43	1.34E-64
PSMB9	29	-8.29	6.33E-41
CAL1	30	-8.19	6.18E-41
S100B	31	-8.05	4.45E-50
FAM198B	32	-7.99	8.75E-120
ST8SIA1	33	-7.83	5.42E-37
FXYD1	34	-7.83	6.47E-42
DLGAP1	35	-7.83	3.56E-30
NPTX1	36	-7.82	2.37E-14
CLEC11A	37	-7.76	1.09E-91
PLP2	38	-7.75	1.64E-86
ITGAX	39	-7.68	4.03E-31
FOSL1	40	-7.6	1.73E-71
FLRT3	41	-7.6	1.79E-64
KRT17	42	-7.59	7.70E-15
DLX1	43	-7.55	5.08E-42
UBE2L6	44	-7.5	6.03E-51
PRELP	45	-7.45	4.23E-96
TIMP1	46	-7.4	4.84E-69
ECM1	47	-7.34	7.72E-60
LGIA	48	-7.33	1.18E-42
CCDC184	49	-7.3	4.34E-30
TGFB1	50	-7.29	1.45E-48

A. DEVELOPPEMENT D'ANTICORPS SPECIFIQUES DE MARQUEURS DE SURFACE PRESENTS SUR LES CELLULES DE MELANOMES DE L'UVEE.

Le développement d'anticorps spécifiques de marqueurs de surface présents sur les cellules tumorales de plusieurs PDX d'UM a été initié plusieurs mois avant le démarrage de mon doctorat, et plus précisément durant le master que j'ai préparé à l'université Paris-Saclay dans le cadre d'une VAE. Ce développement d'anticorps visait à disposer d'outils pour l'isolement de cellules tumorales en grand nombre afin de mener sur des préparations cellulaires ex-vivo, une analyse multi-omique sur les mêmes échantillons dont les techniques telles que celles employées pour l'analyse de la topologie et l'organisation de la chromatine ainsi que marques d'histones nécessitaient plusieurs millions de cellules.

Le développement d'anticorps a été réalisé par la technique de phage display et d'anticorps recombinant de type camélidés: VHH ou nanobody (Moutel et al. 2016; de Marco 2012) grâce à la plateforme d'anticorps recombinant de l'Institut Curie (Dr Crépin, Dr di Marco, Dr Moutel, Dr El Marjou et Dr Perez). Ce développement a conduit à la mise au point de clones spécifiques tels que 8H2, 8G5, 14A9 et 14A7, grâce à plusieurs modèles cellulaires dérivés de PDX établis par l'équipe de la Dr Némati au Laboratoire d'Investigation Préclinique. L'immuno-précipitation des antigènes reconnus par les clones d'intérêt, puis la caractérisation des antigènes par spectrométrie de masse a montré que le clone 8H2 reconnaissait un épitope de MUC18 très exprimé par les cellules d'UM, que le clone G5 reconnaissait CEACAM1 et que le clone 14A9 reconnaissait un épitope de récepteur NG2. L'analyse par spectrométrie de masse n'a cependant pas permis de préciser l'antigène reconnu par le clone 14A7. Durant le criblage de nanobodies, d'autres anticorps spécifiques d'UM ont été identifiés mais n'ont pas été totalement caractérisés (définition par spectrométrie de masse des antigènes reconnus). Ces anticorps pourraient faire l'objet de développement supplémentaires, en particulier pour évaluer leur spécificité sur les panels de PDX d'UM développés à l'institut Curie. L'usage de *Tissue MicroArray* (TMA) de PDX et de mélanomes uvéaux pourrait également aider à montrer la spécificité des clones générés au travers d'un plus large panel de modèles d'UM, et poursuivre l'évaluation de l'hétérogénéité tumorale et l'identification de marqueurs membranaires spécifiques de mélanomes uvéaux.

L'usage des nanobodies 8H2, 8G5, 14A9 et 14A7 a permis l'identification puis l'isolement par cytométrie en flux de cellules tumorales vivantes à partir de biopsies issues de PDX, pour les modèles MP41 et MP46 ainsi que deux autres modèles MP158 et MM224. Le contrôle des préparations cellulaires triées par cytométrie en flux a porté

sur deux approches différentes. Le premier contrôle a consisté en une analyse ciblée pour l'authentification des cellules isolées et le génotypage de séquences répétées ou microsatellites (profil STR). Le second contrôle a eu pour objectif de contrôler la présence d'anomalies moléculaires caractéristiques connues (Amirouchene-Angelozzi et al. 2014) par l'analyse du génome entier via l'analyse de profil *copy number* et *LOH* effectuée par puces SNP (SNP6.0, Cytoscan ou Oncoscan HD). Une analyse transcriptomique conduite par puces d'expression de haute résolution (Affymetrix HTA2.0) a permis quant à elle de montrer que les cellules isolées d'un même modèle partageaient les mêmes caractéristiques transcriptomiques. Ainsi, les analyses moléculaires ont montré que les préparations cellulaires partageaient les mêmes caractéristiques au niveau génomique et transcriptomique (Crépin et al. 2017), ce qui a permis d'engager les analyses multi-omiques (Hi-C, méthylation, RNAseq, Chipseq) à partir de plusieurs préparations cellulaires.

L'identification d'anticorps spécifiques de marqueurs de surface exprimés par les cellules d'UM présente plusieurs intérêts pour l'isolement de cellules tumorales voire de mélanocytes normaux de la choroïde humaine afin d'appréhender l'hétérogénéité moléculaire des mélanocytes de l'uvéa. Bien que la demi-vie de nanobodies libres soit de courte durée *in-vivo*, ces outils pourraient être utilisés pour identifier les cellules tumorales et cibler l'action de radiothérapies (radiothérapies vectorisées internes). Plusieurs nanobodies radiomarqués ont été utilisés dans des études cliniques et précliniques dans des situations métastatiques de pathologies comme le cancer du sein, cancer de la vessie, cancer du poumon à non petites cellules. Ce type de radiomarquage permet d'ailleurs de réduire l'exposition aux radiations (Rashidian et Ploegh 2020). Les nanobodies, spécifiques de marqueurs UM, présentent des intérêts thérapeutiques selon la cible identifiée choisie. Dans ce cas leur développement pour générer des anticorps bi/tri-spécifiques cytotoxiques associant une réponse immunitaire cyto-toxique (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC, (S. Wang et al. 2021; Del Bano et al. 2019) présente un intérêt en particulier pour le traitement de la maladie métastatique du mélanome uvéal.

B. APPORT DE L'ANALYSE MULTI-OMIQUE DANS LA CARACTERISATION DE MODELES DE MELANOME DE L'UVEE.

L'objectif de mon travail de thèse a consisté en la mise en œuvre d'une analyse multi-omique restreinte à quelques modèles d'UM en comparaison avec des mélanocytes normaux de l'uvéa. La mise en au point de conditions favorables au maintien en culture

primaire de mélanocytes normaux de la choroïde par la Dr Géraldine Liot dans le laboratoire du Pr Simon Saule a permis de disposer de modèle de mélanocytes normaux de la choroïde constituant le meilleur contrôle disponible pour la comparaison de cellules tumorales fraîchement isolées de biopsies issues de PDX. Avant l'usage de mélanocytes normaux de la choroïde pour l'analyse multi-omique, ces cellules ont été testées pour l'absence de mutation dans les gènes connus comme mutés dans l'UM, en lien avec l'unité de génétique somatique dirigée par la Dr Gaëlle Pierron, à l'Institut Curie. De plus, l'expression de marqueurs mélanocytaires a été vérifiée (expression de protéine GP100 / HMB45) ainsi que l'absence de marqueurs épithéliaux (absence de cytokératines 8/18) permettant de montrer que les cellules maintenues en culture correspondaient aux cellules attendues.

Le choix de deux modèles d'UM s'est porté sur les PDX MP41 et MP46 car ces modèles étaient disponibles au laboratoire au démarrage de ce travail doctoral, et disposaient de caractéristiques atypiques présentes dans un nombre significatif d'UM. En effet, les modèles MP41 et MP46 établis à partir de tumeurs primaires ne portent pas de mutations de type BSE (BAP1, SF3B1/SRSF2, et EIF1AX) et partagent un gain du 8q. Une situation métastatique est survenue moins de 3 ans après le diagnostic initial et a conduit au décès des patients, dont les modèles ont été établis. Nous avons choisi d'engager une étude intégrative pour évaluer dans ces deux modèles agressifs si des régulations transcriptionnelles, observées en comparaison de mélanocytes normaux, pourraient être dues à des modifications de l'organisation de la chromatine, à des variations de méthylation de l'ADN ou à des modifications de marques d'histones activatrices et répressives de la transcription.

L'analyse par séquençage de l'ADN des cellules tumorales des PDX MP41 et MP46 a pu être conduite en filtrant les variants présents dans l'ADN constitutionnel de régions péri-tumorales des biopsies réalisées sur les patients au diagnostic initial. L'analyse par séquençage a révélé un faible taux de mutations somatiques (0.42 et 0.37 SNV/Mb) comme attendu dans les UM (Figure 9, p36, (Robertson, Shih, et al. 2017; Furney et al. 2013)) (et plus particulièrement comme les UM MBD4 wt Figure 21, p57 (Derrien et al. 2020; M. Rodrigues, Mobuchon, et al. 2019)). L'analyse des variants génétiques à l'aide de plusieurs algorithmes comme ceux des bases de données Cancer Genome Interpreter (Tamborero et al. 2018), VarSome (Kopanov et al. 2019) a permis d'identifier uniquement *GNA11* et *GNAQ* mutés comme « *driver* » dans MP41 et MP46. Bien que plusieurs mutations « *passengers* » aient été identifiées dans des gènes codants pour des protéines (13 dans MP41 et 21 dans MP46), seule une mutation tronquant dans *KMT2C* prédite comme oncogénique présenterait un intérêt. *KMT2C* (précédemment *MLL3*), est une histone-lysine N-méthyltransférase 2C, dont la fonction est la mono-méthylation des lysines 4 des histones H3 comme *KMT2D* (*MLL4*). Les histones

H3K4me1 sont retrouvées enrichies au niveau d'enhancers, et régulent l'activité transcriptionnelle de gènes cibles, en complément de H3K27ac (via une acétylase histone transférase: CBP et EP300). *KMT2C* est fréquemment muté dans les cancers (5% (Kandoth et al. 2013; Gonzalez-Perez, Jene-Sanz, et Lopez-Bigas 2013; R. C. Rao et Dou 2015; Robertson, Kim, et al. 2017; R. Zhang et al. 2020)) en particulier au niveau de domaines catalytiques (domaine SET, donnant lieu à l'activité méthyltransférase). Par ailleurs, il a été montré que *KMT2C* était associé à la RNA polymérase II au niveau de ces sites enhancers favorisant la transcription bidirectionnelle d'ARN non codants intergéniques (eRNA) (Kang et al. 2021). La substitution identifiée dans l'exon 18 de *KMT2C* dans MP41 (hg19, chr7:g.151927023G>C, c.2961C>G, p.Tyr987*) a été identifiée dans plusieurs études (Hirotzu et al. 2019; 2020; Porkka et al. 2020; Karsai et al., s. d.; Jones et al. 2012; Honda et al. 2022; Low et al. 2021; Cochran et al. 2014). Bien que cette mutation ait une fréquence de 20% dans MP41, et sachant qu'il a été montré que la mutation de facteurs régulant la chromatine, comme *KMT2C* associée à une perte d'expression pouvait contribuer à la tumorigénèse (Gonzalez-Perez, Jene-Sanz, et Lopez-Bigas 2013; J. Lee et al. 2009), il apparaîtrait intéressant d'étudier : 1- au niveau transcriptionnel les gènes régulés par la perte de fonctions de *KMT2C* ainsi que les ARN non codants (eRNA) et 2- au niveau épigénétique les enhancers concernés par les altérations de H3K4me1.

La faible expression de *KMT2C* a également été rapportée comme associée à une instabilité génomique, du fait de la dérégulation de gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN, comme la recombinaison homologue (J. Lee et al. 2009; Rampias, Theodoros, Karagiannis, Dimitris 2019). Cette régulation a été montrée comme due à la perte de fonctions de *KMT2C* de régulation des promoteurs de gènes comme *ATM*, *ATR*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD50*, *RAD51* impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN (HR). Dans MP41 et MP46, ces gènes cibles (*ATM*, *ATR*, etc.) sont surexprimés, et ne semblent pas être directement dépendants de la perte d'expression de *KMT2C* dans nos modèles d'UM.

La classification des UM du TCGA (Robertson, Shih, et al. 2017) basée sur les alternations du nombre de copies en 4 groupes, dont 2 majeurs selon la présence de disomie et monosomie du chr3, nous a permis de classer les modèles MP41 et MP46 respectivement dans les groupes 2 et 4.

De façon intéressante, le groupe 2 est enrichi en cas mutés pour *SF3B1* ou *SRSF2* ou ayant une signature de défaut d'épissage type *SF3B1*. Cependant, il a été montré que MP41 n'avait ni de mutations dans les gènes *SF3B1/SRSF2*, ni de signatures transcriptionnelles aberrantes propres aux UM mutés pour ses facteurs d'épissage (Alsafadi et al. 2016). Ce résultat est intéressant au regard des nombreux réarrangements chromosomiques identifiés par cartographie optique (Bionano) et

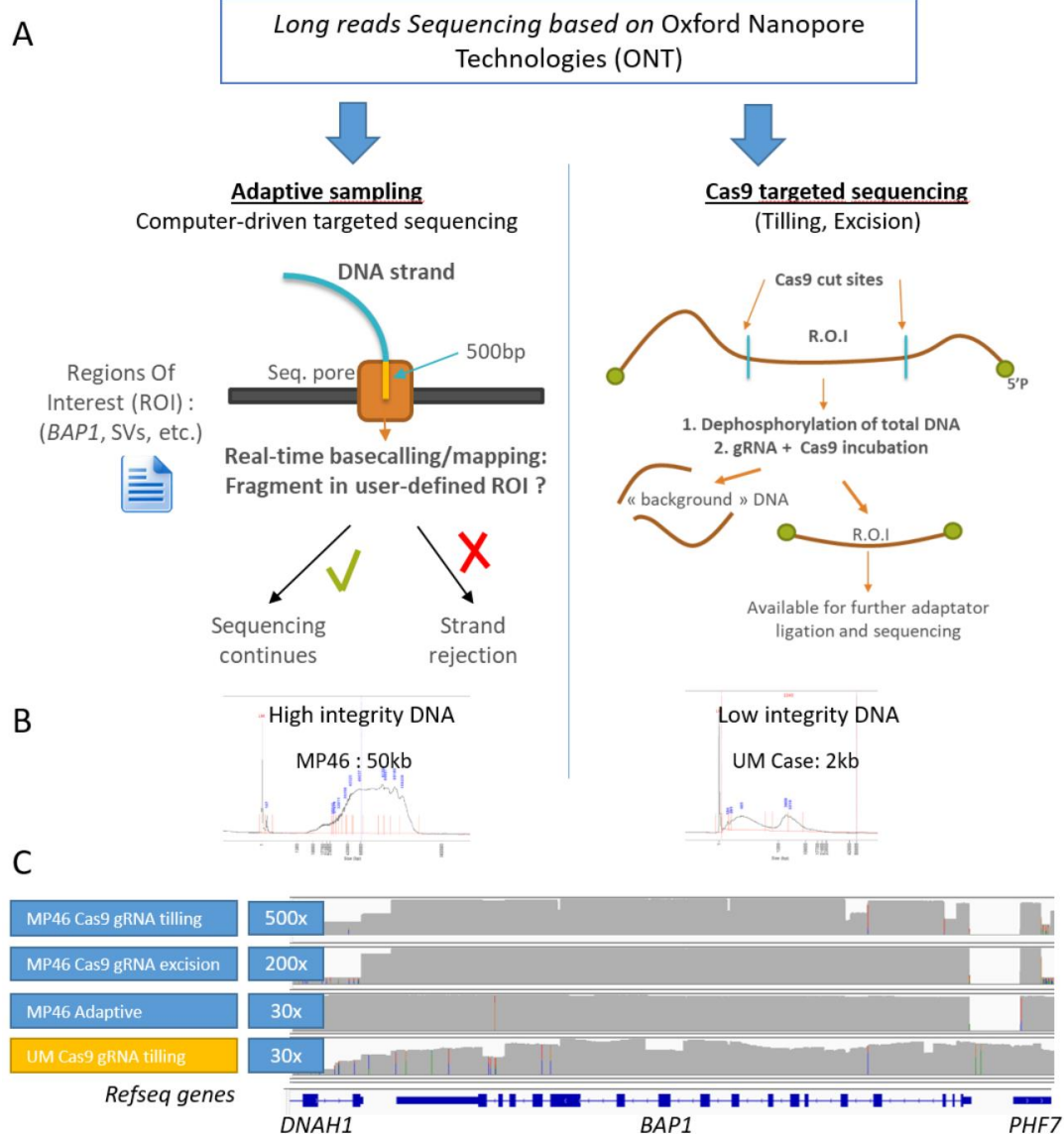
FISH, et des transcrits de fusion identifiés dans MP41. Plusieurs transcrits identifiés par RNAseq, confirmés en PCR et séquençage Sanger pourraient constituer une signature transcriptionnelle aberrante consécutive de la chromoplexie observée dans ce modèle.

Comme le groupe 4 correspond aux UM déficients pour BAP1, il a été logique de retrouver le modèle MP46 dans cette catégorie du fait de la perte d'expression connue au niveau ARN et protéique (Amirouchene-Angelozzi et al. 2014; Némati et al. 2010). L'analyse des régions méthylées et en particulier de la région promotrice de BAP1 a permis de montrer que la région promotrice de BAP1 était hypométhylée dans les mélanocytes normaux et le modèle MP41 (Figure 52 A) en lien avec l'expression de BAP1 mesurée par RNAseq (Figure 52 C). L'analyse de méthylation de MP46 a montré une hyper méthylation, aux bornes d'une délétion de 749nt (hg19, chr3:52,443,929-52,444,738), laquelle délétion a été confirmée par une approche de séquençage ciblé. La délétion du promoteur de *BAP1* bidirectionnel partagé avec *PHF7* est corrélée à l'absence d'expression de *BAP1* et *PHF7* au niveau ARN (Figure 52 A et C) ainsi qu'à l'absence d'expression de la protéine BAP1 au niveau nucléaire (Amirouchene-Angelozzi et al. 2014) (*PHF7* non évalué en IHC). Une cohorte de 48 tumeurs ayant été récemment greffées pour la mise en place de nouveaux PDX, a été caractérisée par une approche de séquençage par amplicons, dont une dizaine couvre le promoteur de *BAP1*. Cette cohorte a fait l'objet d'IHC contre BAP1. Parmi les 24 cas où une perte d'expression de BAP1 nucléaire est observée en IHC, deux cas (I223R37 et L223R57) ont retenu notre attention car possédant une délétion dans la région promotrice de BAP1. Du fait du risque métastatique élevé dans l'UM, la recherche de mutation dans les régions non codantes et régulatrices de l'expression de BAP1 est recommandée pour le diagnostic moléculaire des patients atteints de mélanome uvéal, mais également dans le cas de syndrome BAP1. L'identification de telles altérations dans le promoteur de *BAP1* est prise en compte à l'institut Curie. Un cas récent d'UM analysé dans le cadre du programme France Médecine Génomique 2025, via la plateforme SeqOIA (<https://pfmg2025.aviesan.fr/en/>) présentant une perte d'expression de BAP1 sans mutations identifiées dans les régions codantes a pu être revu. Une recherche d'altération par WGS puis confirmation par PCR long range a permis de préciser une délétion de la région promotrice de BAP1 (David Gentien et al. 2022).

Du fait de la difficulté à analyser les données d'amplicons sur la région promotrice de *BAP1*, j'ai cherché à améliorer cette analyse pour l'intégralité du gène BAP1, à l'aide d'une approche par séquençage long reads d'Oxford Nanopore. Pour cela, avec l'aide de Thomas Chenegros, ingénieur sur ma plateforme et en lien avec le service de génétique de l'hôpital, nous avons évalué plusieurs possibilités de séquençage Nanopore pour l'analyse d'échantillons d'intégrité variable. Selon la taille des ADN

génomique mesurée par électrophorèse capillaire, une approche basée sur l'usage de guides ARN/Cas9 (Gilpatrick et al. 2020) et une approche par enrichissement bio-informatique (adaptive sampling) (Mariya et al. 2022) ont été utilisées pour l'identification de mutations de BAP1 et la validation de variants structuraux identifiés par cartographie optique. Ces résultats préliminaires sont présentés en Figure 59.

Figure 59: Détection d'altérations de *BAP1* par séquençage ciblé.



A) Le séquençage ciblé de long fragments d'ADN peut être réalisé par enrichissement bioinformatique (adaptive sampling). Si les 400 premiers nucléotides séquencés sont inclus dans un fichier listant les régions d'intérêt (ROI) alors le séquençage du fragment d'ADN se poursuit, sinon le fragment d'ADN est rejeté du pore de séquençage. Une approche ciblée nécessitant le design de guide RNA spécifiques de la région d'intérêt (gRNA) et l'usage de Crispr/Cas9, permet de séquencer la région d'intérêt, si au préalable les extrémités 5' phosphates des ADN génomiques ont été déphosphorylées. L'approche ciblée par Cas9 peut être réalisée avec un couple de gRNA encadrant la région d'intérêt (excision) ou avec plusieurs gRNA (tilling). B) Contrôle de l'intégrité de deux ADN par électrophorèse capillaire l'un de haut poids (MP46, 50kb), et un second dégradé (UM, 2kb). C) Analyse IGV des données de séquençage, permettant d'identifier la délétion dans le promoteur de *BAP1/PHF7* avec des couvertures allant de 30X à 500X pour MP46, et obtention d'un profil avec une couverture de 30X pour un ADN dégradé issu d'un UM.

L'analyse transcriptionnelle réalisée dans ce travail a permis de décrire pour la première fois une liste de gènes exprimés et régulés entre deux modèles de mélanome uvéal et des mélanocytes normaux de la choroïde, maintenus en culture. Associée aux changements de compartiments chromatinien (euchromatine/hétérochromatine), au niveau de méthylation et à la présence de marques régulatrices de l'activité transcriptionnelle, cette analyse intégrative a montré : (i) qu'un grand nombre de gènes étaient significativement régulés (3066 sous-exprimés, et 2334 surexprimés, en considérant un log 2 fold change supérieur à 1.5 et une p-value inférieure à 5%), (ii) que plusieurs gènes surexprimés étaient connus comme impliqués dans l'oncogenèse des UM comme *PLCB4* ou *RASGRP3*. De façon intéressante *PLCB4* a été identifié comme muté dans l'UM conduisant à l'activation de la voie Gα/q. Ici sa surexpression mesurée dans un contexte où *GNAQ/GNA11* muté suggère sa participation à l'activation de la voie PKC. La surexpression de *RASGRP3* présente également un intérêt étant donné son rôle dans la cascade d'activations de la voie MAPK (Moore et al. 2018; Chen et al. 2017). L'analyse transcriptionnelle a également montré la surexpression de *RAPGEF4* dans les modèles d'UM. RAPGEF4/EPAC2 est impliqué dans la régulation de YAP (Mallone et al. 2020; Branham et al. 2009; N. Kumar et al. 2018; K. M. Choi et al. 2021) une voie reconnue dans l'oncogenèse de l'UM. Le ciblage transitoire ou pharmacologique (ESI-05, (Rehmann 2013)) de RAPGEF4 dans MP41 et MP46 n'a pas affecté la prolifération cellulaire, mais des études fonctionnelles approfondies seraient nécessaires pour évaluer son rôle dans l'UM. D'autres gènes comme *MITF* ou *DCT* sont également retrouvés dans la liste des gènes surexprimés.

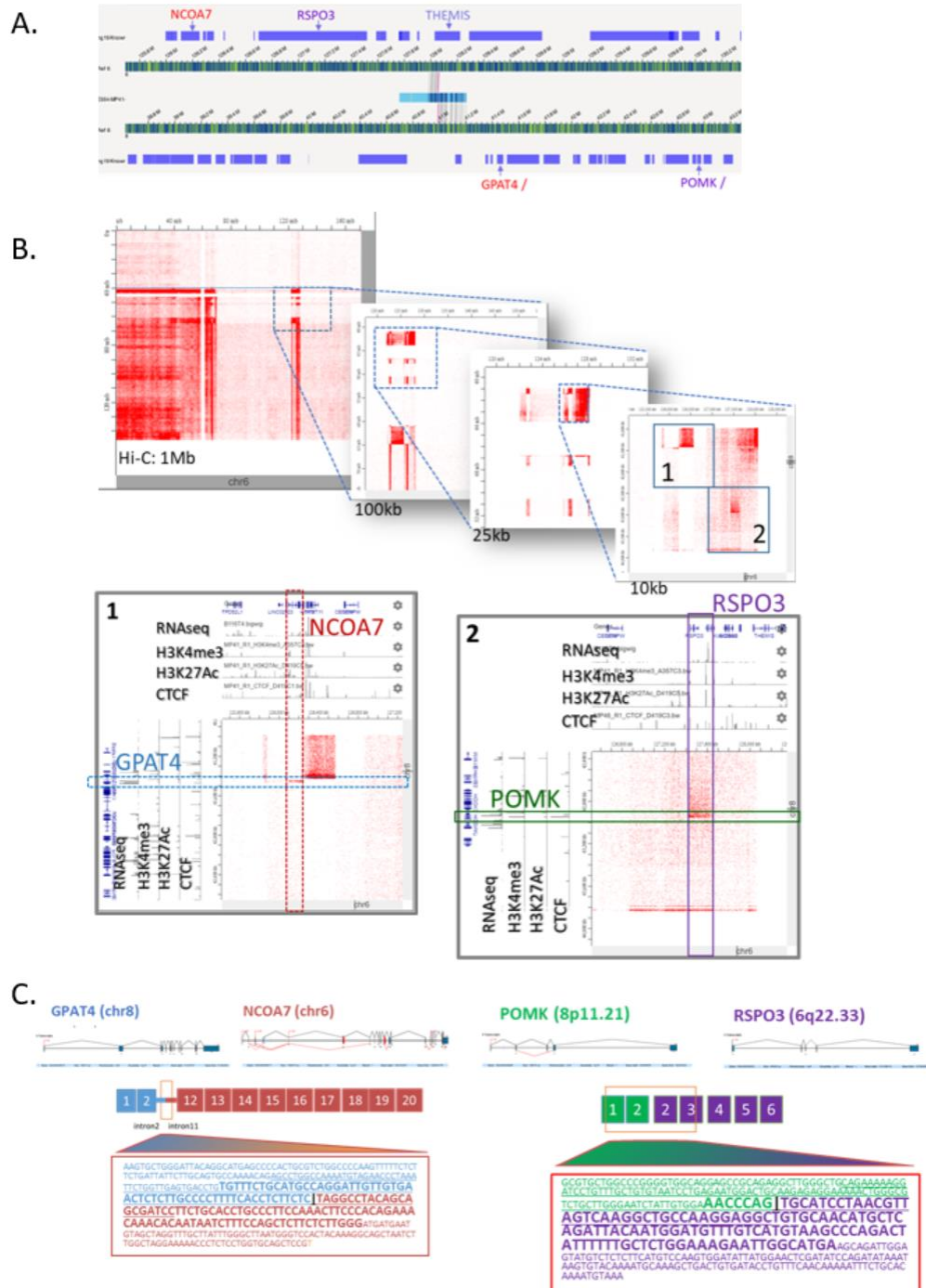
L'analyse des voies régulées a été menée principalement par Reactome (Gillespie et al. 2022) pour identifier celles enrichies selon les gènes régulés. L'analyse Reactome a mis en évidence des voies liées au cycle cellulaire activées dans les modèles d'UM mais également plusieurs voies associées à la réparation des dommages à l'ADN dans lesquelles plusieurs gènes impliqués dans l'initiation de ces mécanismes sont surexprimés comme *MRE11*, *RAD50*, *BARD1*, *BRCA1/2*, *PALB2*, *BRIP1*, *SEMI1*, *BRCC3*, *USP3*. Alors que les mélanomes uvéaux ont plutôt des profils d'altérations peu remaniés, l'analyse menée par cartographie optique et par FISH a mis en évidence plusieurs remaniements aberrants et complexes comme des translocations inter et intra chromosomiques, une instabilité télomérique, donnant lieu à plusieurs chromosomes dicentriques, dérivatifs et chromosomes en anneaux. Les variants structuraux ont permis d'identifier des transcrits de fusion dus à la jonction au point de cassure de deux gènes, comme par exemple au niveau de l'insertion duplication en 12q24, au niveau d'un site fragile (FRA12, (R. Kumar et al. 2019)) de réplication de l'ADN. Ce variant structural en 12q24, a pour conséquence de fusionner des gènes dont la transcription donne les transcrits *MAPKAPK5-ACAD10* pour MP41 et *KDM2B-RHOF* pour MP46. Certaines translocations comme la translocation inter-chromosomique

équilibrée identifiée dans MP46 : t(1,22) donne lieu à un gène de fusion *CABIN1-MRPS21*.

La mise en évidence de l'activation de voies de la réparation des dommages à l'ADN, ainsi que la mise en évidence de remaniements structuraux nous ont incités à mener une analyse exhaustive des variants d'épissage à partir des données de RNAseq. La confirmation des jonctions des transcrits de fusions a permis de montrer la présence de transcrits de fusion correspondant aux gènes de fusion générés par les variants structuraux. Néanmoins pour certains transcrits de fusion comme *GPAT4-NCOA7* et *POMK-RSPO3*, l'analyse par cartographie optique et par FISH à l'aide de sondes ciblant chacun de ces 4 gènes n'a pas permis de montrer la présence de gènes de fusion. L'analyse par FISH a néanmoins permis de montrer une complexité de la région de translocation t(6;8), présente sur les chromosomes dicentrique dic(6;8;17), dic(6;8;16), dic(1;11;6;8), et dont le contenu des 4 gènes *GPAT4*, *NCOA7*, *POMK* et *RSPO3* est variable. L'analyse par FISH a permis de proposer un modèle d'évolution de ces anomalies où un chromosome dérivatif der(6)(6;8) aurait donné lieu à 3 types de chromosomes dicentriques ainsi qu'un chromosome dérivatif der(8)(6;8) aurait donné lieu aux isochromosomes 8q et aux chromosomes dicentriques impliquant en plus les chr1 et 11 (dic(1;11;8;6)), lequel expliquerait la présence de chromosomes en anneau r(dic(1;11;8;6)) (Figure 49 G, p139).

Bien que l'analyse FISH montre une complexité dans les réarrangements dus à une translocation t(6;8) (Figure 60 A), l'analyse de la topologie met en évidence des contacts importants entre les gènes *GPAT4-NCOA7* et *POMK-RSPO3* (Figure 60 B). La présence de ces contacts entre ces gènes distants (*GPAT4-NCOA7* : 2.4Mb et *POMK-RSPO3* : 2.6Mb) en l'absence de gènes de fusion d'après les données actuelles, suggérerait que la transcription aberrante de *GPAT4-NCOA7* et *POMK-RSPO3* (Figure 60 C) pourrait être due à la conformation de la chromatine. Une analyse de conformation de la chromatine ciblée à ces régions (Downes et al. 2022) pourrait permettre d'élucider la séquence et l'organisation de la topologie.

Figure 60: Complexité des contacts et des réarrangements dans MP41.



A) Translocation t(6 ;8) identifiée par cartographie optique dans MP41. B) Cartes de contacts entre les régions du chr6 et chr8 à différentes résolutions. Les encarts 1 et 2 (réolution de 5kb) obtenus avec l'outil Juicebox, contiennent les données de RNAseq, de H3K4me3, H3K27Ac et CTCF superposées aux données de contact. C) Schéma des transcrits de fusions identifiés par RNAseq. Les séquences encadrées correspondent aux régions de validations ciblées par RT-PCR et séquençage Sanger. Les séquences en gras correspondent aux séquences de jonction identifiées après séquençage.

Plus généralement, les variants structuraux observés dans MP41 et dans MP46 sont associés à des modifications d'organisation de la chromatine, donnant lieu à des transcrits de fusion privés, car présents dans MP41 ou MP46. L'analyse par cartographie optique et FISH de lignées de mélanomes uvéaux agressifs comme Mel202, MM66, OMM1 et OMM2.3 a montré des réarrangements complexes, des aberrations télomériques. Une analyse par séquençage Nanopore (adaptive sampling) est en cours pour confirmer les altérations observées dans ces lignées et préciser les séquences impliquées dans ces réarrangements. Ces nouveaux résultats montrent une instabilité génomique dans le mélanome de l'uvée qui mérite d'être étudiée en détail.

Notre travail n'a pas permis d'identifier à ce jour d'événement oncogénique dans MP41, qui ne dispose pas de mutation type BSE. Ces cas représentent à ce jour 20% des UM. La chromoplexie observée dans MP41, pourrait être recherchée dans d'autres cas. Récemment avec l'aide de la Dr Gaëlle Pierron du service de génétique de l'Institut Curie, nous avons identifié 22 cas d'UM parmi 400 cas revus et passés en CGH array, comportant un nombre important de cassures segmentaires (entre 8 et 29), un nombre de chromosomes altérés (entre 1 et 14), et ayant un index génomique élevé (compris entre 20-84). La liste de ces 22 cas différents est composée de 17 tumeurs primaires et de 5 métastases et pourrait faire l'objet soit d'analyse par cartographie optique ou de séquençage Nanopore ciblé.

Parmi les gènes d'intérêt non exploités dans cette étude, figure en particulier *PTP4A3* identifié comme surexprimé dans MP41 et MP46 (Duciel et al. 2019). La forte expression de PTP4A3/PRL3 (Protein Tyrosine Phosphatase 4A3/protein of regenerating liver-3, localisé en 8q24) est prédictive du risque métastatique dans le mélanome uvéal, et la surexpression de PTP4A3 augmente la migration de cellules *in vitro* et l'invasion *in vivo* (C. Laurent et al. 2011). La surexpression de PRL3 a été rapportée dans un bon nombre de cancers et les fonctions de la protéine de PTP4A3/PRL3 ont été rapportées en lien avec la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, etc. Il a été proposé que PTP4A3 puisse jouer un rôle dans la méthylation des histones H3K9 dans des modèles de cancers colorectaux et de leucémies myéloïdes aiguës (Yongxia Liu et al. 2013; Chong et al. 2014). Plus récemment il a été montré que la surexpression de PRL3 perturbait le fonctionnement du complexe RAP1/TRF2/PRL3 de protection des télomères et donnait lieu à une instabilité des télomères et à une instabilité chromosomique caractérisée par des anomalies de structure et du nombre de copies de chromosomes (S. Lian et al. 2017). Puisque des altérations au niveau des télomères ainsi que des remaniements chromosomiques ont également été caractérisés dans plusieurs modèles cellulaires d'UM, il semblerait intéressant de caractériser le rôle de PTP4A3/PRL3 dans ces modèles ainsi que dans une série d'UM contenant des réarrangements

chromosomiques. Selon les résultats obtenus, la surexpression de PTP4A3/PRL3 pourrait constituer un évènement relativement précoce dans la tumorigénèse des UM.

L'analyse de la conformation de la chromatine centrée sur PRAME a mis en évidence des différences de conformation entre les mélanocytes normaux de la choroïde et les modèles MP41 et MP46, où les contacts entre ZNF280A et PRAME sont importants, resserrés autour de PRAME. Comme la résolution des données est limitée à 5kb, il paraît nécessaire d'améliorer la résolution de ces analyses de la conformation de la chromatine pour mieux délimiter les sous-structures présentes sur cette région.

L'analyse intégrative a permis de détecter des niveaux d'expression élevés de PRAME en utilisant une analyse standard (EASANA), ou une analyse de k-mers (Marçais et Kingsford 2011), réalisée par le Dr Joshua Waterfall, dans les modèles d'UM testés, alors qu'absents dans les mélanocytes normaux. L'analyse de méthylation a montré une déméthylation du promoteur de PRAME, et les analyses de ChIPseq ont montré la présence de marques activatrices comme H3K4me3, H3K27Ac, l'absence de marques répressives comme H2Aub et H3K27me3, et la présence de fixation de CTCF. La présence de ces différentes marques observées dans MP41 et MP46, participe très probablement à l'activation de *PRAME* dans ces cas agressifs. L'analyse de la topologie d'in situ Hi-C, malgré une résolution maximale à 5kb, montre des contacts forts entre la région de *ZNF280B* et *PRAME*, suggérant une organisation de l'ADN en épingle à cheveux dans MP41 et MP46. Une analyse de la topologie ciblée par Capture-C, pourrait permettre d'augmenter la résolution de l'analyse topologique, d'identifier des sous-TAD en lien avec les données de ChIPseq de bonne résolution dont nous disposons (H3K27ac, H3K4me3, et CTCF). L'analyse des données Encode a permis d'identifier 20 facteurs de transcription surexprimés dans nos données et susceptibles d'activer la transcription de *PRAME*. Ces facteurs de transcription comme RAD21, SMC3 impliqués dans le complexe Cohésin pour la formation de boucle d'ADN ou encore les CDH1/2 impliqués sont des cibles intéressantes pour élucider la surexpression de *PRAME*. Bien qu'une première inhibition transitoire de *RAD21* pendant 72h n'ait pas permis de moduler l'expression de PRAME, des expériences dans des modèles cellulaires n'exprimant pas PRAME pourraient être engagées en surexprimant ces facteurs de transcription. L'analyse de Capture-C pourrait compléter l'analyse dès lors qu'une expression de *PRAME* serait mesurée en PCR quantitative par exemple.

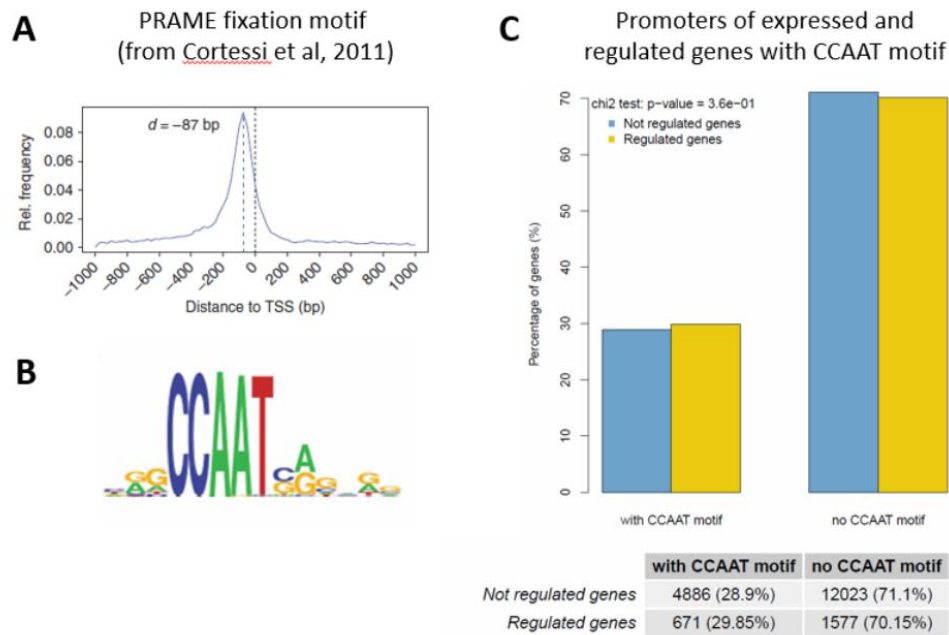
Le rôle de *PRAME* dans l'oncogenèse des UM reste à éclaircir. *PRAME* a été décrit comme facteur de transcription, cependant aucun enrichissement significatif n'est observé dans nos comparaisons au niveau des gènes surexprimés qui contiennent un site de fixation décrit pour PRAME dans leur promoteur (-400+100bp) (Figure 61)

PRAME a également été décrit comme répresseur des récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque (RAR : RAR α , β et γ) en interagissant avec EZH2, conduisant à l'inhibition de l'arrêt de la prolifération induit par l'acide rétinoïque (Epping et al. 2005). Les cibles de l'acide rétinoïque sont p21 et RAR β . Parmi les gènes co-régulés comme *PRAME*, *EZH2* est surexprimé dans MP41 et MP46, et appartient à un compartiment actif dans les modèles d'UM alors qu'inactif dans les NM. Les gènes cibles de *RAR* comme *RAR α* , *p21/CDKN1A*, *CYP26A1* et *HOXA1* (di Masi et al. 2015) sont sous exprimés voire non exprimés dans les modèles d'UM, suggérant un possible rôle d'inhibition médié par PRAME/EZH2. L'inhibition de *PRAME* par siRNA et le traitement par l'acide rétinoïque permettrait de vérifier dans nos modèles si l'inhibition de *PRAME* concomitant avec l'acide rétinoïque, réduit l'arrêt de la prolifération et induit l'activation des cibles de RAR. A ce jour, plusieurs siRNA contre PRAME ont été testés sur MP41 permettant de réduire quasiment totalement l'expression de PRAME après 48h ou 72h, sans effet sur la prolifération. L'ajout d'acide rétinoïque permettrait de tester la réactivation des gènes cibles.

PRAME et *EZH2* ont également été proposés comme co-répresseurs du gène suppresseur de tumeur *TRAIL/TNFSF10* (De Carvalho et al. 2013) du fait d'éléments de fixation des récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque (RARE) présents dans la région promotrice de *TRAIL*. Comme plusieurs travaux ont montré une relation directe entre PRAME et EZH2 et les voies de l'acide rétinoïque (Takata et al. 2022; De Carvalho et al. 2013; Epping et al. 2005), il paraît intéressant de vérifier s'il est possible de co-immunoprécipiter PRAME et EZH2 dans les fractions nucléaires. S'il existe une régulation en *PRAME* et *EZH2*, il serait intéressant de réaliser des lignées KO inducibles de *PRAME* et tester si des modifications de H3K27me3 ont lieu, témoignant d'une relation entre *PRAME* et l'activité de EZH2 de part sa fonction d'histone méthyltransférase au sein du complexe PRC2. Ainsi, la caractérisation de la fonction de PRAME dans le mélanome uvéal pourrait apporter de nouvelles pistes thérapeutiques selon le lien avec EZH2.

Les principaux résultats obtenus de ces travaux de thèse ainsi que les principales conclusions et perspectives sont résumées sur la Figure 62.

Figure 61: Recherche de gènes régulés selon l'expression de PRAME.



A) D'après Cortessi et al, 2011. Profilage à l'échelle du génome de l'association de la PRAME avec la chromatine. La liaison de la PRAME aux promoteurs se produit au niveau du site de démarrage de la transcription (TSS.) Le graphique de fréquence des distances des sites de liaison de PRAME par rapport au TSS montre que 83 % des sites promoteurs de PRAME sont situés entre -400 pb et +100 pb, avec un pic à -87 pb. B) L'analyse des motifs identifie un motif CCAAT sous les pics de promoteurs fixant PRAME, la séquence enrichie a été identifiée par GimmeMotifs. C) Les gènes couramment exprimés dans les modèles UM et NM ont été testés pour la présence ou l'absence d'un motif CCAAT dans leur promoteur. Les gènes régulés avec ou sans motif ont été comparés à leur régulation dans les modèles UM. Aucun enrichissement significatif n'a été observé.

Novel molecular features of UM revealed by multi-omics analysis comparison of malignant and normal uveal melanocytes



BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Wahab, Omar, Ann Mullally, Cyrus Hedvat, Guillermo Garcia-Manero, Jay Patel, Martha Wadleigh, Sebastien Malinge, et al. 2009. « Genetic Characterization of TET1, TET2, and TET3 Alterations in Myeloid Malignancies ». *Blood* 114 (1): 144-47. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-210039>.
- Agger, Karl, Paul A. C. Cloos, Jesper Christensen, Diego Pasini, Simon Rose, Juri Rappsilber, Irina Issaeva, Eli Canaani, Anna Elisabetta Salcini, et Kristian Helin. 2007. « UTX and JMJD3 Are Histone H3K27 Demethylases Involved in HOX Gene Regulation and Development ». *Nature* 449 (7163): 731-34. <https://doi.org/10.1038/nature06145>.
- Agrawal, Nishant, Rehan Akbani, B. Arman Aksoy, Adrian Ally, Harindra Arachchi, Sylvia L. Asa, J. Todd Auman, et al. 2014. « Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma ». *Cell* 159 (3): 676-90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>.
- Akbani, Rehan, Kadir C. Akdemir, B. Arman Aksoy, Monique Albert, Adrian Ally, Samirkumar B. Amin, Harindra Arachchi, et al. 2015. « Genomic Classification of Cutaneous Melanoma ». *Cell* 161 (7): 1681-96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>.
- Albert, D M, M A Ruzzo, M A McLaughlin, N L Robinson, J L Craft, et J Epstein. 1984. « Establishment of cell lines of uveal melanoma. Methodology and characteristics. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 25 (11): 1284-99.
- Alexandrov, Ludmil B., Jaegil Kim, Nicholas J. Haradhvala, Mi Ni Huang, Alvin Wei Tian Ng, Yang Wu, Arnoud Boot, et al. 2020. « The Repertoire of Mutational Signatures in Human Cancer ». *Nature* 578 (7793): 94-101. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1943-3>.
- Alexandrov, Ludmil B., Serena Nik-Zainal, David C. Wedge, Samuel A. J. R. Aparicio, Sam Behjati, Andrew V. Biankin, Graham R. Bignell, et al. 2013. « Signatures of Mutational Processes in Human Cancer ». *Nature* 500 (7463): 415-21. <https://doi.org/10.1038/nature12477>.
- Algazi, Alain P., Katy K. Tsai, Alexander N. Shoushtari, Rodrigo R. Munhoz, Zeynep Eroglu, Josep M Piulats, Patrick A. Ott, et al. 2016. « Clinical outcomes in metastatic uveal melanoma treated with PD-1 and PD-L1 antibodies ». *Cancer* 122 (21): 3344-53. <https://doi.org/10.1002/cncr.30258>.
- Ali, Z., N. Yousaf, et J. Larkin. 2013. « Melanoma Epidemiology, Biology and Prognosis ». *EJC Supplements: EJC: Official Journal of EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer ... [et Al.]* 11 (2): 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.012>.

- Alizadeh, Azita, Karen R. Fitch, Colleen M. Niswender, G. Stanley McKnight, et Gregory S. Barsh. 2008. « Melanocyte-Lineage Expression of Cre Recombinase Using Mitf Regulatory Elements ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 21 (1): 63-69. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2007.00425.x>.
- Al-Khadairi, Ghaneya, et Julie Decock. 2019. « Cancer Testis Antigens and Immunotherapy: Where Do We Stand in the Targeting of PRAME? » *Cancers* 11 (7): 984. <https://doi.org/10.3390/cancers11070984>.
- Allfrey, V. G., R. Faulkner, et A. E. Mirsky. 1964. « Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA stnthesys* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51 (5): 786-94.
- Alsafadi, Samar, Stephane Dayot, Malcy Tarin, Alexandre Houy, Dorine Bellanger, Michele Cornella, Michel Wassef, et al. 2021. « Genetic Alterations of SUGP1 Mimic Mutant-SF3B1 Splice Pattern in Lung Adenocarcinoma and Other Cancers ». *Oncogene* 40 (1): 85-96. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01507-5>.
- Alsafadi, Samar, Alexandre Houy, Aude Battistella, Tatiana Popova, Michel Wassef, Emilie Henry, Franck Tirode, et al. 2016. « Cancer-Associated SF3B1 Mutations Affect Alternative Splicing by Promoting Alternative Branchpoint Usage ». *Nature Communications* 7 (février): 10615. <https://doi.org/10.1038/ncomms10615>.
- Ambrosini, Grazia, Elgilda Musi, Alan L. Ho, Elisa de Stanchina, et Gary K. Schwartz. 2013. « Inhibition of Mutant GNAQ Signaling in Uveal Melanoma Induces AMPK-Dependent Autophagic Cell Death ». *Molecular Cancer Therapeutics* 12 (5): 768-76. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-1020>.
- Amirouchene-Angelozzi, Nabil, Fariba Némati, David Gentien, André Nicolas, Amaury Dumont, Guillaume Carita, Jacques Camonis, et al. 2014. « Establishment of Novel Cell Lines Recapitulating the Genetic Landscape of Uveal Melanoma and Preclinical Validation of MTOR as a Therapeutic Target ». *Molecular Oncology* 8 (8): 1508-20. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.06.004>.
- Amirouchene-Angelozzi, Nabil, Marie Schoumacher, Marc-Henri Stern, Nathalie Cassoux, Laurence Desjardins, Sophie Piperno-Neumann, Olivier Lantz, et Sergio Roman-Roman. 2015. « Upcoming Translational Challenges for Uveal Melanoma ». *British Journal of Cancer* 113 (9): 1249-53. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.269>.
- Anastas, Jamie N., et Randall T. Moon. 2013. « WNT Signalling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 13 (1): 11-26. <https://doi.org/10.1038/nrc3419>.
- Anderson, Nathaniel D., Richard de Borja, Matthew D. Young, Fabio Fuligni, Andrej Rosic, Nicola D. Roberts, Simon Hajjar, et al. 2018. « Rearrangement Bursts Generate Canonical Gene Fusions in Bone and Soft Tissue Tumors ». *Science (New York, N.Y.)* 361 (6405): eaam8419. <https://doi.org/10.1126/science.aam8419>.

- Andrews, Lawrence P., Ariel E. Marciscano, Charles G. Drake, et Dario A.A. Vignali. 2017. « LAG3 (CD223) as a Cancer Immunotherapy Target ». *Immunological reviews* 276 (1): 80-96. <https://doi.org/10.1111/imr.12519>.
- Apcher, Sébastien, Guy Millot, Chrysoula Daskalogianni, Alexander Scherl, Bénédicte Manoury, et Robin Fåhræus. 2013. « Translation of pre-spliced RNAs in the nuclear compartment generates peptides for the MHC class I pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (44): 17951-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309956110>.
- Aurias, Alain, Christiane Rimbaut, Denise Buffe, Jean-Michel Zucker, et André Mazabraud. 1984. « Translocation Involving Chromosome 22 in Ewing's Sarcoma. A Cytogenetic Study of Four Fresh Tumors ». *Cancer Genetics and Cytogenetics* 12 (1): 21-25. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(84\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0165-4608(84)90003-7).
- Babbio, F., C. Pistore, L. Curti, I. Castiglioni, P. Kunderfranco, L. Brino, P. Oudet, et al. 2012. « The SRA Protein UHRF1 Promotes Epigenetic Crosstalks and Is Involved in Prostate Cancer Progression ». *Oncogene* 31 (46): 4878-87. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.641>.
- Babiceanu, Mihaela, Fujun Qin, Zhongqiu Xie, Yuemeng Jia, Kevin Lopez, Nick Janus, Loryn Facemire, et al. 2016. « Recurrent Chimeric Fusion RNAs in Non-Cancer Tissues and Cells ». *Nucleic Acids Research* 44 (6): 2859-72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw032>.
- Baca, Sylvan C., Davide Prandi, Michael S. Lawrence, Juan Miguel Mosquera, Alessandro Romanel, Yotam Drier, Kyung Park, et al. 2013. « Punctuated Evolution of Prostate Cancer Genomes ». *Cell* 153 (3): 666-77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.021>.
- Barbosa-Morais, Nuno L., Manuel Irimia, Qun Pan, Hui Y. Xiong, Serge Gueroussov, Leo J. Lee, Valentina Slobodeniuc, et al. 2012. « The Evolutionary Landscape of Alternative Splicing in Vertebrate Species ». *Science (New York, N.Y.)* 338 (6114): 1587-93. <https://doi.org/10.1126/science.1230612>.
- Baren, N. van, F. Brasseur, D. Godelaine, G. Hames, A. Ferrant, F. Lehmann, M. André, et al. 1999. « Genes Encoding Tumor-Specific Antigens Are Expressed in Human Myeloma Cells ». *Blood* 94 (4): 1156-64.
- Barnhill, Raymond L., Zsolt Argenyi, Marianne Berwick, Paul H. Duray, Lori Erickson, Joan Guitart, Marcello G. Horenstein, et al. 2008. « Atypical Cellular Blue Nevi (Cellular Blue Nevi with Atypical Features): Lack of Consensus for Diagnosis and Distinction from Cellular Blue Nevi and Malignant Melanoma ("malignant Blue Nevus") ». *The American Journal of Surgical Pathology* 32 (1): 36-44. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181573aaf>.
- Barnhill, Raymond L., Lorenzo Cerroni, Martin Cook, David E. Elder, Helmut Kerl, Philip E. LeBoit, Stanley W. McCarthy, et al. 2010. « State of the Art, Nomenclature, and Points of Consensus and Controversy Concerning Benign Melanocytic Lesions: Outcome of an International Workshop ». *Advances in Anatomic Pathology* 17 (2): 73-90. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181cfe758>.

- Barski, Artem, Suresh Cuddapah, Kairong Cui, Tae-Young Roh, Dustin E. Schones, Zhibin Wang, Gang Wei, Iouri Chepelev, et Keji Zhao. 2007. « High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome ». *Cell* 129 (4): 823-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>.
- Bayani, Jane, Shamini Selvarajah, Georges Maire, Bisera Vukovic, Khaldoun Al-Romaih, Maria Zielenska, et Jeremy A. Squire. 2007. « Genomic Mechanisms and Measurement of Structural and Numerical Instability in Cancer Cells ». *Seminars in Cancer Biology* 17 (1): 5-18. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.10.006>.
- Baylin, Stephen B., et Peter A. Jones. 2011. « A Decade of Exploring the Cancer Epigenome — Biological and Translational Implications ». *Nature Reviews Cancer* 11 (10): 726-34. <https://doi.org/10.1038/nrc3130>.
- Bedi, A., B. A. Zehnbaauer, J. P. Barber, S. J. Sharkis, et R. J. Jones. 1994. « Inhibition of Apoptosis by BCR-ABL in Chronic Myeloid Leukemia ». *Blood* 83 (8): 2038-44.
- Béguelin, Wendy, Relja Popovic, Matt Teater, Yanwen Jiang, Karen L. Bunting, Monica Rosen, Hao Shen, et al. 2013. « EZH2 Is Required for Germinal Center Formation and Somatic EZH2 Mutations Promote Lymphoid Transformation ». *Cancer Cell* 23 (5): 677-92. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.011>.
- Behrmann, Iris, Susanne Wallner, Waraporn Komyod, Peter C. Heinrich, Marion Schuierer, Reinhard Buettner, et Anja-Katrin Bosserhoff. 2003. « Characterization of Methylthioadenosin Phosphorylase (MTAP) Expression in Malignant Melanoma ». *The American Journal of Pathology* 163 (2): 683-90. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63695-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63695-4).
- Bell, A. C., et G. Felsenfeld. 2000. « Methylation of a CTCF-Dependent Boundary Controls Imprinted Expression of the Igf2 Gene ». *Nature* 405 (6785): 482-85. <https://doi.org/10.1038/35013100>.
- Bell, A. C., A. G. West, et G. Felsenfeld. 1999. « The Protein CTCF Is Required for the Enhancer Blocking Activity of Vertebrate Insulators ». *Cell* 98 (3): 387-96. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81967-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81967-4).
- Bellacosa, A. 2001. « Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA Repair and Human Cancer ». *Journal of Cellular Physiology* 187 (2): 137-44. <https://doi.org/10.1002/jcp.1064>.
- Belton, Jon-Matthew, Rachel Patton McCord, Johan Harmen Gibcus, Natalia Naumova, Ye Zhan, et Job Dekker. 2012. « Hi-C: A Comprehensive Technique to Capture the Conformation of Genomes ». *Methods (San Diego, Calif.)* 58 (3): 268-76. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.05.001>.
- Bender, Ryan P., Matthew J. McGinniss, Paula Esmay, Elsa F. Velazquez, et Julie DR Reimann. 2013. « Identification of HRAS Mutations and Absence of GNAQ or GNA11 Mutations in Deep Penetrating Nevi ». *Modern Pathology* 26 (10): 1320-28. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.77>.
- Berger, Shelley L. 2007. « The Complex Language of Chromatin Regulation during Transcription ». *Nature* 447 (7143): 407-12. <https://doi.org/10.1038/nature05915>.

- Bertolotto, Corine, Fabienne Lesueur, Sandy Giuliano, Thomas Strub, Mahaut de Lichy, Karine Bille, Philippe Dessen, et al. 2011. « A SUMOylation-Defective MITF Germline Mutation Predisposes to Melanoma and Renal Carcinoma ». *Nature* 480 (7375): 94-98. <https://doi.org/10.1038/nature10539>.
- Bhasin, Jeffrey M., Byron H. Lee, Lars Matkin, Margaret G. Taylor, Bo Hu, Yaomin Xu, Cristina Magi-Galluzzi, Eric A. Klein, et Angela H. Ting. 2015. « Methylome-wide Sequencing Detects DNA Hypermethylation Distinguishing Indolent from Aggressive Prostate Cancer ». *Cell reports* 13 (10): 2135-46. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.078>.
- Bickmore, Wendy A., et Bas van Steensel. 2013. « Genome Architecture: Domain Organization of Interphase Chromosomes ». *Cell* 152 (6): 1270-84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.001>.
- Bigot, Jeremy, Ana I. Lalanne, Francesca Lucibello, Paul Gueguen, Alexandre Houy, Stephane Dayot, Olivier Ganier, et al. 2021. « Splicing Patterns in SF3B1-Mutated Uveal Melanoma Generate Shared Immunogenic Tumor-Specific Neoepitopes ». *Cancer Discovery* 11 (8): 1938-51. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0555>.
- Bilmin, Krzysztof, Kamil J. Synoradzki, Anna M. Czarnecka, Mateusz J. Spalek, Tamara Kujawska, Małgorzata Solnik, Piotr Merks, Mario Damiano Toro, Robert Rejdak, et Michał Fiedorowicz. 2021. « New Perspectives for Eye-Sparing Treatment Strategies in Primary Uveal Melanoma ». *Cancers* 14 (1): 134. <https://doi.org/10.3390/cancers14010134>.
- Bird, Adrian. 2002. « DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory ». *Genes & Development* 16 (1): 6-21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>.
- Bird, Adrian, Mary Taggart, Marianne Frommer, Orlando J. Miller, et Donald Macleod. 1985. « A Fraction of the Mouse Genome That Is Derived from Islands of Nonmethylated, CpG-Rich DNA ». *Cell* 40 (1): 91-99. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90312-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90312-5).
- Black, Joshua C., Capucine Van Rechem, et Johnathan R. Whetstine. 2012. « Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact ». *Molecular cell* 48 (4): 10.1016/j.molcel.2012.11.006. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.006>.
- Black, Joshua C., et Johnathan R. Whetstine. 2013. « Tipping the Lysine Methylation Balance in Disease ». *Biopolymers* 99 (2): 10.1002/bip.22136. <https://doi.org/10.1002/bip.22136>.
- Boers, Ruben, Joachim Boers, Bas de Hoon, Christel Kockx, Zeliha Ozgur, Anco Molijn, Wilfred van IJcken, Joop Laven, et Joost Gribnau. 2018. « Genome-wide DNA methylation profiling using the methylation-dependent restriction enzyme LpnPI ». *Genome Research* 28 (1): 88-99. <https://doi.org/10.1101/gr.222885.117>.
- Boix-Montesinos, Paz, Paula M. Soriano-Teruel, Ana Armiñán, Mar Orzáez, et María J. Vicent. 2021. « The Past, Present, and Future of Breast Cancer Models for

- Nanomedicine Development ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 173 (juin): 306-30. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.018>.
- Booth, Michael J., Tobias W. B. Ost, Dario Beraldi, Neil M. Bell, Miguel R. Branco, Wolf Reik, et Shankar Balasubramanian. 2013. « Oxidative Bisulfite Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine ». *Nature Protocols* 8 (10): 1841-51. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.115>.
- Bott, Matthew, Marie Brevet, Barry S. Taylor, Shigeki Shimizu, Tatsuo Ito, Lu Wang, Jenette Creaney, et al. 2011. « The Nuclear Deubiquitinase BAP1 Is Commonly Inactivated by Somatic Mutations and 3p21.1 Losses in Malignant Pleural Mesothelioma ». *Nature Genetics* 43 (7): 668-72. <https://doi.org/10.1038/ng.855>.
- Bottner, Justus, Julika Ribbat-Idel, Luise Klapper, Tobias Jagomast, Anna-Lena Lemster, Sven Perner, Christian Idel, et Jutta Kirfel. 2022. « Elevated LSD1 and SNAIL Expression Indicate Poor Prognosis in Hypopharynx Carcinoma ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (9): 5075. <https://doi.org/10.3390/ijms23095075>.
- Boudjadi, Salah, Bishwanath Chatterjee, Wenyue Sun, Prasantha Vemu, et Frederic G. Barr. 2018. « The expression and function of PAX3 in development and disease ». *Gene* 666 (août): 145-57. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.087>.
- Boyling, Alexandra, Gonzalo Perez-Siles, et Marina L. Kennerson. 2022. « Structural Variation at a Disease Mutation Hotspot: Strategies to Investigate Gene Regulation and the 3D Genome ». *Frontiers in Genetics* 13: 842860. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.842860>.
- Bracken, Adrian P., Nikolaj Dietrich, Diego Pasini, Klaus H. Hansen, et Kristian Helin. 2006. « Genome-Wide Mapping of Polycomb Target Genes Unravels Their Roles in Cell Fate Transitions ». *Genes & Development* 20 (9): 1123-36. <https://doi.org/10.1101/gad.381706>.
- Bradford, Porcia T., Alisa M. Goldstein, Mary L. McMaster, et Margaret A. Tucker. 2009. « Acral Lentiginous Melanoma: Incidence and Survival Patterns in the United States, 1986-2005 ». *Archives of Dermatology* 145 (4): 427-34. <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2008.609>.
- Branham, María T., Matías A. Bustos, Gerardo A. De Blas, Holger Rehmann, Valeria E. P. Zarelli, Claudia L. Treviño, Alberto Darszon, Luis S. Mayorga, et Claudia N. Tomes. 2009. « Epac Activates the Small G Proteins Rap1 and Rab3A to Achieve Exocytosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (37): 24825-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.015362>.
- Bronner, Marianne E., et Nicole M. LeDouarin. 2012. « Development and Evolution of the Neural Crest: An Overview ». *Developmental Biology* 366 (1): 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.042>.
- Brower-Toland, Brent, Nicole C. Riddle, Hongmei Jiang, Kathryn L. Huisinga, et Sarah C. R. Elgin. 2009. « Multiple SET Methyltransferases Are Required to Maintain Normal Heterochromatin Domains in the Genome of *Drosophila*

- Melanogaster ». *Genetics* 181 (4): 1303-19.
<https://doi.org/10.1534/genetics.108.100271>.
- Bulger, Michael, et Mark Groudine. 2011. « Functional and Mechanistic Diversity of Distal Transcription Enhancers ». *Cell* 144 (3): 327-39.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.024>.
- Burri, Nathalie, Phillip Shaw, Hanifa Bouzourene, Isabelle Sordat, Bernard Sordat, Michel Gillet, Daniel Schorderet, Fred T. Bosman, et Pascal Chaubert. 2001. « Methylation Silencing and Mutations of the P14ARF and P16INK4a Genes in Colon Cancer ». *Laboratory Investigation* 81 (2): 217-29.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.3780230>.
- Cairns, Bradley R. 2009. « The Logic of Chromatin Architecture and Remodelling at Promoters ». *Nature* 461 (7261): 193-98. <https://doi.org/10.1038/nature08450>.
- Campagne, Antoine, Ming-Kang Lee, Dina Zielinski, Audrey Michaud, Stéphanie Le Corre, Florent Dingli, Hong Chen, et al. 2019. « BAP1 Complex Promotes Transcription by Opposing PRC1-Mediated H2A Ubiquitylation ». *Nature Communications* 10 (1): 348. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08255-x>.
- Canbezdi, Christine, Malcy Tarin, Alexandre Houy, Dorine Bellanger, Tatiana Popova, Marc-Henri Stern, Sergio Roman-Roman, et Samar Alsafadi. 2021. « Functional and conformational impact of cancer-associated SF3B1 mutations depends on the position and the charge of amino acid substitution ». *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19 (février): 1361-70.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.012>.
- Cao, Fang, Elizabeth C. Townsend, Hacer Karatas, Jing Xu, Li Li, Shirley Lee, Liu Liu, et al. 2014. « Targeting MLL1 H3K4 Methyltransferase Activity in Mixed-Lineage Leukemia ». *Molecular Cell* 53 (2): 247-61.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.001>.
- Cao, Jinfeng, et Martine J. Jager. 2015. « Animal Eye Models for Uveal Melanoma ». *Ocular Oncology and Pathology* 1 (3): 141-50.
<https://doi.org/10.1159/000370152>.
- Cao, Ru, Liangjun Wang, Hengbin Wang, Li Xia, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Richard S. Jones, et Yi Zhang. 2002. « Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing ». *Science (New York, N.Y.)* 298 (5595): 1039-43. <https://doi.org/10.1126/science.1076997>.
- Carita, Guillaume, Estelle Frisch-Dit-Leitz, Ahmed Dahmani, Chloé Raymondie, Nathalie Cassoux, Sophie Piperno-Neumann, Fariba Némati, et al. 2016. « Dual inhibition of protein kinase C and p53-MDM2 or PKC and mTORC1 are novel efficient therapeutic approaches for uveal melanoma ». *Oncotarget* 7 (23): 33542-56.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.9552>.
- Carita, Guillaume, Fariba Némati, et Didier Decaudin. 2015. « Uveal Melanoma Patient-Derived Xenografts ». *Ocular Oncology and Pathology* 1 (3): 161-69.
<https://doi.org/10.1159/000370154>.

- Carty, Sherry M., et Arno L. Greenleaf. 2002. « Hyperphosphorylated C-Terminal Repeat Domain-Associating Proteins in the Nuclear Proteome Link Transcription to DNA/Chromatin Modification and RNA Processing* ». *Molecular & Cellular Proteomics* 1 (8): 598-610. <https://doi.org/10.1074/mcp.M200029-MCP200>.
- Carvajal, Richard D., Sophie Piperno-Neumann, Ellen Kapiteijn, Paul B. Chapman, Stephen Frank, Anthony M. Joshua, Josep M. Piulats, et al. 2018. « Selumetinib in Combination With Dacarbazine in Patients With Metastatic Uveal Melanoma: A Phase III, Multicenter, Randomized Trial (SUMIT) ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (12): 1232-39. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.1090>.
- Cassoux, Nathalie, Manuel Jorge Rodrigues, Corine Plancher, Bernard Asselain, Christine Levy-Gabriel, Livia Lumbroso-Le Rouic, Sophie Piperno-Neumann, et al. 2014. « Genome-Wide Profiling Is a Clinically Relevant and Affordable Prognostic Test in Posterior Uveal Melanoma ». *The British Journal of Ophthalmology* 98 (6): 769-74. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-303867>.
- Ceol, Craig J, Yariv Houvras, Judit Jane-Valbuena, Steve Bilodeau, David A Orlando, Valentine Battisti, Lauriane Fritsch, et al. 2011. « The Histone Methyltransferase SETDB1 Is Recurrently Amplified in Melanoma and Accelerates Its Onset ». *Nature* 471 (7339): 513-17. <https://doi.org/10.1038/nature09806>.
- Chan, Saki, Ernest Lam, Michael Saghbini, Sven Bocklandt, Alex Hastie, Han Cao, Erik Holmlin, et Mark Borodkin. 2018. « Structural Variation Detection and Analysis Using Bionano Optical Mapping ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1833: 193-203. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8666-8_16.
- Chang, A. E., L. H. Karnell, et H. R. Menck. 1998. « The National Cancer Data Base Report on Cutaneous and Noncutaneous Melanoma: A Summary of 84,836 Cases from the Past Decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society ». *Cancer* 83 (8): 1664-78. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19981015\)83:8<1664::aid-cncr23>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19981015)83:8<1664::aid-cncr23>3.0.co;2-g).
- Chang, Melinda Y., Nagesh P. Rao, Barry L. Burgess, Lariza Johnson, et Tara A. McCannel. 2013. « Heterogeneity of Monosomy 3 in Fine Needle Aspiration Biopsy of Choroidal Melanoma ». *Molecular Vision* 19: 1892-1900.
- Chen, Xu, Qiuxia Wu, Philippe Depeille, Peirong Chen, Sophie Thornton, Helen Kalirai, Sarah E. Coupland, Jeroen P. Roose, et Boris C. Bastian. 2017. « RasGRP3 Mediates MAPK Pathway Activation in GNAQ Mutant Uveal Melanoma ». *Cancer Cell* 31 (5): 685-696.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.04.002>.
- Cheng, Ying, Ying Li, Xin Huang, Wenbin Wei, et Yi Qu. 2017. « Expression of EZH2 in uveal melanomas patients and associations with prognosis ». *Oncotarget* 8 (44): 76423-31. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19462>.
- Chepelev, Iouri, Gang Wei, Dara Wangsa, Qingsong Tang, et Keji Zhao. 2012. « Characterization of Genome-Wide Enhancer-Promoter Interactions Reveals

- Co-Expression of Interacting Genes and Modes of Higher Order Chromatin Organization ». *Cell Research* 22 (3): 490-503. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.15>.
- Choi, Jungmin, Zae Young Ryoo, Dong-Hyung Cho, Hyun-Shik Lee, et Hong-Yeoul Ryu. 2021. « Trans-Tail Regulation-Mediated Suppression of Cryptic Transcription ». *Experimental & Molecular Medicine* 53 (11): 1683-88. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00711-x>.
- Choi, Kyoung Moo, Andrew J. Haak, Ana M. Diaz Espinosa, Katherine A. Cummins, Patrick A. Link, Aja Aravamudhan, David K. Wood, et Daniel J. Tschumperlin. 2021. « GPCR-Mediated YAP/TAZ Inactivation in Fibroblasts via EPAC1/2, RAP2C, and MAP4K7 ». *Journal of Cellular Physiology* 236 (11): 7759-74. <https://doi.org/10.1002/jcp.30459>.
- Chokhachi Baradaran, Pooneh, Zuzana Kozovska, Alena Furdova, et Bozena Smolkova. 2020. « Targeting Epigenetic Modifications in Uveal Melanoma ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (15). <https://doi.org/10.3390/ijms21155314>.
- Chong, Phyllis S. Y., Jianbiao Zhou, Lip-Lee Cheong, Shaw-Cheng Liu, Jingru Qian, Tiannan Guo, Siu Kwan Sze, Qi Zeng, et Wee Joo Chng. 2014. « LEO1 Is Regulated by PRL-3 and Mediates Its Oncogenic Properties in Acute Myelogenous Leukemia ». *Cancer Research* 74 (11): 3043-53. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2321>.
- Christensen, Jesper, Karl Agger, Paul A. C. Cloos, Diego Pasini, Simon Rose, Lau Sennels, Juri Rappsilber, Klaus H. Hansen, Anna Elisabetta Salcini, et Kristian Helin. 2007. « RBP2 Belongs to a Family of Demethylases, Specific for Tri-and Dimethylated Lysine 4 on Histone 3 ». *Cell* 128 (6): 1063-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.003>.
- Christopher, Benjamin N., Colleen M. Cebulla, Paul E. Wakely, Frederick H. Davidorf, et Mohamed H. Abdel-Rahman. 2011. « Molecular genetic testing of uveal melanoma from routinely processed and stained cytology specimens ». *Experimental eye research* 93 (5): 720-25. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.09.004>.
- Cichorek, Mirosława, Malgorzata Wachulska, et Aneta Stasiewicz. 2013. « Heterogeneity of Neural Crest-Derived Melanocytes ». *Central European Journal of Biology* 8 (4): 315-30. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0141-1>.
- Cloos, Paul A. C., Jesper Christensen, Karl Agger, Alessio Maiolica, Juri Rappsilber, Torben Antal, Klaus H. Hansen, et Kristian Helin. 2006. « The Putative Oncogene GASC1 Demethylates Tri- and Dimethylated Lysine 9 on Histone H3 ». *Nature* 442 (7100): 307-11. <https://doi.org/10.1038/nature04837>.
- Cochran, Rory L., Karen Cravero, David Chu, Bracha Erlanger, Patricia Valda Toro, Julia A. Beaver, Daniel J. Zabransky, et al. 2014. « Analysis of BRCA2 loss-of-heterozygosity in tumor tissue using droplet digital PCR ». *Human pathology* 45 (7): 1546-50. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.03.013>.

- Cone, Robert E., et Roshan Pais. 2009. « Anterior Chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): An Acute Response to Ocular Insult Protects from Future Immune-Mediated Damage? » *Ophthalmology and Eye Diseases* 1 (novembre): 33-40.
- Conway, Eric, Federico Rossi, Daniel Fernandez-Perez, Eleonora Ponzo, Karin Johanna Ferrari, Marika Zanotti, Daria Manganaro, Simona Rodighiero, Simone Tamburri, et Diego Pasini. 2021. « BAP1 Enhances Polycomb Repression by Counteracting Widespread H2AK119ub1 Deposition and Chromatin Condensation ». *Molecular Cell* 81 (17): 3526. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.06.020>.
- Cooper, Cynthia D., et David W. Raible. 2009. « Mechanisms for Reaching the Differentiated State: Insights from Neural Crest-Derived Melanocytes ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (1): 105-10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.09.008>.
- Cortez, D., G. Stoica, J. H. Pierce, et A. M. Pendergast. 1996. « The BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibits Apoptosis by Activating a Ras-Dependent Signaling Pathway ». *Oncogene* 13 (12): 2589-94.
- Costessi, Adalberto, Nawel Mahrour, Esther Tijchon, Rieka Stunnenberg, Marieke A Stoel, Pascal W Jansen, Dotan Sela, et al. 2011. « The tumour antigen PRAME is a subunit of a Cul2 ubiquitin ligase and associates with active NFY promoters ». *The EMBO Journal* 30 (18): 3786-98. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.262>.
- Coulie, P. G., P. Weynants, F. Lehmann, J. Herman, V. Brichard, T. Wölfel, A. Van Pel, E. De Plaen, F. Brasseur, et T. Boon. 1993. « Genes Coding for Tumor Antigens Recognized by Human Cytolytic T Lymphocytes ». *Journal of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunology: Official Journal of the Society for Biological Therapy* 14 (2): 104-9. <https://doi.org/10.1097/00002371-199308000-00004>.
- Coussy, Florence, Leanne de Koning, Marion Lavigne, Virginie Bernard, Berengere Ouine, Anais Boulai, Rania El Botty, et al. 2019. « A Large Collection of Integrated Genomically Characterized Patient-Derived Xenografts Highlighting the Heterogeneity of Triple-Negative Breast Cancer ». *International Journal of Cancer* 145 (7): 1902-12. <https://doi.org/10.1002/ijc.32266>.
- Cremer, T., et C. Cremer. 2001. « Chromosome Territories, Nuclear Architecture and Gene Regulation in Mammalian Cells ». *Nature Reviews. Genetics* 2 (4): 292-301. <https://doi.org/10.1038/35066075>.
- Cremer, Thomas, Marion Cremer, Steffen Dietzel, Stefan Müller, Irina Solovei, et Stanislav Fakan. 2006. « Chromosome Territories – a Functional Nuclear Landscape ». *Current Opinion in Cell Biology, Nucleus and gene expression*, 18 (3): 307-16. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.04.007>.
- Crépin, Ronan, David Gentien, Angeline Duché, Audrey Rapinat, Cecile Reyes, Fariba Némati, Gérald Massonnet, et al. 2017. « Nanobodies against Surface Biomarkers Enable the Analysis of Tumor Genetic Heterogeneity in Uveal Melanoma Patient-Derived Xenografts ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 30 (3): 317-27. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12577>.

- Creyghton, Menno P., Albert W. Cheng, G. Grant Welstead, Tristan Kooistra, Bryce W. Carey, Eveline J. Steine, Jacob Hanna, et al. 2010. « Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (50): 21931-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016071107>.
- Damato, Bertil, Justyna A. Dopierala, et Sarah E. Coupland. 2010. « Genotypic Profiling of 452 Choroidal Melanomas with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification ». *Clinical Cancer Research* 16 (24): 6083-92. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2076>.
- Dang, Lenny, David W. White, Stefan Gross, Bryson D. Bennett, Mark A. Bittinger, Edward M. Driggers, Valeria R. Fantin, et al. 2009. « Cancer-Associated IDH1 Mutations Produce 2-Hydroxyglutarate ». *Nature* 462 (7274): 739-44. <https://doi.org/10.1038/nature08617>.
- Danielli, Riccardo, Ruggero Ridolfi, Vanna Chiarion-Sileni, Paola Queirolo, Alessandro Testori, Ruth Plummer, Monica Boitano, et al. 2012. « Ipilimumab in Pretreated Patients with Metastatic Uveal Melanoma: Safety and Clinical Efficacy ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 61 (1): 41-48. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1089-0>.
- Davids, L. M., E. du Toit, S. H. Kidson, et G. Todd. 2009. « A Rare Repigmentation Pattern in a Vitiligo Patient: A Clue to an Epidermal Stem-Cell Reservoir of Melanocytes? ». *Clinical and Experimental Dermatology* 34 (2): 246-48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2008.02793.x>.
- Davies, Helen, Graham R. Bignell, Charles Cox, Philip Stephens, Sarah Edkins, Sheila Clegg, Jon Teague, et al. 2002. « Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer ». *Nature* 417 (6892): 949-54. <https://doi.org/10.1038/nature00766>.
- Davis, Carrie A., Benjamin C. Hitz, Cricket A. Sloan, Esther T. Chan, Jean M. Davidson, Idan Gabdank, Jason A. Hilton, et al. 2018. « The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE): Data Portal Update ». *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D794-801. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1081>.
- De Carvalho, D. D., B. P. Mello, W. O. Pereira, et G. P. Amarante-Mendes. 2013. « PRAME/EZH2-Mediated Regulation of TRAIL: A New Target for Cancer Therapy ». *Current Molecular Medicine* 13 (2): 296-304. <https://doi.org/10.2174/156652413804810727>.
- De Luca, Antonella, Riziero Esposito Abate, Anna Maria Rachiglio, Monica Rosaria Maiello, Claudia Esposito, Clorinda Schettino, Francesco Izzo, Guglielmo Nasti, et Nicola Normanno. 2020. « FGFR Fusions in Cancer: From Diagnostic Approaches to Therapeutic Intervention ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (18): 6856. <https://doi.org/10.3390/ijms21186856>.
- De Santa, Francesca, Maria Grazia Totaro, Elena Prosperini, Samuele Notarbartolo, Giuseppe Testa, et Gioacchino Natoli. 2007. « The Histone H3 Lysine-27 Demethylase Jmjd3 Links Inflammation to Inhibition of Polycomb-Mediated

- Gene Silencing ». *Cell* 130 (6): 1083-94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.019>.
- De Waard-Siebinga, I., D. J. Blom, M. Griffioen, P. I. Schrier, E. Hoogendoorn, G. Beverstock, E. H. Danen, et M. J. Jager. 1995. « Establishment and Characterization of an Uveal-Melanoma Cell Line ». *International Journal of Cancer* 62 (2): 155-61. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910620208>.
- Deaton, Aimée M., et Adrian Bird. 2011. « CpG Islands and the Regulation of Transcription ». *Genes & Development* 25 (10): 1010-22. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>.
- Deaton, Aimée M., Shaun Webb, Alastair R. W. Kerr, Robert S. Illingworth, Jacky Guy, Robert Andrews, et Adrian Bird. 2011. « Cell Type-Specific DNA Methylation at Intragenic CpG Islands in the Immune System ». *Genome Research* 21 (7): 1074-86. <https://doi.org/10.1101/gr.118703.110>.
- Decaudin, Didier, Rania El Botty, Béré Diallo, Gerald Massonnet, Justine Fleury, Adnan Naguez, Chloé Raymondie, et al. 2018. « Selumetinib-based therapy in uveal melanoma patient-derived xenografts ». *Oncotarget* 9 (31): 21674-86. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24670>.
- Decaudin, Didier, Estelle Frisch Dit Leitz, Fariba Nemati, Malcy Tarin, Adnan Naguez, Mohamed Zerara, Benjamin Marande, et al. 2020. « Preclinical Evaluation of Drug Combinations Identifies Co-Inhibition of Bcl-2/XL/W and MDM2 as a Potential Therapy in Uveal Melanoma ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 126 (février): 93-103. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.12.012>.
- Dekker, Job, Karsten Rippe, Martijn Dekker, et Nancy Kleckner. 2002. « Capturing Chromosome Conformation ». *Science (New York, N.Y.)* 295 (5558): 1306-11. <https://doi.org/10.1126/science.1067799>.
- Del Bano, Joanie, Rémy Florès-Florès, Emmanuelle Josselin, Armelle Goubard, Laetitia Ganier, Rémy Castellano, Patrick Chames, Daniel Baty, et Brigitte Kerfelec. 2019. « A Bispecific Antibody-Based Approach for Targeting Mesothelin in Triple Negative Breast Cancer ». *Frontiers in Immunology* 10 (juillet): 1593. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01593>.
- Derrien, Anne-Céline, Manuel Rodrigues, Alexandre Eeckhoutte, Stéphane Dayot, Alexandre Houy, Lenha Mobuchon, Sophie Gardrat, et al. 2020. « Germline MBD4 Mutations and Predisposition to Uveal Melanoma ». *Journal of the National Cancer Institute*, avril. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa047>.
- Dessinioti, Clio, Christina Antoniou, Andreas Katsambas, et Alexander J. Stratigos. 2011. « Melanocortin 1 Receptor Variants: Functional Role and Pigmentary Associations ». *Photochemistry and Photobiology* 87 (5): 978-87. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00970.x>.
- de Wit, Elzo, Erica S. M. Vos, Sjoerd J. B. Holwerda, Christian Valdes-Quezada, Marjon J. A. M. Verstegen, Hans Teunissen, Erik Splinter, Patrick J. Wijchers, Peter H. L. Krijger, et Wouter de Laat. 2015. « CTCF Binding Polarity Determines Chromatin

- Looping ». *Molecular Cell* 60 (4): 676-84. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.023>.
- Diaz, Carlos E., Dario Rusciano, Stefan Dithmar, et Hans E. Grossniklaus. 1999. « B16LS9 melanoma cells spread to the liver from the murine ocular posterior compartment (PC) ». *Current Eye Research* 18 (2): 125-29. <https://doi.org/10.1076/ceyr.18.2.125.5380>.
- Dillon, Oliver James, Sebastian Lunke, Zornitza Stark, Alison Yeung, Natalie Thorne, Melbourne Genomics Health Alliance, Clara Gaff, Susan M. White, et Tiong Yang Tan. 2018. « Exome Sequencing Has Higher Diagnostic Yield Compared to Simulated Disease-Specific Panels in Children with Suspected Monogenic Disorders ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 26 (5): 644-51. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0099-1>.
- Dillon, Shane C, Xing Zhang, Raymond C Trievel, et Xiaodong Cheng. 2005. « The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases ». *Genome Biology* 6 (8): 227. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-227>.
- Dixon, Jesse R., Inkyung Jung, Siddarth Selvaraj, Yin Shen, Jessica E. Antosiewicz-Bourget, Ah Young Lee, Zhen Ye, et al. 2015. « Chromatin Architecture Reorganization during Stem Cell Differentiation ». *Nature* 518 (7539): 331-36. <https://doi.org/10.1038/nature14222>.
- Dixon, Jesse R., Siddarth Selvaraj, Feng Yue, Audrey Kim, Yan Li, Yin Shen, Ming Hu, Jun S. Liu, et Bing Ren. 2012. « Topological Domains in Mammalian Genomes Identified by Analysis of Chromatin Interactions ». *Nature* 485 (7398): 376-80. <https://doi.org/10.1038/nature11082>.
- D'Mello, Stacey A. N., Graeme J. Finlay, Bruce C. Baguley, et Marjan E. Askarian-Amiri. 2016. « Signaling Pathways in Melanogenesis ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms17071144>.
- Dogrusöz, Mehmet, Andrea Ruschel Trasel, Jinfeng Cao, Selçuk Çolak, Sake I. van Pelt, Wilma G. M. Kroes, Amina F. A. S. Teunisse, et al. 2019. « Differential Expression of DNA Repair Genes in Prognostically-Favorable versus Unfavorable Uveal Melanoma ». *Cancers* 11 (8): 1104. <https://doi.org/10.3390/cancers11081104>.
- Donaldson-Collier, Maria C., Stephanie Sungalee, Marie Zufferey, Daniele Tavernari, Natalya Katanayeva, Elena Battistello, Marco Mina, et al. 2019. « EZH2 Oncogenic Mutations Drive Epigenetic, Transcriptional, and Structural Changes within Chromatin Domains ». *Nature Genetics* 51 (3): 517-28. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0338-y>.
- Dong, Jixin, Georg Feldmann, Jianbin Huang, Shian Wu, Nailing Zhang, Sarah A. Comerford, Mariana F. Gayyed, Robert A. Anders, Anirban Maitra, et Duoqia Pan. 2007. « Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in Drosophila and Mammals ». *Cell* 130 (6): 1120-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.019>.
- Dopierala, Justyna, Bertil E. Damato, Sarah L. Lake, Azzam F. G. Taktak, et Sarah E. Coupland. 2010. « Genetic Heterogeneity in Uveal Melanoma Assessed by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification ». *Investigative*

- Ophthalmology & Visual Science* 51 (10): 4898-4905.
<https://doi.org/10.1167/iovs.09-5004>.
- Dougall, William C., Sema Kurtulus, Mark J. Smyth, et Ana C. Anderson. 2017. « TIGIT and CD96: New Checkpoint Receptor Targets for Cancer Immunotherapy ». *Immunological Reviews* 276 (1): 112-20. <https://doi.org/10.1111/imr.12518>.
- Downes, Damien J., Alastair L. Smith, Magdalena A. Karpinska, Taras Velychko, Kevin Rue-Albrecht, David Sims, Thomas A. Milne, James O. J. Davies, A. Marieke Oudelaar, et Jim R. Hughes. 2022. « Capture-C: A Modular and Flexible Approach for High-Resolution Chromosome Conformation Capture ». *Nature Protocols* 17 (2): 445-75. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00651-w>.
- Druker, B. J., M. Talpaz, D. J. Resta, B. Peng, E. Buchdunger, J. M. Ford, N. B. Lydon, et al. 2001. « Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia ». *The New England Journal of Medicine* 344 (14): 1031-37. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401>.
- Dubuc, Adrian M., Marc Remke, Andrey Korshunov, Paul A. Northcott, Shing H. Zhan, Maria Mendez-Lago, Marcel Kool, et al. 2013. « Aberrant patterns of H3K4 and H3K27 histone lysine methylation occur across subgroups in medulloblastoma ». *Acta neuropathologica* 125 (3): 373-84. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1070-9>.
- Duciel, Laura, Océane Anezo, Kalpana Mandal, Cécile Laurent, Nathalie Planque, Frédéric M. Coquelle, David Gentien, Jean-Baptiste Manneville, et Simon Saule. 2019. « Protein Tyrosine Phosphatase 4A3 (PTP4A3/PRL-3) Promotes the Aggressiveness of Human Uveal Melanoma through Dephosphorylation of CRMP2 ». *Scientific Reports* 9 (1): 2990. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39643-y>.
- Duncan, Bruce K., et Jeffrey H. Miller. 1980. « Mutagenic Deamination of Cytosine Residues in DNA ». *Nature* 287 (5782): 560-61. <https://doi.org/10.1038/287560a0>.
- Durand, Neva C., James T. Robinson, Muhammad S. Shamim, Ido Machol, Jill P. Mesirov, Eric S. Lander, et Erez Lieberman Aiden. 2016. « Juicebox Provides a Visualization System for Hi-C Contact Maps with Unlimited Zoom ». *Cell Systems* 3 (1): 99-101. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.07.012>.
- Durante, Michael A., Daniel A. Rodriguez, Stefan Kurtenbach, Jeffim N. Kuznetsov, Margaret I. Sanchez, Christina L. Decatur, Helen Snyder, Lynn G. Feun, Alan S. Livingstone, et J. William Harbour. 2020. « Single-Cell Analysis Reveals New Evolutionary Complexity in Uveal Melanoma ». *Nature Communications* 11 (1): 496. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14256-1>.
- Eckner, R., M. E. Ewen, D. Newsome, M. Gerdes, J. A. DeCaprio, J. B. Lawrence, et D. M. Livingston. 1994. « Molecular Cloning and Functional Analysis of the Adenovirus E1A-Associated 300-KD Protein (P300) Reveals a Protein with Properties of a Transcriptional Adaptor ». *Genes & Development* 8 (8): 869-84. <https://doi.org/10.1101/gad.8.8.869>.

- Eden, Amir, François Gaudet, Alpana Waghmare, et Rudolf Jaenisch. 2003. « Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation ». *Science*, avril. <https://doi.org/10.1126/science.1083557>.
- Ehlers, Justis P., et J. William Harbour. 2005. « NBS1 Expression as a Prognostic Marker in Uveal Melanoma ». *Clinical Cancer Research* 11 (5): 1849-53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2054>.
- Ehlers, Justis P., Lori Worley, Michael D. Onken, et J. William Harbour. 2005. « DDEF1 Is Located in an Amplified Region of Chromosome 8q and Is Overexpressed in Uveal Melanoma ». *Clinical Cancer Research* 11 (10): 3609-13. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1941>.
- Ehrlich, M, M A Gama-Sosa, L H Huang, R M Midgett, K C Kuo, R A McCune, et C Gehrke. 1982. « Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. » *Nucleic Acids Research* 10 (8): 2709-21.
- Encinas, Giselly, Veronica Y. Sabelnykova, Eduardo Carneiro de Lyra, Maria Lucia Hirata Katayama, Simone Maistro, Pedro Wilson Mompean de Vasconcellos Valle, Gláucia Fernanda de Lima Pereira, et al. 2018. « Somatic mutations in early onset luminal breast cancer ». *Oncotarget* 9 (32): 22460-79. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25123>.
- Ent, Wietske van der, Claudia Burrello, Amina F. A. S. Teunisse, Bruce R. Ksander, Pieter A. van der Velden, Martine J. Jager, Aart G. Jochemsen, et B. Ewa Snaar-Jagalska. 2014. « Modeling of Human Uveal Melanoma in Zebrafish Xenograft Embryos ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55 (10): 6612-22. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15202>.
- Epping, Mirjam T., Liming Wang, Michael J. Edel, Leone Carlée, Maria Hernandez, et René Bernards. 2005. « The Human Tumor Antigen PRAME Is a Dominant Repressor of Retinoic Acid Receptor Signaling ». *Cell* 122 (6): 835-47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.003>.
- Erler, Jochen, Ruihan Zhang, Loukas Petridis, Xiaolin Cheng, Jeremy C. Smith, et Jörg Langowski. 2014. « The Role of Histone Tails in the Nucleosome: A Computational Study ». *Biophysical Journal* 107 (12): 2911-22. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.10.065>.
- Etchevers, Heather, Elisabeth Dupin, et Nicole Le Douarin. 2018. « The diverse neural crest: from embryology to human pathology ». *Development (Cambridge, England)*. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01851974>.
- Etemadmoghadam, Dariush, Walid J. Azar, Ying Lei, Tania Moujaber, Dale W. Garsed, Catherine J. Kennedy, Sian Fereday, et al. 2017. « EIF1AX and NRAS Mutations Co-Occur and Cooperate in Low-Grade Serous Ovarian Carcinomas ». *Cancer Research* 77 (16): 4268-78. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2224>.
- Ewens, K. G., E. Lalonde, J. Richards-Yutz, C. L. Shields, et A. Ganguly. 2018. « Comparison of Germline versus Somatic BAP1 Mutations for Risk of Metastasis in Uveal Melanoma ». *BMC Cancer* 18 (1): 1172. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5079-x>.

- Feinberg, A. P., et B. Vogelstein. 1983. « Hypomethylation Distinguishes Genes of Some Human Cancers from Their Normal Counterparts ». *Nature* 301 (5895): 89-92. <https://doi.org/10.1038/301089a0>.
- Feldmann, Angelika, Robert Ivanek, Rabih Murr, Dimos Gaidatzis, Lukas Burger, et Dirk Schübeler. 2013. « Transcription Factor Occupancy Can Mediate Active Turnover of DNA Methylation at Regulatory Regions ». *PLOS Genetics* 9 (12): e1003994. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003994>.
- Feng, Xiaodong, Nadia Arang, Damiano Cosimo Rigracciolo, Joo Sang Lee, Huwate Yeerna, Zhiyong Wang, Simone Lubrano, et al. 2019. « A Platform of Synthetic Lethal Gene Interaction Networks Reveals that the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene Controls the Hippo Pathway through FAK ». *Cancer cell* 35 (3): 457-472.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.01.009>.
- Feng, Xiaodong, Maria Sol Degese, Ramiro Iglesias-Bartolome, Jose P. Vaque, Alfredo A. Molinolo, Murilo Rodrigues, M. Raza Zaidi, et al. 2014. « Hippo-Independent Activation of YAP by the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene through a Trio-Regulated Rho GTPase Signaling Circuitry ». *Cancer Cell* 25 (6): 831-45. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.016>.
- Ferguson, Thomas A., et Thomas S. Griffith. 2007. « The Role of Fas Ligand and TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in the Ocular Immune Response ». *Chemical Immunology and Allergy* 92: 140-54. <https://doi.org/10.1159/000099265>.
- Fernandez, Lara P., Roger L. Milne, Guillermo Pita, Uxua Floristan, Elena Sendagorta, Marta Feito, Jose A. Avilés, et al. 2009. « Pigmentation-Related Genes and Their Implication in Malignant Melanoma Susceptibility ». *Experimental Dermatology* 18 (7): 634-42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00846.x>.
- Fernandez, Paula C., Scott R. Frank, Luquan Wang, Marianne Schroeder, Suxing Liu, Jonathan Greene, Andrea Cocito, et Bruno Amati. 2003. « Genomic targets of the human c-Myc protein ». *Genes & Development* 17 (9): 1115-29. <https://doi.org/10.1101/gad.1067003>.
- Field, Matthew G., Christina L. Decatur, Stefan Kurtenbach, Gülçin Gezgin, Pieter A. van der Velden, Martine J. Jager, Kaleigh N. Kozak, et J. William Harbour. 2016. « PRAME as an independent biomarker for metastasis in uveal melanoma ». *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 22 (5): 1234-42. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2071>.
- Field, Matthew G., Michael A. Durante, Christina L. Decatur, Bercin Tarlan, Kristen M. Oelschlager, John F. Stone, Jeffim Kuznetsov, Anne M. Bowcock, Stefan Kurtenbach, et J. William Harbour. 2016. « Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in Class 1 and Class 2 uveal melanomas ». *Oncotarget* 7 (37): 59209-19. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10962>.

- Field, Matthew G., et J. William Harbour. 2014. « Recent developments in prognostic and predictive testing in uveal melanoma ». *Current opinion in ophthalmology* 25 (3): 234-39. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000051>.
- Field, Matthew G., Jeffim N. Kuznetsov, Parker L. Bussies, Louie Z. Cai, Karam A. Alawa, Christina L. Decatur, Stefan Kurtenbach, et J. William Harbour. 2019. « BAP1 Loss Is Associated with DNA Methylomic Repatterning in Highly Aggressive Class 2 Uveal Melanomas ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25 (18): 5663-73. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0366>.
- Figueiredo, Carlos R, Helen Kalirai, Joseph J Sacco, Ricardo A Azevedo, Andrew Duckworth, Joseph R Slupsky, Judy M Coulson, et Sarah E Coupland. 2020. « Loss of BAP1 expression is associated with an immunosuppressive microenvironment in uveal melanoma, with implications for immunotherapy development ». *The Journal of Pathology* 250 (4): 420-39. <https://doi.org/10.1002/path.5384>.
- Figueroa, Maria E., Omar Abdel-Wahab, Chao Lu, Patrick S. Ward, Jay Patel, Alan Shih, Yushan Li, et al. 2010. « Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation ». *Cancer Cell* 18 (6): 553-67. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.015>.
- Filippova, Darya, Rob Patro, Geet Duggal, et Carl Kingsford. 2014. « Identification of Alternative Topological Domains in Chromatin ». *Algorithms for Molecular Biology: AMB* 9: 14. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-9-14>.
- Fitzpatrick, T. B., et A. S. Breathnach. 1963. « [THE EPIDERMAL MELANIN UNIT SYSTEM] ». *Dermatologische Wochenschrift* 147 (mai): 481-89.
- Flavahan, William A., Yotam Drier, Brian B. Liau, Shawn M. Gillespie, Andrew S. Venteicher, Anat O. Stemmer-Rachamimov, Mario L. Suvà, et Bradley E. Bernstein. 2016. « Insulator Dysfunction and Oncogene Activation in IDH Mutant Gliomas ». *Nature* 529 (7584): 110-14. <https://doi.org/10.1038/nature16490>.
- Folberg, Robert, ShriHari S. Kadkol, Shahar Frenkel, Klara Valyi-Nagy, Martine J. Jager, Jacob Pe'er, et Andrew J. Maniotis. 2008. « Authenticating Cell Lines in Ophthalmic Research Laboratories ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (11): 4697-4701. <https://doi.org/10.1167/iov.08-2324>.
- Fornabaio, Giulia, Raymond L. Barnhill, Claire Lugassy, Laurent A. Bontolila, Nathalie Cassoux, Sergio Roman-Roman, Samar Alsafadi, et Filippo Del Bene. 2018. « Angiotropism and Extravascular Migratory Metastasis in Cutaneous and Uveal Melanoma Progression in a Zebrafish Model ». *Scientific Reports* 8 (1): 10448. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28515-6>.
- Frantz, William Tyler, et Craig J Ceol. 2020. « From Tank to Treatment: Modeling Melanoma in Zebrafish ». *Cells* 9 (5): 1289. <https://doi.org/10.3390/cells9051289>.
- Freeman, Jennifer L., George H. Perry, Lars Feuk, Richard Redon, Steven A. McCarroll, David M. Altshuler, Hiroyuki Aburatani, et al. 2006. « Copy Number Variation:

- New Insights in Genome Diversity ». *Genome Research* 16 (8): 949-61. <https://doi.org/10.1101/gr.3677206>.
- French, Christopher A., Isao Miyoshi, Ichiro Kubonishi, Holcombe E. Grier, Antonio R. Perez-Atayde, et Jonathan A. Fletcher. 2003. « BRD4-NUT Fusion Oncogene: A Novel Mechanism in Aggressive Carcinoma ». *Cancer Research* 63 (2): 304-7.
- Frigola, Jordi, Jenny Song, Clare Stirzaker, Rebecca A. Hinshelwood, Miguel A. Peinado, et Susan J. Clark. 2006. « Epigenetic Remodeling in Colorectal Cancer Results in Coordinate Gene Suppression across an Entire Chromosome Band ». *Nature Genetics* 38 (5): 540-49. <https://doi.org/10.1038/ng1781>.
- Fudenberg, Geoffrey, Maxim Imakaev, Carolyn Lu, Anton Goloborodko, Nezar Abdennur, et Leonid A. Mirny. 2016. « Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion ». *Cell Reports* 15 (9): 2038-49. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.085>.
- Fuks, François, Paul J. Hurd, Rachel Deplus, et Tony Kouzarides. 2003. « The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase ». *Nucleic Acids Research* 31 (9): 2305-12.
- Furman, Craig, Sarah M. Short, Romesh R. Subramanian, Bruce R. Zetter, et Thomas M. Roberts. 2002. « DEF-1/ASAP1 Is a GTPase-Activating Protein (GAP) for ARF1 That Enhances Cell Motility through a GAP-Dependent Mechanism ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (10): 7962-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109149200>.
- Furney, Simon J., Malin Pedersen, David Gentien, Amaury G. Dumont, Audrey Rapinat, Laurence Desjardins, Samra Turajlic, et al. 2013. « SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma ». *Cancer discovery* 3 (10): 1122-29. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0330>.
- Gama-Sosa, M A, V A Slagel, R W Trewyn, R Oxenhandler, K C Kuo, C W Gehrke, et M Ehrlich. 1983. « The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. » *Nucleic Acids Research* 11 (19): 6883-94.
- Gandini, Sara, Francesco Sera, Maria Sofia Cattaruzza, Paolo Pasquini, Roberto Zanetti, Cinzia Masini, Peter Boyle, et Carmelo Francesco Melchi. 2005. « Meta-Analysis of Risk Factors for Cutaneous Melanoma: III. Family History, Actinic Damage and Phenotypic Factors ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 41 (14): 2040-59. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.03.034>.
- Gao, Guohong, Aijun Deng, Shan Liang, Shengsheng Liu, Xinyi Fu, Xiaoyan Zhao, et Zhilong Yu. 2022. « Integration of Bulk RNA Sequencing and Single-Cell RNA Sequencing to Reveal Uveal Melanoma Tumor Heterogeneity and Cells Related to Survival ». *Frontiers in Immunology* 13: 898925. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.898925>.
- Gargano, Stacey M., Nitika Badjatia, Yanina Nikolaus, Stephen C. Peiper, et Zi-Xuan Wang. 2021. « Characterization and Clinical Significance of EIF1AX Mutations and Co-Mutations ». *Acta Medica Academica* 50 (1): 4. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.322>.

- Gargett, Tessa, et Michael P. Brown. 2014. « The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells ». *Frontiers in Pharmacology* 5 (octobre): 235. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00235>.
- Geisler, Sarah J., et Renato Paro. 2015. « Trithorax and Polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities ». *Development* 142 (17): 2876-87. <https://doi.org/10.1242/dev.120030>.
- Geissler, E. N., M. A. Ryan, et D. E. Housman. 1988. « The Dominant-White Spotting (W) Locus of the Mouse Encodes the c-Kit Proto-Oncogene ». *Cell* 55 (1): 185-92. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90020-7).
- Gentien, D., O. Kosmider, F. Nguyen-Khac, B. Albaud, A. Rapinat, A. G. Dumont, F. Damm, et al. 2014. « A Common Alternative Splicing Signature Is Associated with SF3B1 Mutations in Malignancies from Different Cell Lineages ». *Leukemia* 28 (6): 1355-57. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.28>.
- Gentien, David, Elnaz Saberi-Ansari, Nicolas Servant, Ariane Jolly, Pierre de la Grange, Fariba Nemati, Geraldine Liot, et al. 2022. « Multi-Omics Comparison of Malignant and Normal Uveal Melanocytes Reveals Novel Molecular Features of Uveal Melanoma ». *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.11.483767>.
- Gezgin, Gülçin, Sietse J. Luk, Jinfeng Cao, Mehmet Dogrusöz, Dirk M. van der Steen, Renate S. Hagedoorn, Daniëlle Krijgsman, et al. 2017. « PRAME as a Potential Target for Immunotherapy in Metastatic Uveal Melanoma ». *JAMA ophthalmology* 135 (6): 541-49. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2017.0729>.
- Gillespie, Marc, Bijay Jassal, Ralf Stephan, Marija Milacic, Karen Rothfels, Andrea Senff-Ribeiro, Johannes Griss, et al. 2022. « The reactome pathway knowledgebase 2022 ». *Nucleic Acids Research* 50 (D1): D687-92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1028>.
- Gilpatrick, Timothy, Isac Lee, James E. Graham, Etienne Raimondeau, Rebecca Bowen, Andrew Heron, Bradley Downs, Saraswati Sukumar, Fritz J. Sedlazeck, et Winston Timp. 2020. « Targeted Nanopore Sequencing with Cas9-Guided Adapter Ligation ». *Nature Biotechnology* 38 (4): 433-38. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0407-5>.
- Gils, Walter van, Elisabeth M. Lodder, Hanneke W. Mensink, Emine Kiliç, Nicole C. Naus, Hennie T. Brüggewirth, Wilfred van IJcken, Dion Paridaens, Gregorius P. Luyten, et Annelies de Klein. 2008. « Gene Expression Profiling in Uveal Melanoma: Two Regions on 3p Related to Prognosis ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (10): 4254-62. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2033>.
- Gisselsson, David, Louise Pettersson, Mattias Höglund, Markus Heidenblad, Ludmila Gorunova, Joop Wiegant, Fredrik Mertens, Paola Dal Cin, Felix Mitelman, et Nils Mandahl. 2000. « Chromosomal Breakage-Fusion-Bridge Events Cause Genetic Intratumor Heterogeneity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (10): 5357-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.090013497>.

- Gleason, Briana C., Christopher P. Crum, et George F. Murphy. 2008. « Expression Patterns of MITF during Human Cutaneous Embryogenesis: Evidence for Bulge Epithelial Expression and Persistence of Dermal Melanoblasts ». *Journal of Cutaneous Pathology* 35 (7): 615-22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2007.00881.x>.
- Gomez, D., C. Wetherill, J. Cheong, L. Jones, E. Marshall, B. Damato, S. E. Coupland, et al. 2014. « The Liverpool Uveal Melanoma Liver Metastases Pathway: Outcome Following Liver Resection ». *Journal of Surgical Oncology* 109 (6): 542-47. <https://doi.org/10.1002/jso.23535>.
- Gonzalez-Perez, Abel, Alba Jene-Sanz, et Nuria Lopez-Bigas. 2013. « The Mutational Landscape of Chromatin Regulatory Factors across 4,623 Tumor Samples ». *Genome Biology* 14 (9): r106. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-9-r106>.
- Gotoh, A., K. Miyazawa, K. Ohyashiki, T. Tauchi, H. S. Boswell, H. E. Broxmeyer, et K. Toyama. 1995. « Tyrosine Phosphorylation and Activation of Focal Adhesion Kinase (P125FAK) by BCR-ABL Oncoprotein ». *Experimental Hematology* 23 (11): 1153-59.
- Greenberg, Maxim V. C., et Deborah Bourc'h. 2019. « The Diverse Roles of DNA Methylation in Mammalian Development and Disease ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 20 (10): 590-607. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0159-6>.
- Greenhill, Emma R., Andrea Rocco, Laura Vibert, Masataka Nikaido, et Robert N. Kelsh. 2011. « An Iterative Genetic and Dynamical Modelling Approach Identifies Novel Features of the Gene Regulatory Network Underlying Melanocyte Development ». *PLoS Genetics* 7 (9): e1002265. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002265>.
- Grewal, Shiv I. S., et Songtao Jia. 2007. « Heterochromatin Revisited ». *Nature Reviews Genetics* 8 (1): 35-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2008>.
- Griewank, Klaus G., Hansgeorg Müller, Louise A. Jakkett, Michael Emberger, Inga Möller, Johannes Ap van de Nes, Lisa Zimmer, et al. 2017. « SF3B1 and BAP1 Mutations in Blue Nevus-like Melanoma ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 30 (7): 928-39. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.23>.
- Griewank, Klaus G., Xiaoxing Yu, Jahan Khalili, M. Mert Sozen, Katherine Stempke-Hale, Chantale Bernatchez, Seth Wardell, Boris C. Bastian, et Scott E. Woodman. 2012. « Genetic and Molecular Characterization of Uveal Melanoma Cell Lines ». *Pigment cell & melanoma research* 25 (2): 182-87. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2012.00971.x>.
- Gumaste, Priyanka V., Nathaniel H. Fleming, Ines Silva, Richard L. Shapiro, Russell S. Berman, Judy Zhong, Iman Osman, et Jennifer A. Stein. 2014. « Analysis of Recurrence Patterns in Acral versus Nonacral Melanoma: Should Histologic Subtype Influence Treatment Guidelines? ». *Journal of the National*

- Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 12 (12): 1706-12.
<https://doi.org/10.6004/jnccn.2014.0172>.
- Guo, Weinan, Huina Wang, et Chunying Li. 2021. « Signal Pathways of Melanoma and Targeted Therapy ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 (1): 1-39.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00827-6>.
- Guo, Ya, Kevin Monahan, Haiyang Wu, Jason Gertz, Katherine E. Varley, Wei Li, Richard M. Myers, Tom Maniatis, et Qiang Wu. 2012. « CTCF/cohesin-mediated DNA looping is required for protocadherin α promoter choice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (51): 21081-86.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1219280110>.
- Guo, Ya, Quan Xu, Daniele Canzio, Jia Shou, Jinhuan Li, David U. Gorkin, Inkyung Jung, et al. 2015. « CRISPR Inversion of CTCF Sites Alters Genome Topology and Enhancer/Promoter Function ». *Cell* 162 (4): 900-910.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.038>.
- Gupta, S K, C Gallego, J M Lowndes, C M Pleiman, C Sable, B J Eisfelder, et G L Johnson. 1992. « Analysis of the fibroblast transformation potential of GTPase-deficient gip2 oncogenes. » *Molecular and Cellular Biology* 12 (1): 190-97.
- Haferlach, T., Y. Nagata, V. Grossmann, Y. Okuno, U. Bacher, G. Nagae, S. Schnittger, et al. 2014. « Landscape of Genetic Lesions in 944 Patients with Myelodysplastic Syndromes ». *Leukemia* 28 (2): 241-47. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.336>.
- Hahn, Maria A., Xiwei Wu, Arthur X. Li, Torsten Hahn, et Gerd P. Pfeifer. 2011. « Relationship between Gene Body DNA Methylation and Intragenic H3K9me3 and H3K36me3 Chromatin Marks ». *PLOS ONE* 6 (4): e18844.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018844>.
- Han, Sue, Yang Liu, Sabrina J. Cai, Mingyu Qian, Jianyi Ding, Mioara Larion, Mark R. Gilbert, et Chunzhang Yang. 2020. « IDH Mutation in Glioma: Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Targets ». *British Journal of Cancer* 122 (11): 1580-89. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0814-x>.
- Hanahan, Douglas. 2022. « Hallmarks of Cancer: New Dimensions ». *Cancer Discovery* 12 (1): 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Haqq, Christopher, Mehdi Nosrati, Daniel Sudilovsky, Julia Crothers, Daniel Khodabakhsh, Brian L. Pulliam, Scot Federman, et al. 2005. « The gene expression signatures of melanoma progression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (17): 6092-97.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0501564102>.
- Harbour, J. William. 2014. « A Prognostic Test to Predict the Risk of Metastasis in Uveal Melanoma Based on a 15-Gene Expression Profile ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1102: 427-40. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-727-3_22.

- Harbour, J. William, Michael D. Onken, Elisha D. O. Roberson, Shenghui Duan, Li Cao, Lori A. Worley, M. Laurin Council, Katie A. Matatall, Cynthia Helms, et Anne M. Bowcock. 2010. « Frequent Mutation of BAP1 in Metastasizing Uveal Melanomas ». *Science (New York, N.Y.)* 330 (6009): 1410-13. <https://doi.org/10.1126/science.1194472>.
- Harbour, J. William, Elisha D. O. Roberson, Hima Anbunathan, Michael D. Onken, Lori A. Worley, et Anne M. Bowcock. 2013. « Recurrent Mutations at Codon 625 of the Splicing Factor SF3B1 in Uveal Melanoma ». *Nature Genetics* 45 (2): 133-35. <https://doi.org/10.1038/ng.2523>.
- Hari, Lisette, Iris Miescher, Olga Shakhova, Ueli Suter, Lynda Chin, Makoto Taketo, William D. Richardson, Nicoletta Kessaris, et Lukas Sommer. 2012. « Temporal Control of Neural Crest Lineage Generation by Wnt/ β -Catenin Signaling ». *Development (Cambridge, England)* 139 (12): 2107-17. <https://doi.org/10.1242/dev.073064>.
- Harper, Jane, Katherine J. Adams, Giovanna Bossi, Debbie E. Wright, Andrea R. Stacey, Nicole Bedke, Ruth Martinez-Hague, et al. 2018. « An Approved in Vitro Approach to Preclinical Safety and Efficacy Evaluation of Engineered T Cell Receptor Anti-CD3 Bispecific (ImmTAC) Molecules ». *PloS One* 13 (10): e0205491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205491>.
- Harris, Melissa L., et Carol A. Erickson. 2007. « Lineage Specification in Neural Crest Cell Pathfinding ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 236 (1): 1-19. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20919>.
- Hartwell, Leland. 1992. « Defects in a Cell Cycle Checkpoint May Be Responsible for the Genomic Instability of Cancer Cells ». *Cell* 71 (4): 543-46. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90586-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90586-2).
- Hawkins, R. David, Gary C. Hon, Leonard K. Lee, Queminh Ngo, Ryan Lister, Mattia Pelizzola, Lee E. Edsall, et al. 2010. « Distinct Epigenomic Landscapes of Pluripotent and Lineage-Committed Human Cells ». *Cell Stem Cell* 6 (5): 479-91. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.018>.
- Hayward, Nicholas K., James S. Wilmott, Nicola Waddell, Peter A. Johansson, Matthew A. Field, Katia Nones, Ann-Marie Patch, et al. 2017. « Whole-Genome Landscapes of Major Melanoma Subtypes ». *Nature* 545 (7653): 175-80. <https://doi.org/10.1038/nature22071>.
- He, Aibin, Xiaohua Shen, Qing Ma, Jingjing Cao, Alexander von Gise, Pingzhu Zhou, Gang Wang, Victor E. Marquez, Stuart H. Orkin, et William T. Pu. 2012. « PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity ». *Genes & Development* 26 (1): 37-42. <https://doi.org/10.1101/gad.173930.111>.
- He, Shu-Jie, Graham Stevens, Antony W. Braithwaite, et Michael R. Eccles. 2005. « Transfection of Melanoma Cells with Antisense PAX3 Oligonucleotides Additively Complements Cisplatin-Induced Cytotoxicity ». *Molecular Cancer Therapeutics* 4 (6): 996-1003. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0252>.

- Heeringen, Simon J. van, Robert C. Akkers, Ila van Kruijsbergen, M. Asif Arif, Lars L.P. Hanssen, Nilofar Sharifi, et Gert Jan C. Veenstra. 2014. « Principles of nucleation of H3K27 methylation during embryonic development ». *Genome Research* 24 (3): 401-10. <https://doi.org/10.1101/gr.159608.113>.
- Heijkants, R. C., M. Nieveen, K. C.'t Hart, A. F. A. S. Teunisse, et A. G. Jochemsen. 2018. « Targeting MDMX and PKC δ to improve current uveal melanoma therapeutic strategies ». *Oncogenesis* 7 (3): 33. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0041-y>.
- Heintzman, Nathaniel D., Rhona K. Stuart, Gary Hon, Yutao Fu, Christina W. Ching, R. David Hawkins, Leah O. Barrera, et al. 2007. « Distinct and Predictive Chromatin Signatures of Transcriptional Promoters and Enhancers in the Human Genome ». *Nature Genetics* 39 (3): 311-18. <https://doi.org/10.1038/ng1966>.
- Helsten, Teresa, Sheryl Elkin, Elisa Arthur, Brett N. Tomson, Jennifer Carter, et Razelle Kurzrock. 2016. « The FGFR Landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 22 (1): 259-67. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3212>.
- Herraiz, Cecilia, Jose C Garcia-Borron, Celia Jiménez-Cervantes, et Conchi Olivares. 2017. « MC1R Signaling. Intracellular Partners and Pathophysiological Implications ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Melanocortin Receptors*, 1863 (10, Part A): 2448-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.027>.
- Heyn, Holger, Enrique Vidal, Humberto J. Ferreira, Miguel Vizoso, Sergi Sayols, Antonio Gomez, Sebastian Moran, et al. 2016. « Epigenomic analysis detects aberrant super-enhancer DNA methylation in human cancer ». *Genome Biology* 17: 11. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0879-2>.
- Hillringhaus, Lars, Wyatt W. Yue, Nathan R. Rose, Stanley S. Ng, Carina Gileadi, Christoph Loenarz, Simon H. Bello, James E. Bray, Christopher J. Schofield, et Udo Oppermann. 2011. « Structural and Evolutionary Basis for the Dual Substrate Selectivity of Human KDM4 Histone Demethylase Family ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (48): 41616-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.283689>.
- Hirobe, Tomohisa. 2011. « How Are Proliferation and Differentiation of Melanocytes Regulated? ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 24 (3): 462-78. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00845.x>.
- Hirotsu, Yosuke, Hitoshi Yokoyama, Kenji Amemiya, Takashi Hagimoto, Hironori Daimon, Kyoko Hosaka, Toshio Oyama, Hitoshi Mochizuki, et Masao Omata. 2019. « Genomic profile of urine has high diagnostic sensitivity compared to cytology in non-invasive urothelial bladder cancer ». *Cancer Science* 110 (10): 3235-43. <https://doi.org/10.1111/cas.14155>.
- Hirotsu, Yosuke, Hitoshi Yokoyama, Kenji Amemiya, Takashi Hagimoto, Kyoko Hosaka, Toshio Oyama, Hitoshi Mochizuki, et Masao Omata. 2020. « Genomic Profiling Identified ERCC2 E606Q Mutation in Helicase Domain Respond to Platinum-

- Based Neoadjuvant Therapy in Urothelial Bladder Cancer ». *Frontiers in Oncology* 10 (août): 1643. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01643>.
- Hnisz, Denes, Brian J. Abraham, Tong Ihn Lee, Ashley Lau, Violaine Saint-André, Alla A. Sigova, Heather A. Hoke, et Richard A. Young. 2013. « Super-Enhancers in the Control of Cell Identity and Disease ». *Cell* 155 (4): 934-47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.053>.
- Hobbs, G. Aaron, Channing J. Der, et Kent L. Rossman. 2016. « RAS isoforms and mutations in cancer at a glance ». *Journal of Cell Science* 129 (7): 1287-92. <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>.
- Holliday, R., et J. E. Pugh. 1975. « DNA Modification Mechanisms and Gene Activity during Development ». *Science (New York, N.Y.)* 187 (4173): 226-32.
- Holmgaard, Rikke B., Dmitriy Zamarin, David H. Munn, Jedd D. Wolchok, et James P. Allison. 2013. « Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is a Critical Resistance Mechanism in Antitumor T Cell Immunotherapy Targeting CTLA-4 ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (7): 1389-1402. <https://doi.org/10.1084/jem.20130066>.
- Holt, Richard, Nuala H. Sykes, Inês C. Conceição, Jean-Baptiste Cazier, Richard J. L. Anney, Guiomar Oliveira, Louise Gallagher, Astrid Vicente, Anthony P. Monaco, et Alistair T. Pagnamenta. 2012. « CNVs Leading to Fusion Transcripts in Individuals with Autism Spectrum Disorder ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 20 (11): 1141-47. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.73>.
- Holzer, Philipp, Keiichi Masuya, Pascal Furet, Joerg Kallen, Therese Valat-Stachyra, Stéphane Ferretti, Joerg Berghausen, et al. 2015. « Discovery of a Dihydroisoquinolinone Derivative (NVP-CGM097): A Highly Potent and Selective MDM2 Inhibitor Undergoing Phase 1 Clinical Trials in P53wt Tumors ». *Journal of Medicinal Chemistry* 58 (16): 6348-58. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00810>.
- Honda, Takaya, Masayoshi Yamaoka, Yoko Mikami Terao, Daisuke Hasegawa, Tadashi Kumamoto, Masatoshi Takagi, Kenichi Yoshida, Seishi Ogawa, Hiroaki Goto, et Masaharu Akiyama. 2022. « Successful Treatment of Hepatosplenic T-Cell Lymphoma with Fludarabine, High-Dose Cytarabine and Subsequent Unrelated Umbilical Cord Blood Transplantation ». *International Journal of Hematology* 115 (1): 140-45. <https://doi.org/10.1007/s12185-021-03229-0>.
- Horsman, D. E., et V. A. White. 1993. « Cytogenetic Analysis of Uveal Melanoma. Consistent Occurrence of Monosomy 3 and Trisomy 8q ». *Cancer* 71 (3): 811-19. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930201\)71:3<811::aid-cncr2820710325>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930201)71:3<811::aid-cncr2820710325>3.0.co;2-f).
- Horton, John R., Anup K. Upadhyay, Hank H. Qi, Xing Zhang, Yang Shi, et Xiaodong Cheng. 2010. « Enzymatic and Structural Insights for Substrate Specificity of a Family of Jumonji Histone Lysine Demethylases ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (1): 38-43. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1753>.

- Hotchkiss, R. D. 1948. « The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography ». *The Journal of Biological Chemistry* 175 (1): 315-32.
- Hu, Dan-Ning. 2005. « Photobiology of Ocular Melanocytes and Melanoma ». *Photochemistry and Photobiology* 81 (3): 506-9. <https://doi.org/10.1562/2004-08-24-IR-289>.
- Hu, Dan-Ning, John D. Simon, et Tadeusz Sarna. 2008. « Role of Ocular Melanin in Ophthalmic Physiology and Pathology ». *Photochemistry and Photobiology* 84 (3): 639-44. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00316.x>.
- Hua, Kuo-Tai, Ming-Yang Wang, Min-Wei Chen, Lin-Hung Wei, Chi-Kuan Chen, Ching-Huai Ko, Yung-Ming Jeng, et al. 2014. « The H3K9 methyltransferase G9a is a marker of aggressive ovarian cancer that promotes peritoneal metastasis ». *Molecular Cancer* 13 (1): 189. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-189>.
- Huang, Jenny Li-Ying, Oscar Urtatiz, et Catherine D. Van Raamsdonk. 2015. « Oncogenic G Protein GNAQ Induces Uveal Melanoma and Intravasation in Mice ». *Cancer Research* 75 (16): 3384-97. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3229>.
- Huang, Sida, Jian Song, Chufeng He, Xinzhang Cai, Kai Yuan, Lingyun Mei, et Yong Feng. 2021. « Genetic Insights, Disease Mechanisms, and Biological Therapeutics for Waardenburg Syndrome ». *Gene Therapy*, février. <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00240-2>.
- Hurbain, Ilse, Willie J. C. Geerts, Thomas Boudier, Sergio Marco, Arie J. Verkleij, Michael S. Marks, et Graç Raposo. 2008. « Electron Tomography of Early Melanosomes: Implications for Melanogenesis and the Generation of Fibrillar Amyloid Sheets ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (50): 19726-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803488105>.
- Hyun, Kwangbeom, Jongcheol Jeon, Kihyun Park, et Jaehoon Kim. 2017. « Writing, Erasing and Reading Histone Lysine Methylations ». *Experimental & Molecular Medicine* 49 (4): e324-e324. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>.
- Ibarrola-Villava, M., M. Martin-Gonzalez, P. Lazaro, A. Pizarro, A. Lluch, et G. Ribas. 2012. « Role of Glutathione S-Transferases in Melanoma Susceptibility: Association with GSTP1 Rs1695 Polymorphism ». *The British Journal of Dermatology* 166 (6): 1176-83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10831.x>.
- Ikeda, Hideyuki, Bernard Lethé, Frédéric Lehmann, Nicolas Van Baren, Jean-François Baurain, Charles De Smet, Hervé Chambost, et al. 1997. « Characterization of an Antigen That Is Recognized on a Melanoma Showing Partial HLA Loss by CTL Expressing an NK Inhibitory Receptor ». *Immunity* 6 (2): 199-208. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80426-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80426-4).
- Iles, Mark M., Matthew H. Law, Simon N. Stacey, Jiali Han, Shenyang Fang, Ruth Pfeiffer, Mark Harland, et al. 2013. « A Variant in FTO Shows Association with Melanoma Risk Not Due to BMI ». *Nature Genetics* 45 (4): 428-32, 432e1. <https://doi.org/10.1038/ng.2571>.

- Illingworth, Robert S., et Adrian P. Bird. 2009. « CpG Islands--'a Rough Guide' ». *FEBS Letters* 583 (11): 1713-20. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012>.
- Illingworth, Robert S., Ulrike Gruenewald-Schneider, Shaun Webb, Alastair R. W. Kerr, Keith D. James, Daniel J. Turner, Colin Smith, David J. Harrison, Robert Andrews, et Adrian P. Bird. 2010. « Orphan CpG Islands Identify Numerous Conserved Promoters in the Mammalian Genome ». *PLoS Genetics* 6 (9): e1001134. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001134>.
- Ishi, Yukitomo, Yongzhan Zhang, Ali Zhang, Takahiro Sasaki, Andrea Piunti, Amreena Suri, Jun Watanabe, et al. 2022. « Therapeutic Targeting of EZH2 and BET BRD4 in Pediatric Rhabdoid Tumors ». *Molecular Cancer Therapeutics* 21 (5): 715-26. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-21-0646>.
- Jager, Martine J., J. Antonio Bermudez Magner, Bruce R. Ksander, et Sander R. Dubovy. 2016. « Uveal Melanoma Cell Lines: Where Do They Come from? (An American Ophthalmological Society Thesis) ». *Transactions of the American Ophthalmological Society* 114 (août): T5.
- Jensen, D. E., M. Proctor, S. T. Marquis, H. P. Gardner, S. I. Ha, L. A. Chodosh, A. M. Ishov, et al. 1998. « BAP1: A Novel Ubiquitin Hydrolase Which Binds to the BRCA1 RING Finger and Enhances BRCA1-Mediated Cell Growth Suppression ». *Oncogene* 16 (9): 1097-1112. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201861>.
- Jia, Yuemeng, Zhongqiu Xie, et Hui Li. 2016. « Intergenically Spliced Chimeric RNAs in Cancer ». *Trends in cancer* 2 (9): 475-84. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.07.006>.
- Jin, Shi, Shoubo Cao, Jianhua Li, Qingwei Meng, Chunyan Wang, Lei Yao, Yaoguo Lang, et al. 2018. « Cancer/Testis Antigens (CTAs) Expression in Resected Lung Cancer ». *OncoTargets and Therapy* 11 (août): 4491-99. <https://doi.org/10.2147/OTT.S159491>.
- Jjing, Daudi, Andrew B. Conley, Soojin V. Yi, Victoria V. Lunyak, et I. King Jordan. 2012. « On the Presence and Role of Human Gene-Body DNA Methylation ». *Oncotarget* 3 (4): 462-74. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.497>.
- Johansson, Peter A., Andrew Stark, Jane M. Palmer, Kieron Bigby, Kelly Brooks, Olivia Rolfe, Antonia L. Pritchard, et al. 2019. « Prolonged Stable Disease in a Uveal Melanoma Patient with Germline MBD4 Nonsense Mutation Treated with Pembrolizumab and Ipilimumab ». *Immunogenetics* 71 (5-6): 433-36. <https://doi.org/10.1007/s00251-019-01108-x>.
- Johansson, Peter, Lauren G. Aoude, Karin Wadt, William J. Glasson, Sunil K. Warrier, Alex W. Hewitt, Jens Folke Kiilgaard, et al. 2015. « Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in PLCB4 ». *Oncotarget* 7 (4): 4624-31. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6614>.
- Jones, David TW, Natalie Jäger, Marcel Kool, Thomas Zichner, Barbara Hutter, Marc Sultan, Yoon-Jae Cho, et al. 2012. « ICGC PedBrain: Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma ». *Nature* 488 (7409): 100-105. <https://doi.org/10.1038/nature11284>.

- Kahles, André, Kjong-Van Lehmann, Nora C. Toussaint, Matthias Hüser, Stefan G. Stark, Timo Sachsenberg, Oliver Stegle, et al. 2018. « Comprehensive Analysis of Alternative Splicing Across Tumors from 8,705 Patients ». *Cancer Cell* 34 (2): 211-224.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.001>.
- Kalinec, G, A J Nazarali, S Hermouet, N Xu, et J S Gutkind. 1992. « Mutated alpha subunit of the Gq protein induces malignant transformation in NIH 3T3 cells. » *Molecular and Cellular Biology* 12 (10): 4687-93.
- Kan, Pu-Yeh, et Jeffrey J. Hayes. 2007. « Detection of Interactions between Nucleosome Arrays Mediated by Specific Core Histone Tail Domains ». *Methods, Methods Related to the Structure and Function of Eukaryotic Chromatin*, 41 (3): 278-85. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.08.012>.
- Kandoth, Cyriac, Michael D. McLellan, Fabio Vandin, Kai Ye, Beifang Niu, Charles Lu, Mingchao Xie, et al. 2013. « Mutational landscape and significance across 12 major cancer types ». *Nature* 502 (7471): 333-39. <https://doi.org/10.1038/nature12634>.
- Kanehisa, M., et S. Goto. 2000. « KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ». *Nucleic Acids Research* 28 (1): 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
- Kang, Yujin, Yea Woon Kim, Jin Kang, et AeRi Kim. 2021. « Histone H3K4me1 and H3K27ac Play Roles in Nucleosome Eviction and ERNA Transcription, Respectively, at Enhancers ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (8): e21781. <https://doi.org/10.1096/fj.202100488R>.
- Kan-Mitchell, J., M. S. Mitchell, N. Rao, et P. E. Liggett. 1989. « Characterization of Uveal Melanoma Cell Lines That Grow as Xenografts in Rabbit Eyes ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 30 (5): 829-34.
- Karatas, Hacer, Elizabeth C. Townsend, Fang Cao, Yong Chen, Denzil Bernard, Liu Liu, Ming Lei, Yali Dou, et Shaomeng Wang. 2013. « High-Affinity, Small-Molecule Peptidomimetic Inhibitors of MLL1/WDR5 Protein-Protein Interaction ». *Journal of the American Chemical Society* 135 (2): 669-82. <https://doi.org/10.1021/ja306028q>.
- Karsai, Gergely, Florian Kraft, Natja Haag, G. Christoph Korenke, Benjamin Hänisch, Alaa Othman, Saranya Suriyanarayanan, et al. s. d. « DEGS1-associated aberrant sphingolipid metabolism impairs nervous system function in humans ». *The Journal of Clinical Investigation* 129 (3): 1229-39. <https://doi.org/10.1172/JCI124159>.
- Karunamurthy, Arivarasan, Federica Panebianco, Susan J. Hsiao, Jennie Vorhauer, Marina N. Nikiforova, Simion Chiosea, et Yuri E. Nikiforov. 2016. « Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules ». *Endocrine-related cancer* 23 (4): 295-301. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0043>.
- Kassis, Judith A., James A. Kennison, et John W. Tamkun. 2017. « Polycomb and Trithorax Group Genes in Drosophila ». *Genetics* 206 (4): 1699-1725. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185116>.

- Khalili, Jahan S., Xiaoxing Yu, Ji Wang, Brendan C. Hayes, Michael A. Davies, Gregory Lizee, Bitá Esmali, et Scott E. Woodman. 2012. « Combination Small Molecule MEK and PI3K Inhibition Enhances Uveal Melanoma Cell Death in a Mutant GNAQ and GNA11 Dependent Manner ». *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (16): 4345-55. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3227>.
- Kilic, Emine, Walter van Gils, Elisabeth Lodder, H. Berna Beverloo, Marjan E. van Til, Cornelia M. Mooy, Dion Paridaens, Annelies de Klein, et Gregorius P. M. Luyten. 2006. « Clinical and Cytogenetic Analyses in Uveal Melanoma ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47 (9): 3703-7. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0101>.
- Kim, Eunhee, Janine O. Ilagan, Yang Liang, Gerrit M. Daubner, Stanley C.-W. Lee, Aravind Ramakrishnan, Yue Li, et al. 2015. « SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia Through Mutant-Specific Effects on Exon Recognition ». *Cancer cell* 27 (5): 617-30. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.04.006>.
- Kim, Eunhee, Misuk Kim, Dong-Hun Woo, Yongjae Shin, Jihye Shin, Nakho Chang, Young Taek Oh, et al. 2013. « Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells ». *Cancer Cell* 23 (6): 839-52. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.008>.
- Kim, Jung, Yongik Lee, Xiaodong Lu, Bing Song, Ka-Wing Fong, Qi Cao, Jonathan D. Licht, Jonathan C. Zhao, et Jindan Yu. 2018. « Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator ». *Cell Reports* 25 (10): 2808-2820.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.035>.
- Kim, Kimberly H., et Charles W. M. Roberts. 2016. « Targeting EZH2 in Cancer ». *Nature Medicine* 22 (2): 128-34. <https://doi.org/10.1038/nm.4036>.
- Kirby, Daniel B. 1929. « Tissue Culture in Ophthalmic Research ». *Transactions of the American Ophthalmological Society* 27: 334-83.
- Klose, Robert J., et Adrian P. Bird. 2006. « Genomic DNA Methylation: The Mark and Its Mediators ». *Trends in Biochemical Sciences* 31 (2): 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.12.008>.
- Klose, Robert J., Kenichi Yamane, Yangjin Bae, Dianzheng Zhang, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Jiemin Wong, et Yi Zhang. 2006. « The Transcriptional Repressor JHDM3A Demethylates Trimethyl Histone H3 Lysine 9 and Lysine 36 ». *Nature* 442 (7100): 312-16. <https://doi.org/10.1038/nature04853>.
- Knezevich, S. R., D. E. McFadden, W. Tao, J. F. Lim, et P. H. Sorensen. 1998. « A Novel ETV6-NTRK3 Gene Fusion in Congenital Fibrosarcoma ». *Nature Genetics* 18 (2): 184-87. <https://doi.org/10.1038/ng0298-184>.
- Koning, Leanne de, Didier Decaudin, Rania El Botty, André Nicolas, Guillaume Carita, Mathieu Schuller, Bérengère Ouine, et al. 2019. « PARP Inhibition Increases the Response to Chemotherapy in Uveal Melanoma ». *Cancers* 11 (6). <https://doi.org/10.3390/cancers11060751>.

- Kooij, M. K. van der, A. Joosse, F. M. Speetjens, G. a. P. Hospers, C. Bisschop, J. W. B. de Groot, R. Koornstra, C. U. Blank, et E. Kapiteijn. 2017. « Anti-PD1 Treatment in Metastatic Uveal Melanoma in the Netherlands ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 56 (1): 101-3. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2016.1260773>.
- Koopmans, Anna E., Robert M. Verdijk, Rutger W. W. Brouwer, Thierry P. P. van den Bosch, Mike M. P. van den Berg, Jolanda Vaarwater, Christel E. M. Kockx, et al. 2014. « Clinical Significance of Immunohistochemistry for Detection of BAP1 Mutations in Uveal Melanoma ». *Modern Pathology* 27 (10): 1321-30. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.43>.
- Kopanos, Christos, Vasilis Tsiolkas, Alexandros Kouris, Charles E Chapple, Monica Albarca Aguilera, Richard Meyer, et Andreas Massouras. 2019. « VarSome: the human genomic variant search engine ». *Bioinformatics* 35 (11): 1978-80. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>.
- Kosak, Steven T., et Mark Groudine. 2004. « Gene Order and Dynamic Domains ». *Science* 306 (5696): 644-47. <https://doi.org/10.1126/science.1103864>.
- Kress, Theresia R., Arianna Sabò, et Bruno Amati. 2015. « MYC: Connecting Selective Transcriptional Control to Global RNA Production ». *Nature Reviews Cancer* 15 (10): 593-607. <https://doi.org/10.1038/nrc3984>.
- Kujala, Emma, Teemu Mäkitie, et Tero Kivelä. 2003. « Very Long-Term Prognosis of Patients with Malignant Uveal Melanoma ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44 (11): 4651-59. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0538>.
- Kulis, Marta, Simon Heath, Marina Bibikova, Ana C. Queirós, Alba Navarro, Guillem Clot, Alejandra Martínez-Trillos, et al. 2012. « Epigenomic Analysis Detects Widespread Gene-Body DNA Hypomethylation in Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Nature Genetics* 44 (11): 1236-42. <https://doi.org/10.1038/ng.2443>.
- Kumar, Dhirendra, Senthilkumar Cinghu, Andrew J. Oldfield, Pengyi Yang, et Raja Jothi. 2021. « Decoding the function of bivalent chromatin in development and cancer ». *Genome Research* 31 (12): 2170-84. <https://doi.org/10.1101/gr.275736.121>.
- Kumar, Naveen, Peeyush Prasad, Eshna Jash, Megha Saini, Amjad Husain, Aaron Goldman, et Seema Sehrawat. 2018. « Insights into Exchange Factor Directly Activated by CAMP (EPAC) as Potential Target for Cancer Treatment ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 447 (1-2): 77-92. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3294-z>.
- Kumar, Rajesh, Gandharva Nagpal, Vinod Kumar, Salman Sadullah Usmani, Piyush Agrawal, et Gajendra P. S. Raghava. 2019. « HumCFS: a database of fragile sites in human chromosomes ». *BMC Genomics* 19 (Suppl 9): 985. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5330-5>.
- Kurosaki, Tatsuki, Maximilian W. Popp, et Lynne E. Maquat. 2019. « Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 20 (7): 406-20. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0126-2>.

- Kuznetsov, Jeffim N., Tristan H. Agüero, Dawn A. Owens, Stefan Kurtenbach, Matthew G. Field, Michael A. Durante, Daniel A. Rodriguez, Mary Lou King, et J. William Harbour. 2019. « BAP1 regulates epigenetic switch from pluripotency to differentiation in developmental lineages giving rise to BAP1-mutant cancers ». *Science Advances* 5 (9). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1738>.
- LaDuca, Holly, Eric C. Polley, Amal Yussuf, Lily Hoang, Stephanie Gutierrez, Steven N. Hart, Siddhartha Yadav, et al. 2020. « A Clinical Guide to Hereditary Cancer Panel Testing: Evaluation of Gene-Specific Cancer Associations and Sensitivity of Genetic Testing Criteria in a Cohort of 165,000 High-Risk Patients ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 22 (2): 407-15. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0633-8>.
- LaFave, Lindsay M., Wendy Béguelin, Richard Koche, Matt Teater, Barbara Spitzer, Alan Chramiec, Efthymia Papalexi, et al. 2015. « Loss of BAP1 function leads to EZH2-dependent transformation ». *Nature medicine* 21 (11): 1344-49. <https://doi.org/10.1038/nm.3947>.
- Lafontaine, Denis L., Liyan Yang, Job Dekker, et Johan H. Gibcus. 2021. « Hi-C 3.0: Improved Protocol for Genome-Wide Chromosome Conformation Capture ». *Current Protocols* 1 (7): e198. <https://doi.org/10.1002/cpz1.198>.
- Lam, Ernest T, Alex Hastie, Chin Lin, Dean Ehrlich, Somes K Das, Michael D Austin, Paru Deshpande, et al. 2012. « Genome mapping on nanochannel arrays for structural variation analysis and sequence assembly ». *Nature biotechnology* 30 (8): 10.1038/nbt.2303. <https://doi.org/10.1038/nbt.2303>.
- Lange, Job de, Amina FAS Teunisse, Matty Verlaan-de Vries, Kirsten Lodder, Suzanne Lam, Gregorius PM Luyten, Federico Bernal, Martine J Jager, et Aart G Jochemsen. 2012. « High levels of Hdmx promote cell growth in a subset of uveal melanomas ». *American Journal of Cancer Research* 2 (5): 492-507.
- Lania, Andrea G., Giovanna Mantovani, et Anna Spada. 2006. « Mechanisms of Disease: Mutations of G Proteins and G-Protein-Coupled Receptors in Endocrine Diseases ». *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 2 (12): 681-94.
- Larsen, F., G. Gundersen, R. Lopez, et H. Prydz. 1992. « CpG Islands as Gene Markers in the Human Genome ». *Genomics* 13 (4): 1095-1107. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90024-m](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90024-m).
- Larson, Richard A, Koji Kondo, James W Vardiman, Ann E Butler, Harvey M Golomb, et Janet D Rowley. 1984. « Evidence for a 15; 17 Translocation in Every Patient with Acute Promyelocytic Leukemia ». *The American Journal of Medicine* 76 (5): 827-41. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(84\)90994-X](https://doi.org/10.1016/0002-9343(84)90994-X).
- Laurent, Cécile, David Gentien, Sophie Piperno-Neumann, Fariba Némati, André Nicolas, Bruno Tesson, Laurence Desjardins, et al. 2013. « Patient-Derived Xenografts Recapitulate Molecular Features of Human Uveal Melanomas ». *Molecular Oncology* 7 (3): 625-36. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.004>.

- Laurent, Cécile, Fabien Valet, Nathalie Planque, Licia Silveri, Selma Maacha, Océane Anezo, Philippe Hupe, et al. 2011. « High PTP4A3 Phosphatase Expression Correlates with Metastatic Risk in Uveal Melanoma Patients ». *Cancer Research* 71 (3): 666-74. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0605>.
- Laurent, Louise, Eleanor Wong, Guoliang Li, Tien Huynh, Aristotelis Tsirigos, Chin Thing Ong, Hwee Meng Low, et al. 2010. « Dynamic changes in the human methylome during differentiation ». *Genome Research* 20 (3): 320-31. <https://doi.org/10.1101/gr.101907.109>.
- Le Poole, I. C., T. Mutis, R. M. van den Wijngaard, W. Westerhof, T. Ottenhoff, R. R. de Vries, et P. K. Das. 1993. « A Novel, Antigen-Presenting Function of Melanocytes and Its Possible Relationship to Hypopigmentary Disorders ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 151 (12): 7284-92.
- Le Tourneau, Christophe, Maud Kamal, Olivier Trédan, Jean-Pierre Delord, Mario Campone, Anthony Goncalves, Nicolas Isambert, et al. 2012. « Designs and Challenges for Personalized Medicine Studies in Oncology: Focus on the SHIVA Trial ». *Targeted Oncology* 7 (4): 253-65. <https://doi.org/10.1007/s11523-012-0237-6>.
- Lee, Ho-June, Trang Pham, Matthew T. Chang, Dwight Barnes, Allen G. Cai, Rajkumar Noubade, Klara Totpal, et al. 2020. « The Tumor Suppressor BAP1 Regulates the Hippo Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *Cancer Research* 80 (8): 1656-68. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1704>.
- Lee, Hyung-Ok, John M. Levorse, et Myung K. Shin. 2003. « The Endothelin Receptor-B Is Required for the Migration of Neural Crest-Derived Melanocyte and Enteric Neuron Precursors ». *Developmental Biology* 259 (1): 162-75. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00160-x](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00160-x).
- Lee, Jeongkyung, Dae-Hwan Kim, Seunghee Lee, Qi-Heng Yang, Dong Kee Lee, Soo-Kyung Lee, Robert G. Roeder, et Jae W. Lee. 2009. « A tumor suppressive coactivator complex of p53 containing ASC-2 and histone H3-lysine-4 methyltransferase MLL3 or its paralogue MLL4 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (21): 8513-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902873106>.
- Lee, Ji Min, Jason S. Lee, Hyunkyung Kim, Kyeongkyu Kim, Hyejin Park, Ji-Young Kim, Seung Hoon Lee, et al. 2012. « EZH2 Generates a Methyl Degron That Is Recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 Ubiquitin Ligase Complex ». *Molecular Cell* 48 (4): 572-86. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.004>.
- Lehnertz, Bernhard, Yoshihide Ueda, Alwin A. H. A. Derijck, Ulrich Braunschweig, Laura Perez-Burgos, Stefan Kubicek, Taiping Chen, En Li, Thomas Jenuwein, et Antoine H. F. M. Peters. 2003. « Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin ». *Current Biology* 13 (14): 1192-1200. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00432-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00432-9).

- Levin, Mark D., Min Min Lu, Nataliya B. Petrenko, Brian J. Hawkins, Tara H. Gupta, Deborah Lang, Peter T. Buckley, et al. 2009. « Melanocyte-like Cells in the Heart and Pulmonary Veins Contribute to Atrial Arrhythmia Triggers ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (11): 3420-36. <https://doi.org/10.1172/JCI39109>.
- Lewis, E. B. 1978. « A Gene Complex Controlling Segmentation in *Drosophila* ». *Nature* 276 (5688): 565-70. <https://doi.org/10.1038/276565a0>.
- Li, Huapeng, Qi Li, Kyvan Dang, Shan Ma, Jennifer L. Cotton, Sun Yang, Lihua J. Zhu, et al. 2019. « YAP/TAZ Activation Drives Uveal Melanoma Initiation and Progression ». *Cell Reports* 29 (10): 3200-3211.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.021>.
- Li, Tianming, Qidi Zheng, Jiahui An, Mengying Wu, Haiyan Li, Xin Gui, Hu Pu, et Dongdong Lu. 2016. « SET1A Cooperates With CUDR to Promote Liver Cancer Growth and Hepatocyte-like Stem Cell Malignant Transformation Epigenetically ». *Molecular Therapy* 24 (2): 261-75. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.208>.
- Li, Yilong, Nicola D. Roberts, Jeremiah A. Wala, Ofer Shapira, Steven E. Schumacher, Kiran Kumar, Ekta Khurana, et al. 2020. « Patterns of Somatic Structural Variation in Human Cancer Genomes ». *Nature* 578 (7793): 112-21. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1913-9>.
- Lian, Shenyi, Lin Meng, Yongyong Yang, Ting Ma, Xiaofang Xing, Qin Feng, Qian Song, et al. 2017. « PRL-3 promotes telomere deprotection and chromosomal instability ». *Nucleic Acids Research* 45 (11): 6546-71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx392>.
- Lian, Yi-Xin, Rui Chen, Yue-Hua Xu, Chun-Lei Peng, et Hua-Cheng Hu. 2012. « Effect of Protein-Tyrosine Phosphatase 4A3 by Small Interfering RNA on the Proliferation of Lung Cancer ». *Gene* 511 (2): 169-76. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.079>.
- Liang, Ning, Chi Zhang, Patricia Dill, Ganna Panasyuk, Delphine Pion, Vonda Koka, Morgan Gallazzini, et al. 2014. « Regulation of YAP by mTOR and autophagy reveals a therapeutic target of tuberous sclerosis complex ». *Journal of Experimental Medicine* 211 (11): 2249-63. <https://doi.org/10.1084/jem.20140341>.
- Liddy, Nathaniel, Giovanna Bossi, Katherine J. Adams, Anna Lissina, Tara M. Mahon, Namir J. Hassan, Jessie Gavarret, et al. 2012. « Monoclonal TCR-Redirected Tumor Cell Killing ». *Nature Medicine* 18 (6): 980-87. <https://doi.org/10.1038/nm.2764>.
- Lieberman-Aiden, Erez, Nynke L. van Berkum, Louise Williams, Maxim Imakaev, Tobias Ragoczy, Agnes Telling, Ido Amit, et al. 2009. « Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome ». *Science (New York, N.Y.)* 326 (5950): 289-93. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>.
- Lin, Jennifer Y., et David E. Fisher. 2007. « Melanocyte Biology and Skin Pigmentation ». *Nature* 445 (7130): 843-50. <https://doi.org/10.1038/nature05660>.

- Lin, Weitao, Aaron B. Beasley, Nima Mesbah Ardakani, Elena Denisenko, Leslie Calapre, Matthew Jones, Benjamin A. Wood, Lydia Warburton, Alistair R. R. Forrest, et Elin S. Gray. 2021. « Intra- and Inter-Tumoral Heterogeneity of Liver Metastases in a Patient with Uveal Melanoma Revealed by Single-Cell RNA Sequencing ». *Molecular Case Studies*, septembre, mcs.a006111. <https://doi.org/10.1101/mcs.a006111>.
- Lister, Ryan, Mattia Pelizzola, Robert H. Dowen, R. David Hawkins, Gary Hon, Julian Tonti-Filippini, Joseph R. Nery, et al. 2009. « Human DNA Methylomes at Base Resolution Show Widespread Epigenomic Differences ». *Nature* 462 (7271): 315-22. <https://doi.org/10.1038/nature08514>.
- Liu, Feng, Gary C. Hon, Genaro R. Villa, Kristen M. Turner, Shiro Ikegami, Huijun Yang, Zhen Ye, et al. 2015. « EGFR Mutation Promotes Glioblastoma Through Epigenome and Transcription Factor Network Remodeling ». *Molecular cell* 60 (2): 307-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.002>.
- Liu, Yongxia, Ping Zheng, Yuhong Liu, Tianhai Ji, Xunhua Liu, Su Yao, Xing Cheng, et al. 2013. « An Epigenetic Role for PRL-3 as a Regulator of H3K9 Methylation in Colorectal Cancer ». *Gut* 62 (4): 571-81. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301059>.
- Liu, Yuanlong, Luca Nanni, Stephanie Sungalee, Marie Zufferey, Daniele Tavernari, Marco Mina, Stefano Ceri, Elisa Oricchio, et Giovanni Ciriello. 2021. « Systematic Inference and Comparison of Multi-Scale Chromatin Sub-Compartments Connects Spatial Organization to Cell Phenotypes ». *Nature Communications* 12 (1): 2439. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22666-3>.
- Liu, Yunhao, Joost C. Loijens, Karen H. Martin, Andrei V. Karginov, et J. Thomas Parsons. 2002. « The Association of ASAP1, an ADP Ribosylation Factor-GTPase Activating Protein, with Focal Adhesion Kinase Contributes to the Process of Focal Adhesion Assembly ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (6): 2147-56. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-01-0018>.
- Loenarz, Christoph, Wei Ge, Mathew L. Coleman, Nathan R. Rose, Christopher D. O. Cooper, Robert J. Klose, Peter J. Ratcliffe, et Christopher J. Schofield. 2010. « PHF8, a gene associated with cleft lip/palate and mental retardation, encodes for an N ϵ -dimethyl lysine demethylase ». *Human molecular genetics* 19 (2): 217-22. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp480>.
- Lohr, Jens G., Petar Stojanov, Michael S. Lawrence, Daniel Auclair, Bjoern Chapuy, Carrie Sougnez, Peter Cruz-Gordillo, et al. 2012. « Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (10): 3879-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121343109>.
- Lopes, Vanda S., Christina Wasmeier, Miguel C. Seabra, et Clare E. Futter. 2007. « Melanosome Maturation Defect in Rab38-Deficient Retinal Pigment Epithelium Results in Instability of Immature Melanosomes during Transient

- Melanogenesis ». *Molecular Biology of the Cell* 18 (10): 3914-27. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-03-0268>.
- Louie, Bryan H., et Razelle Kurzrock. 2020. « BAP1: Not Just a BRCA1-Associated Protein ». *Cancer Treatment Reviews* 90 (novembre): 102091. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102091>.
- Low, Joo-Leng, Dawn Pingxi Lau, Xiaoqian Zhang, Xue-Lin Kwang, Neha Rohatgi, Jane Vin Chan, Fui-Teen Chong, et al. 2021. « A chemical genetic screen identifies Aurora kinases as a therapeutic target in EGFR T790M negative, gefitinib-resistant head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) ». *EBioMedicine* 64 (janvier): 103220. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103220>.
- Lu, Yan, Wen-Yuan Zhu, Cheng Tan, Ge-Hua Yu, et Jing-Xiong Gu. 2002. « Melanocytes Are Potential Immunocompetent Cells: Evidence from Recognition of Immunological Characteristics of Cultured Human Melanocytes ». *Pigment Cell Research* 15 (6): 454-60. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.02065.x>.
- Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, et T. J. Richmond. 1997. « Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution ». *Nature* 389 (6648): 251-60. <https://doi.org/10.1038/38444>.
- Lugo, T. G., A. M. Pendergast, A. J. Muller, et O. N. Witte. 1990. « Tyrosine Kinase Activity and Transformation Potency of Bcr-Abl Oncogene Products ». *Science (New York, N.Y.)* 247 (4946): 1079-82. <https://doi.org/10.1126/science.2408149>.
- Lunter, Gerton, et Jotun Hein. 2004. « A Nucleotide Substitution Model with Nearest-Neighbour Interactions ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 20 Suppl 1 (août): i216-223. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth901>.
- Luyten, G. P., N. C. Naus, C. M. Mooy, A. Hagemeyer, J. Kan-Mitchell, E. Van Drunen, V. Vuzevski, P. T. De Jong, et T. M. Luiders. 1996. « Establishment and Characterization of Primary and Metastatic Uveal Melanoma Cell Lines ». *International Journal of Cancer* 66 (3): 380-87. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960503\)66:3<380::AID-IJC19>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960503)66:3<380::AID-IJC19>3.0.CO;2-F).
- Lyko, Frank. 2018. « The DNA Methyltransferase Family: A Versatile Toolkit for Epigenetic Regulation ». *Nature Reviews. Genetics* 19 (2): 81-92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>.
- Maacha, Selma, Nathalie Planque, Cécile Laurent, Caterina Pegoraro, Océane Anezo, Frédérique Maczkowiak, Anne H. Monsoro-Burq, et Simon Saule. 2013. « Protein Tyrosine Phosphatase 4A3 (PTP4A3) Is Required for *Xenopus laevis* Cranial Neural Crest Migration in Vivo ». *PloS One* 8 (12): e84717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084717>.
- Maat, Willem, Ekaterina S. Jordanova, Shama L. van Zelderen-Bhola, Ed R. Barthen, Hans W. Wessels, Nicoline E. Schalij-Delfos, et Martine J. Jager. 2007. « The Heterogeneous Distribution of Monosomy 3 in Uveal Melanomas: Implications for Prognostication Based on Fine-Needle Aspiration Biopsies ». *Archives of*

- Pathology & Laboratory Medicine* 131 (1): 91-96. <https://doi.org/10.5858/2007-131-91-THDOMI>.
- Maaten, Laurens van der, et Geoffrey Hinton. 2008. « Visualizing Data using t-SNE ». *Journal of Machine Learning Research* 9 (86): 2579-2605.
- Machicote, Andres, Santiago Belén, Placida Baz, Luis A. Billordo, et Leonardo Fainboim. 2018. « Human CD8+HLA-DR+ Regulatory T Cells, Similarly to Classical CD4+Foxp3+ Cells, Suppress Immune Responses via PD-1/PD-L1 Axis ». *Frontiers in Immunology* 9 (novembre): 2788. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02788>.
- Mahendraraj, Krishnaraj, Christine SM Lau, Injoon Lee, et Ronald S Chamberlain. 2016. « Trends in incidence, survival, and management of uveal melanoma: a population-based study of 7,516 patients from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database (1973–2012) ». *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 10 (octobre): 2113-19. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S113623>.
- Maher, Christopher A., Chandan Kumar-Sinha, Xuhong Cao, Shanker Kalyana-Sundaram, Bo Han, Xiaojun Jing, Lee Sam, Terrence Barrette, Nallasivam Palanisamy, et Arul M. Chinnaiyan. 2009. « Transcriptome Sequencing to Detect Gene Fusions in Cancer ». *Nature* 458 (7234): 97-101. <https://doi.org/10.1038/nature07638>.
- Mai, Sabine, et Yuval Garini. 2006. « The significance of telomeric aggregates in the interphase nuclei of tumor cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 97 (5): 904-15. <https://doi.org/10.1002/jcb.20760>.
- Maire, Virginie, Fariba Némati, Marion Richardson, Anne Vincent-Salomon, Bruno Tesson, Guillem Rigai, Eléonore Gravier, et al. 2013. « Polo-like Kinase 1: A Potential Therapeutic Option in Combination with Conventional Chemotherapy for the Management of Patients with Triple-Negative Breast Cancer ». *Cancer Research* 73 (2): 813-23. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2633>.
- Mallone, Fabiana, Marta Sacchetti, Alessandro Lambiase, et Antonietta Moramarco. 2020. « Molecular Insights and Emerging Strategies for Treatment of Metastatic Uveal Melanoma ». *Cancers* 12 (10): 2761. <https://doi.org/10.3390/cancers12102761>.
- Marasca, Federica, Beatrice Bodega, et Valerio Orlando. 2018. « How Polycomb-Mediated Cell Memory Deals With a Changing Environment: Variations in PcG Complexes and Proteins Assortment Convey Plasticity to Epigenetic Regulation as a Response to Environment ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 40 (4): e1700137. <https://doi.org/10.1002/bies.201700137>.
- Marçais, Guillaume, et Carl Kingsford. 2011. « A Fast, Lock-Free Approach for Efficient Parallel Counting of Occurrences of k-Mers ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 27 (6): 764-70. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr011>.
- Marco, Ario de. 2012. « User-Friendly Expression Plasmids Enable the Fusion of VHHs to Application-Specific Tags ». In *Single Domain Antibodies: Methods and*

- Protocols*, édité par Dirk Saerens et Serge Muyldermans, 507-22. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-968-6_32.
- Margueron, Raphael, Neil Justin, Katsuhito Ohno, Miriam L. Sharpe, Jinsook Son, William J. Drury, Philipp Voigt, et al. 2009. « Role of the Polycomb Protein EED in the Propagation of Repressive Histone Marks ». *Nature* 461 (7265): 762-67. <https://doi.org/10.1038/nature08398>.
- Mariani, P., S. Piperno-Neumann, V. Servois, M. G. Berry, T. Dorval, C. Plancher, J. Couturier, et al. 2009. « Surgical Management of Liver Metastases from Uveal Melanoma: 16 Years' Experience at the Institut Curie ». *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 35 (11): 1192-97. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2009.02.016>.
- Mariya, Tasuku, Takema Kato, Takeshi Sugimoto, Syunsuke Miyai, Hidehito Inagaki, Tamae Ohye, Eiji Sugihara, Yukako Muramatsu, Seiji Mizuno, et Hiroki Kurahashi. 2022. « Target Enrichment Long-Read Sequencing with Adaptive Sampling Can Determine the Structure of the Small Supernumerary Marker Chromosomes ». *Journal of Human Genetics*, janvier, 1-6. <https://doi.org/10.1038/s10038-021-01004-x>.
- Martin, Marcel, Lars Maßhöfer, Petra Temming, Sven Rahmann, Claudia Metz, Norbert Bornfeld, Johannes van de Nes, et al. 2013. « Exome Sequencing Identifies Recurrent Somatic Mutations in EIF1AX and SF3B1 in Uveal Melanoma with Disomy 3 ». *Nature Genetics* 45 (8): 933-36. <https://doi.org/10.1038/ng.2674>.
- Martin-Marcos, Pilar, Fujun Zhou, Charm Karunasiri, Fan Zhang, Jinsheng Dong, Jagpreet Nanda, Shardul D Kulkarni, et al. s. d. « eIF1A residues implicated in cancer stabilize translation preinitiation complexes and favor suboptimal initiation sites in yeast ». *eLife* 6: e31250. <https://doi.org/10.7554/eLife.31250>.
- Masi, Alessandra di, Loris Leboffe, Elisabetta De Marinis, Francesca Pagano, Laura Cicconi, Cécile Rochette-Egly, Francesco Lo-Coco, Paolo Ascenzi, et Clara Nervi. 2015. « Retinoic Acid Receptors: From Molecular Mechanisms to Cancer Therapy ». *Molecular Aspects of Medicine*, Retinoic Acid Receptor and Cancer, 41 (février): 1-115. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.12.003>.
- Mathis, Thibaud, Nathalie Cassoux, Magali Tardy, Sophie Piperno, Lauris Gastaud, Rémi Dendale, Celia Maschi, et al. 2018. « Prise en charge des mélanomes oculaires, le minimum pour les oncologues ». *Bulletin du Cancer* 105 (10): 967-80. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.07.011>.
- Maunakea, Alikea K., Raman P. Nagarajan, Mikhail Bilenky, Tracy J. Ballinger, Cletus D'Souza, Shaun D. Fouse, Brett E. Johnson, et al. 2010. « Conserved Role of Intragenic DNA Methylation in Regulating Alternative Promoters ». *Nature* 466 (7303): 253-57. <https://doi.org/10.1038/nature09165>.

- McLaughlin, Colleen C., Xiao-Cheng Wu, Ahmedin Jemal, Howard J. Martin, Lisa M. Roche, et Vivien W. Chen. 2005. « Incidence of Noncutaneous Melanomas in the U.S ». *Cancer* 103 (5): 1000-1007. <https://doi.org/10.1002/cncr.20866>.
- McWilliams, Robert R, Eric D Wieben, Kari G Rabe, Katrina S Pedersen, Yanhong Wu, Hugues Sicotte, et Gloria M Petersen. 2011. « Prevalence of CDKN2A mutations in pancreatic cancer patients: implications for genetic counseling ». *European Journal of Human Genetics* 19 (4): 472-78. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.198>.
- Meggendorfer, Manja, Andreas Roller, Torsten Haferlach, Christiane Eder, Frank Dicker, Vera Grossmann, Alexander Kohlmann, et al. 2012. « SRSF2 Mutations in 275 Cases with Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) ». *Blood* 120 (15): 3080-88. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-404863>.
- Melo, Alexia N., et Christine M. Eischen. 2012. « Protecting the Genome from Mdm2 and Mdmx ». *Genes & Cancer* 3 (3-4): 283-90. <https://doi.org/10.1177/1947601912454139>.
- Mensink, Hanneke W., Jolanda Vaarwater, Emine Kiliç, Nicole C. Naus, Neeltje Mooy, Gre Luyten, Hennie T. Brüggewirth, Dion Paridaens, et Annelies de Klein. 2009. « Chromosome 3 Intratumor Heterogeneity in Uveal Melanoma ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (2): 500-504. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2279>.
- Mikkelsen, Lauge Hjorth. 2020. « Molecular Biology in Conjunctival Melanoma and the Relationship to Mucosal Melanoma ». *Acta Ophthalmologica* 98 Suppl 115: 1-27. <https://doi.org/10.1111/aos.14536>.
- Mikkelsen, Tarjei S., Manching Ku, David B. Jaffe, Biju Issac, Erez Lieberman, Georgia Giannoukos, Pablo Alvarez, et al. 2007. « Genome-Wide Maps of Chromatin State in Pluripotent and Lineage-Committed Cells ». *Nature* 448 (7153): 553-60. <https://doi.org/10.1038/nature06008>.
- Miller, Trissa, Nevan J. Krogan, Jim Dover, H. Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Mark Johnston, Jack F. Greenblatt, et Ali Shilatifard. 2001. « COMPASS: A complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (23): 12902-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.231473398>.
- Minchell, Nicola Elizabeth, Andrea Keszthelyi, et Jonathan Baxter. 2020. « Cohesin Causes Replicative DNA Damage by Trapping DNA Topological Stress ». *Molecular Cell* 78 (4): 739-751.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.013>.
- Mitchell, Sarah F., et Jon R. Lorsch. 2008. « Should I Stay or Should I Go? Eukaryotic Translation Initiation Factors 1 and 1A Control Start Codon Recognition ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (41): 27345-49. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800031200>.
- Miyasaka, Hitoshi, Sumiyo Endo, et Hiroyuki Shimizu. 2010. « Eukaryotic Translation Initiation Factor 1 (EIF1), the Inspector of Good AUG Context for Translation

- Initiation, Has an Extremely Bad AUG Context ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109 (6): 635-37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.11.022>.
- M'kacher, Radhia, Bruno Colicchio, Claire Borie, Steffen Junker, Valentine Marquet, Leonhard Heidingsfelder, Kevin Soehnlen, et al. 2020. « Telomere and Centromere Staining Followed by M-FISH Improves Diagnosis of Chromosomal Instability and Its Clinical Utility ». *Genes* 11 (5). <https://doi.org/10.3390/genes11050475>.
- Mobuchon, Lenha, Aude Battistella, Claire Bardel, Ghislaine Scelo, Alexia Renoud, Alexandre Houy, Nathalie Cassoux, et al. 2017. « A GWAS in Uveal Melanoma Identifies Risk Polymorphisms in the CLPTM1L Locus ». *NPJ Genomic Medicine* 2. <https://doi.org/10.1038/s41525-017-0008-5>.
- Mobuchon, Lenha, Anne-Céline Derrien, Alexandre Houy, Thibault Verrier, Gaëlle Pierron, Nathalie Cassoux, Maud Milder, et al. 2021. « Different Pigmentation Risk Loci for High-Risk Monosomy 3 and Low-Risk Disomy 3 Uveal Melanomas ». *Journal of the National Cancer Institute*, août, djab167. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab167>.
- Montaudon, Elodie, Joanna Nikitorowicz-Buniak, Laura Sourd, Ludivine Morisset, Rania El Botty, Léa Huguet, Ahmed Dahmani, et al. 2020. « PLK1 Inhibition Exhibits Strong Anti-Tumoral Activity in CCND1-Driven Breast Cancer Metastases with Acquired Palbociclib Resistance ». *Nature Communications* 11 (1): 4053. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17697-1>.
- Montgomery, Nathan D., Della Yee, Andrew Chen, Sundeep Kalantry, Stormy J. Chamberlain, Arie P. Otte, et Terry Magnuson. 2005. « The Murine Polycomb Group Protein Eed Is Required for Global Histone H3 Lysine-27 Methylation ». *Current Biology: CB* 15 (10): 942-47. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.051>.
- Moore, Amanda R, Emilie Ceraudo, Jessica J Sher, Youxin Guan, Alexander N Shoushtari, Matthew T Chang, Jenny Q Zhang, et al. 2016. « Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor CYSLTR2 in uveal melanoma ». *Nature genetics* 48 (6): 675-80. <https://doi.org/10.1038/ng.3549>.
- Moore, Amanda R., Leili Ran, Youxin Guan, Jessica J. Sher, Tyler D. Hitchman, Jenny Q. Zhang, Catalina Hwang, et al. 2018. « GNA11 Q209L Mouse Model Reveals RasGRP3 as an Essential Signaling Node in Uveal Melanoma ». *Cell Reports* 22 (9): 2455-68. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.081>.
- Moorthy, Sakthi D., Scott Davidson, Virlana M. Shchuka, Gurdeep Singh, Nakisa Malek-Gilani, Lida Langroudi, Alexandre Martchenko, Vincent So, Neil N. Macpherson, et Jennifer A. Mitchell. 2017. « Enhancers and super-enhancers have an equivalent regulatory role in embryonic stem cells through regulation of single or multiple genes ». *Genome Research* 27 (2): 246-58. <https://doi.org/10.1101/gr.210930.116>.
- Morin, Ryan D., Nathalie A. Johnson, Tesa M. Severson, Andrew J. Mungall, Jianghong An, Rodrigo Goya, Jessica E. Paul, et al. 2010. « Somatic Mutations Altering EZH2

- (Tyr641) in Follicular and Diffuse Large B-Cell Lymphomas of Germinal-Center Origin ». *Nature Genetics* 42 (2): 181-85. <https://doi.org/10.1038/ng.518>.
- Morin, Ryan D., Maria Mendez-Lago, Andrew J. Mungall, Rodrigo Goya, Karen L. Mungall, Richard D. Corbett, Nathalie A. Johnson, et al. 2011. « Frequent Mutation of Histone-Modifying Genes in Non-Hodgkin Lymphoma ». *Nature* 476 (7360): 298-303. <https://doi.org/10.1038/nature10351>.
- Moutel, Sandrine, Nicolas Bery, Virginie Bernard, Laura Keller, Emilie Lemesre, Ario de Marco, Laetitia Ligat, et al. 2016. « NaLi-H1: A Universal Synthetic Library of Humanized Nanobodies Providing Highly Functional Antibodies and Intrabodies ». *ELife* 5 (juillet): e16228. <https://doi.org/10.7554/eLife.16228>.
- Mouti, Mai Abdel, Christopher Dee, Sarah E. Coupland, et Adam F.L. Hurlstone. 2016. « Minimal contribution of ERK1/2-MAPK signalling towards the maintenance of oncogenic GNAQQ209P-driven uveal melanomas in zebrafish ». *Oncotarget* 7 (26): 39654-70. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9207>.
- Mulcahy, Kevin A., Donata Rimoldi, Francis Brasseur, Sheila Rodgers, Danielle Liénard, Marie Marchand, Ian G. Rennie, et al. 1996. « Infrequent Expression of the MAGE Gene Family in Uveal Melanomas ». *International Journal of Cancer* 66 (6): 738-42. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960611\)66:6<738::AID-IJC5>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960611)66:6<738::AID-IJC5>3.0.CO;2-0).
- Mull, Amber N., Ashwini Zolekar, et Yu-Chieh Wang. 2015. « Understanding Melanocyte Stem Cells for Disease Modeling and Regenerative Medicine Applications ». *International Journal of Molecular Sciences* 16 (12): 30458-69. <https://doi.org/10.3390/ijms161226207>.
- Müller, Sebastian, et Geneviève Almouzni. 2014. « A Network of Players in H3 Histone Variant Deposition and Maintenance at Centromeres ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, Chromatin and epigenetic regulation of animal development, 1839 (3): 241-50. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.11.008>.
- Murali, Rajmohan, Thomas Wiesner, et Richard A. Scolyer. 2013. « Tumours Associated with BAP1 Mutations ». *Pathology* 45 (2): 116-26. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e32835d0efb>.
- Napolitano, Giuliana, Daniela Tagliaferri, Salvatore Fusco, Carmine Cirillo, Ilaria De Martino, Martina Addeo, Pellegrino Mazzone, et al. 2020. « A Novel Member of Prame Family, Gm12794c, Counteracts Retinoic Acid Differentiation through the Methyltransferase Activity of PRC2 ». *Cell Death and Differentiation* 27 (1): 345-62. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0359-9>.
- Nareyek, Gordon, Michael Zeschnigk, Norbert Bornfeld, et Gerasimos Anastassiou. 2009. « Novel Cell Lines Derived by Long-Term Culture of Primary Uveal Melanomas ». *Ophthalmologica* 223 (3): 196-201. <https://doi.org/10.1159/000201566>.
- Nasu, Masaki, Mitsuru Emi, Sandra Pastorino, Mika Tanji, Amy Powers, Hugh Luk, Francine Baumann, et al. 2015. « High Incidence of Somatic BAP1 Alterations in

- Sporadic Malignant Mesothelioma ». *Journal of Thoracic Oncology* 10 (4): 565-76. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000471>.
- Nathan, Paul, Jessica C. Hassel, Piotr Rutkowski, Jean-Francois Baurain, Marcus O. Butler, Max Schlaak, Ryan J. Sullivan, et al. 2021. « Overall Survival Benefit with Tebentafusp in Metastatic Uveal Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 385 (13): 1196-1206. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2103485>.
- Némati, Fariba, Xavier Sastre-Garau, Cécile Laurent, Jérôme Couturier, Pascale Mariani, Laurence Desjardins, Sophie Piperno-Neumann, et al. 2010. « Establishment and Characterization of a Panel of Human Uveal Melanoma Xenografts Derived from Primary and/or Metastatic Tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16 (8): 2352-62. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3066>.
- Neri, Francesco, Stefania Rapelli, Anna Krepelova, Danny Incarnato, Caterina Parlato, Giulia Basile, Mara Maldotti, Francesca Anselmi, et Salvatore Oliviero. 2017. « Intragenic DNA Methylation Prevents Spurious Transcription Initiation ». *Nature* 543 (7643): 72-77. <https://doi.org/10.1038/nature21373>.
- Nguyen, C., G. Liang, T. T. Nguyen, D. Tsao-Wei, S. Groshen, M. Lübbert, J. H. Zhou, W. F. Benedict, et P. A. Jones. 2001. « Susceptibility of Nonpromoter CpG Islands to de Novo Methylation in Normal and Neoplastic Cells ». *Journal of the National Cancer Institute* 93 (19): 1465-72. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.19.1465>.
- Nhu T., Nguyen, et Fisher David E. 2019. « MITF and UV responses in skin: from pigmentation to addiction ». *Pigment cell & melanoma research* 32 (2): 224-36. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12726>.
- Nijman, Sebastian M. B., Mark P. A. Luna-Vargas, Arno Velds, Thijn R. Brummelkamp, Annette M. G. Dirac, Titia K. Sixma, et René Bernards. 2005. « A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes ». *Cell* 123 (5): 773-86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.007>.
- Nishibuchi, Gohei, et Jérôme Déjardin. 2017. « The Molecular Basis of the Organization of Repetitive DNA-Containing Constitutive Heterochromatin in Mammals ». *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 25 (1): 77-87. <https://doi.org/10.1007/s10577-016-9547-3>.
- Njauw, Ching-Ni Jenny, Ivana Kim, Adriano Piris, Michele Gabree, Michael Taylor, Anne Marie Lane, Margaret M. DeAngelis, Evangelos Gragoudas, Lyn M. Duncan, et Hensin Tsao. 2012. « Germline BAP1 Inactivation Is Preferentially Associated with Metastatic Ocular Melanoma and Cutaneous-Ocular Melanoma Families ». *PloS One* 7 (4): e35295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035295>.
- Nora, Elphège P., Laura Caccianini, Geoffrey Fudenberg, Kevin So, Vasumathi Kameswaran, Abigail Nagle, Alec Uebersohn, et al. 2020. « Molecular Basis of CTCF Binding Polarity in Genome Folding ». *Nature Communications* 11 (1): 5612. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19283-x>.

- Nora, Elphège P., Bryan R. Lajoie, Edda G. Schulz, Luca Giorgetti, Ikuhiro Okamoto, Nicolas Servant, Tristan Piolot, et al. 2012. « Spatial Partitioning of the Regulatory Landscape of the X-Inactivation Centre ». *Nature* 485 (7398): 381-85. <https://doi.org/10.1038/nature11049>.
- Novak, Petr, Taylor Jensen, Marc M. Oshiro, Ryan J. Wozniak, Marcella Nouzova, George S. Watts, Walter T. Klimecki, Christina Kim, et Bernard W. Futscher. 2006. « Epigenetic Inactivation of the HOXA Gene Cluster in Breast Cancer ». *Cancer Research* 66 (22): 10664-70. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2761>.
- Nowell, C. 1962. « The Minute Chromosome (Ph1) in Chronic Granulocytic Leukemia ». *Blut: Zeitschrift Für Die Gesamte Blutforschung* 8 (2): 65-66. <https://doi.org/10.1007/BF01630378>.
- Okamoto, I., et E. Heard. 2006. « The Dynamics of Imprinted X Inactivation during Preimplantation Development in Mice ». *Cytogenetic and Genome Research* 113 (1-4): 318-24. <https://doi.org/10.1159/000090848>.
- Oksuz, Betul Akgol, Liyan Yang, Sameer Abraham, Sergey V. Venev, Nils Krietenstein, Krishna Mohan Parsi, Hakan Ozadam, et al. 2020. « Systematic Evaluation of Chromosome Conformation Capture Assays ». *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.12.26.424448>.
- Onken, Michael D., Lori A. Worley, Justis P. Ehlers, et J. William Harbour. 2004. « Gene Expression Profiling in Uveal Melanoma Reveals Two Molecular Classes and Predicts Metastatic Death ». *Cancer Research* 64 (20): 7205-9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1750>.
- Onken, Michael D., Lori A. Worley, et J. William Harbour. 2008. « A Metastasis Modifier Locus on Human Chromosome 8p in Uveal Melanoma Identified by Integrative Genomic Analysis ». *Clinical Cancer Research* 14 (12): 3737-45. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5144>.
- Onken, Michael D., Lori Worley, et J. William Harbour. 2010. « Association between gene expression classification, proliferation and metastasis in uveal melanoma ». *Current eye research* 35 (9): 857-63. <https://doi.org/10.3109/02713683.2010.493265>.
- O'Rahilly, Ronan, et Fabiola Müller. 2007. « The development of the neural crest in the human ». *Journal of Anatomy* 211 (3): 335-51. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00773.x>.
- Pace, A. M., Y. H. Wong, et H. R. Bourne. 1991. « A Mutant Alpha Subunit of Gi2 Induces Neoplastic Transformation of Rat-1 Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16): 7031-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7031>.
- Padeken, Jan, Stephen P. Methot, et Susan M. Gasser. 2022. « Establishment of H3K9-Methylated Heterochromatin and Its Functions in Tissue Differentiation and Maintenance ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, mai. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00483-w>.

- Pajtler, Kristian W., Christina Weingarten, Theresa Thor, Annette Künkele, Lukas C. Heukamp, Reinhard Büttner, Takayoshi Suzuki, et al. 2013. « The KDM1A histone demethylase is a promising new target for the epigenetic therapy of medulloblastoma ». *Acta Neuropathologica Communications* 1 (1): 19. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-19>.
- Pandiani, Charlotte, Guillaume E. Béranger, Justine Leclerc, Robert Ballotti, et Corine Bertolotto. 2017. « Focus on Cutaneous and Uveal Melanoma Specificities ». *Genes & Development* 31 (8): 724-43. <https://doi.org/10.1101/gad.296962.117>.
- Pandiani, Charlotte, Thomas Strub, Nicolas Nottet, Yann Cheli, Giovanni Gambi, Karine Bille, Chrystel Husser, et al. 2021. « Single-Cell RNA Sequencing Reveals Intratumoral Heterogeneity in Primary Uveal Melanomas and Identifies HES6 as a Driver of the Metastatic Disease ». *Cell Death and Differentiation* 28 (6): 1990-2000. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00730-7>.
- Parada, Luis A., Philip G. McQueen, Peter J. Munson, et Tom Misteli. 2002. « Conservation of Relative Chromosome Positioning in Normal and Cancer Cells ». *Current Biology: CB* 12 (19): 1692-97. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01166-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01166-1).
- Parelho, Vania, Suzana Hadjur, Mikhail Spivakov, Marion Leleu, Stephan Sauer, Heather C. Gregson, Adam Jarmuz, et al. 2008. « Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms ». *Cell* 132 (3): 422-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.011>.
- Parichy, D. M., J. F. Rawls, S. J. Pratt, T. T. Whitfield, et S. L. Johnson. 1999. « Zebrafish Sparse Corresponds to an Orthologue of C-Kit and Is Required for the Morphogenesis of a Subpopulation of Melanocytes, but Is Not Essential for Hematopoiesis or Primordial Germ Cell Development ». *Development (Cambridge, England)* 126 (15): 3425-36.
- Paro, Renato. 1990. « Imprinting a Determined State into the Chromatin of *Drosophila* ». *Trends in Genetics* 6 (janvier): 416-21. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(90\)90303-N](https://doi.org/10.1016/0168-9525(90)90303-N).
- Parrella, Paola, Otavia L. Caballero, David Sidransky, et Shannath L. Merbs. 2001. « Detection of c-myc Amplification in Uveal Melanoma by Fluorescent In Situ Hybridization ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42 (8): 1679-84.
- Pasini, Diego, Adrian P Bracken, Michael R Jensen, Eros Lazzerini Denchi, et Kristian Helin. 2004. « Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity ». *The EMBO Journal* 23 (20): 4061-71. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600402>.
- Pasini, Diego, et Luciano Di Croce. 2016. « Emerging Roles for Polycomb Proteins in Cancer ». *Current Opinion in Genetics & Development* 36 (février): 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.013>.
- Peña-Chilet, Maria, Maite Blanquer-Maceiras, Maider Ibarrola-Villava, Conrado Martinez-Cadenas, Manuel Martin-Gonzalez, Cristina Gomez-Fernandez, Matias Mayor, Juan Antonio Aviles, Ana Lluch, et Gloria Ribas. 2013. « Genetic Variants

- in PARP1 (Rs3219090) and IRF4 (Rs12203592) Genes Associated with Melanoma Susceptibility in a Spanish Population ». *BMC Cancer* 13 (mars): 160. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-160>.
- Peña-Llopis, Samuel, Silvia Vega-Rubín-de-Celis, Arnold Liao, Nan Leng, Andrea Pavía-Jiménez, Shanshan Wang, Toshinari Yamasaki, et al. 2012. « BAP1 Loss Defines a New Class of Renal Cell Carcinoma ». *Nature Genetics* 44 (7): 751-59. <https://doi.org/10.1038/ng.2323>.
- Peng, Hongzhuang, Jeremy Prokop, Jayashree Karar, Kyewon Park, Li Cao, J. William Harbour, Anne M. Bowcock, et al. 2018. « Familial and Somatic BAP1 Mutations Inactivate ASXL1/2-Mediated Allosteric Regulation of BAP1 Deubiquitinase by Targeting Multiple Independent Domains ». *Cancer research* 78 (5): 1200-1213. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2876>.
- Pestova, T.V., S.I. Borukhov, et C.U.T. Hellen. 1998. « Eukaryotic Ribosomes Require Initiation Factors 1 and 1A to Locate Initiation Codons ». *Nature* 394 (6696): 854-59. <https://doi.org/10.1038/29703>.
- Peters, Tricia L., Vijetha Kumar, Sumanth Polikepahad, Frank Y. Lin, Stephen F. Sarabia, Yu Liang, Wei-Lien Wang, et al. 2015. « BCOR-CCNB3 Fusions Are Frequent in Undifferentiated Sarcomas of Male Children ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 28 (4): 575-86. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.139>.
- Petit, Vincent, Gérald Massonnet, Zofia Maciorowski, Jawida Touhami, Aurélie Thuleau, Fariba Némati, Julie Laval, et al. 2013. « Optimization of Tumor Xenograft Dissociation for the Profiling of Cell Surface Markers and Nutrient Transporters ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 93 (5): 611-21. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.44>.
- Pfeifer, Gerd P., et Ahmad Besaratinia. 2012. « UV Wavelength-Dependent DNA Damage and Human Non-Melanoma and Melanoma Skin Cancer ». *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 11 (1): 90-97. <https://doi.org/10.1039/c1pp05144j>.
- Phillips-Cremins, Jennifer E., Michael E. G. Sauria, Amartya Sanyal, Tatiana I. Gerasimova, Bryan R. Lajoie, Joshua S. K. Bell, Chin-Tong Ong, et al. 2013. « Architectural Protein Subclasses Shape 3D Organization of Genomes during Lineage Commitment ». *Cell* 153 (6): 1281-95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.053>.
- Phung, Bengt, Julhash U. Kazi, Alicia Lundby, Kristin Bergsteinsdottir, Jianmin Sun, Colin R. Goding, Göran Jönsson, Jesper V. Olsen, Eiríkur Steingrímsson, et Lars Rönnstrand. 2017. « KITD816V Induces SRC-Mediated Tyrosine Phosphorylation of MITF and Altered Transcription Program in Melanoma ». *Molecular Cancer Research* 15 (9): 1265-74. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0149>.
- Pickart, Cecile M. 2004. « Back to the Future with Ubiquitin ». *Cell* 116 (2): 181-90. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01074-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01074-2).

- Pierron, Gaëlle, Franck Tirode, Carlo Lucchesi, Stéphanie Reynaud, Stelly Ballet, Sarah Cohen-Gogo, Virginie Perrin, Jean-Michel Coindre, et Olivier Delattre. 2012. « A New Subtype of Bone Sarcoma Defined by BCOR-CCNB3 Gene Fusion ». *Nature Genetics* 44 (4): 461-66. <https://doi.org/10.1038/ng.1107>.
- Piunti, Andrea, et Ali Shilatifard. 2016. « Epigenetic balance of gene expression by Polycomb and COMPASS families ». *Science* 352 (6290): aad9780. <https://doi.org/10.1126/science.aad9780>.
- Planelles, D., E. Nagore, A. Moret, R. Botella-Estrada, E. Vila, C. Guillén, et J. A. Montoro. 2006. « HLA Class II Polymorphisms in Spanish Melanoma Patients: Homozygosity for HLA-DQA1 Locus Can Be a Potential Melanoma Risk Factor ». *The British Journal of Dermatology* 154 (2): 261-66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06896.x>.
- Porkka, Noora K., Alisa Olkinuora, Teijo Kuopio, Maarit Ahtiainen, Samuli Eldfors, Henriikki Almusa, Jukka-Pekka Mecklin, et Päivi Peltomäki. 2020. « Does breast carcinoma belong to the Lynch syndrome tumor spectrum? – Somatic mutational profiles vs. ovarian and colorectal carcinomas ». *Oncotarget* 11 (14): 1244-56. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27538>.
- Potrony, Miriam, Celia Badenas, Paula Aguilera, Joan Anton Puig-Butille, Cristina Carrera, Josep Malvehy, et Susana Puig. 2015. « Update in Genetic Susceptibility in Melanoma ». *Annals of Translational Medicine* 3 (15): 210. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.08.11>.
- Potrony, Miriam, Aida Rebollo-Morell, Pol Giménez-Xavier, Lisa Zimmer, Joan Anton Puig-Butille, Gemma Tell-Marti, Antje Sucker, et al. 2017. « IRF4 Rs12203592 Functional Variant and Melanoma Survival ». *International Journal of Cancer* 140 (8): 1845-49. <https://doi.org/10.1002/ijc.30605>.
- Prescher, G., N. Bornfeld, H. Hirche, B. Horsthemke, K. H. Jöckel, et R. Becher. 1996. « Prognostic Implications of Monosomy 3 in Uveal Melanoma ». *Lancet (London, England)* 347 (9010): 1222-25. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)90736-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)90736-9).
- Puhr, Hannah Christina, et Aysegül İlhan-Mutlu. 2019. « New Emerging Targets in Cancer Immunotherapy: The Role of LAG3 ». *ESMO Open* 4 (2). <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000482>.
- Qin, Fujun, Zhenguo Song, Mihaela Babiceanu, Yansu Song, Loryn Facemire, Ritambhara Singh, Mazhar Adli, et Hui Li. 2015. « Discovery of CTCF-Sensitive Cis-Spliced Fusion RNAs between Adjacent Genes in Human Prostate Cells ». *PLoS Genetics* 11 (2): e1005001. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005001>.
- Qin, Fujun, Yanmei Zhang, Jia Liu, et Hui Li. 2017. « SLC45A3-ELK4 Functions as a Long Non-Coding Chimeric RNA ». *Cancer Letters* 404 (septembre): 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.07.007>.
- Rahl, Peter B., Charles Y. Lin, Amy C. Seila, Ryan A. Flynn, Scott McCuine, Christopher B. Burge, Phillip A. Sharp, et Richard A. Young. 2010. « c-Myc regulates transcriptional pause release ». *Cell* 141 (3): 432-45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.030>.

- Rai, K., R. Pilarski, C.M. Cebulla, et M.H. Abdel-Rahman. 2016. « Comprehensive review of BAP1 tumor predisposition syndrome with report of two new cases ». *Clinical genetics* 89 (3): 285-94. <https://doi.org/10.1111/cge.12630>.
- Ram, P. T., C. M. Horvath, et R. Iyengar. 2000. « Stat3-Mediated Transformation of NIH-3T3 Cells by the Constitutively Active Q205L Galphao Protein ». *Science (New York, N.Y.)* 287 (5450): 142-44. <https://doi.org/10.1126/science.287.5450.142>.
- Rampias, Theodoros, Karagiannis, Dimitris. 2019. « The lysine-specific methyltransferase KMT2C/MLL3 regulates DNA repair components in cancer ». *EMBO reports* 20 (3): e46821. <https://doi.org/10.15252/embr.201846821>.
- Randic, Tijana, Ines Kozar, Christiane Margue, Jochen Utikal, et Stephanie Kreis. 2021. « NRAS Mutant Melanoma: Towards Better Therapies ». *Cancer Treatment Reviews* 99 (septembre): 102238. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102238>.
- Rao, Rajesh C., et Yali Dou. 2015. « Hijacked in cancer: the MLL/KMT2 family of methyltransferases ». *Nature reviews. Cancer* 15 (6): 334-46. <https://doi.org/10.1038/nrc3929>.
- Rao, Suhas S. P., Miriam H. Huntley, Neva C. Durand, Elena K. Stamenova, Ivan D. Bochkov, James T. Robinson, Adrian L. Sanborn, et al. 2014. « A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping ». *Cell* 159 (7): 1665-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021>.
- Raposo, G., D. Tenza, D. M. Murphy, J. F. Berson, et M. S. Marks. 2001. « Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes, Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells ». *The Journal of Cell Biology* 152 (4): 809-24. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.809>.
- Raposo, Graça, et Michael S. Marks. 2007. « Melanosomes – dark organelles enlighten endosomal membrane transport ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (10): 786-97. <https://doi.org/10.1038/nrm2258>.
- Rashidian, M., et H. Ploegh. 2020. « Nanobodies as Non-Invasive Imaging Tools ». *Immuno-Oncology Technology* 7 (septembre): 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.iotech.2020.07.001>.
- Rehmann, Holger. 2013. « Epac-Inhibitors: Facts and Artefacts ». *Scientific Reports* 3 (octobre): 3032. <https://doi.org/10.1038/srep03032>.
- Ren, Wendan, Huitao Fan, Sara A. Grimm, Yiran Guo, Jae Jin Kim, Jiekai Yin, Linhui Li, et al. 2020. « Direct readout of heterochromatic H3K9me3 regulates DNMT1-mediated maintenance DNA methylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (31): 18439-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009316117>.
- Repp, Amanda C., Elizabeth S. Mayhew, Sherine Apte, et Jerry Y. Niederkorn. 2000. « Human Uveal Melanoma Cells Produce Macrophage Migration-Inhibitory Factor to Prevent Lysis by NK Cells ». *The Journal of Immunology* 165 (2): 710-15. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.710>.

- Rhee, S. G. 2001. « Regulation of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C ». *Annual Review of Biochemistry* 70: 281-312. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.281>.
- Richards, Jackson R., Jae Hyuk Yoo, Donghan Shin, et Shannon J. Odelberg. 2020. « Mouse models of uveal melanoma: Strengths, weaknesses, and future directions ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 33 (2): 264-78. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12853>.
- Riising, Eva Madi, Itys Comet, Benjamin Leblanc, Xudong Wu, Jens Vilstrup Johansen, et Kristian Helin. 2014. « Gene Silencing Triggers Polycomb Repressive Complex 2 Recruitment to CpG Islands Genome Wide ». *Molecular Cell* 55 (3): 347-60. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.005>.
- Robertson, A. Gordon, Jaegil Kim, Hikmat Al-Ahmadie, Joaquim Bellmunt, Guangwu Guo, Andrew D. Cherniack, Toshinori Hinoue, et al. 2017. « Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer ». *Cell* 171 (3): 540-556.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.007>.
- Robertson, A. Gordon, Juliann Shih, Christina Yau, Ewan A. Gibb, Junna Oba, Karen L. Mungall, Julian M. Hess, et al. 2017. « Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma ». *Cancer Cell* 32 (2): 204-220.e15. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.003>.
- Rodrigues, Manuel, Khadija Ait Rais, Flore Salviat, Nathalie Algret, Fatoumata Simaga, Raymond Barnhill, Sophie Gardrat, et al. 2020. « Association of Partial Chromosome 3 Deletion in Uveal Melanomas With Metastasis-Free Survival ». *JAMA Ophthalmology* 138 (2): 182-88. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2019.5403>.
- Rodrigues, Manuel Jorge, David Gentien, Marc-Henri Stern, Laurence Desjardins, et Jérôme Couturier. 2013. « Genomic Amplification Is Not a Frequent Event in Uveal Melanomas ». *The American Journal of Pathology* 183 (2): 638. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.04.032>.
- Rodrigues, Manuel, Leanne de Koning, Sarah E. Coupland, Aart G. Jochemsen, Richard Marais, Marc-Henri Stern, André Valente, et al. 2019. « So Close, yet so Far: Discrepancies between Uveal and Other Melanomas. A Position Paper from UM Cure 2020 ». *Cancers* 11 (7): 1032. <https://doi.org/10.3390/cancers11071032>.
- Rodrigues, Manuel, Lenha Mobuchon, Alexandre Houy, Samar Alsafadi, Sylvain Baulande, Odette Mariani, Benjamin Marande, et al. 2019. « Evolutionary Routes in Metastatic Uveal Melanomas Depend on MBD4 Alterations ». *Clinical Cancer Research* 25 (18): 5513-24. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1215>.
- Rodrigues, Manuel, Lenha Mobuchon, Alexandre Houy, Anne-Céline Derrien, Alice Fiévet, et Marc-Henri Stern. 2018. « Rôle du gène MBD4 dans un phénotype hypermutateur et dans la tumorigénèse ». *médecine/sciences* 34 (11): 925-27. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018226>.
- Rodrigues, Manuel, Lenha Mobuchon, Alexandre Houy, Alice Fiévet, Sophie Gardrat, Raymond L. Barnhill, Tatiana Popova, et al. 2018. « Outlier Response to Anti-PD1

- in Uveal Melanoma Reveals Germline MBD4 Mutations in Hypermutated Tumors ». *Nature Communications* 9 (1): 1866. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04322-5>.
- Roh, Mi Ryung, Philip Eliades, Sameer Gupta, et Hensin Tsao. 2015. « Genetics of Melanocytic Nevi ». *Pigment cell & melanoma research* 28 (6): 661-72. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12412>.
- Roh, Tae-young, Gang Wei, Catherine M. Farrell, et Keji Zhao. 2007. « Genome-Wide Prediction of Conserved and Nonconserved Enhancers by Histone Acetylation Patterns ». *Genome Research* 17 (1): 74-81. <https://doi.org/10.1101/gr.5767907>.
- Rooij, J. D. E. de, I. H. I. M. Hollink, S. T. C. J. M. Arentsen-Peters, J. F. van Galen, H. Berna Beverloo, A. Baruchel, J. Trka, et al. 2013. « NUP98/JARID1A Is a Novel Recurrent Abnormality in Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia with a Distinct HOX Gene Expression Pattern ». *Leukemia* 27 (12): 2280-88. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.87>.
- Rosencrance, Celeste D., Haneen N. Ammouri, Qi Yu, Tiffany Ge, Emily J. Rendleman, Stacy A. Marshall, et Kyle P. Eagen. 2020. « Chromatin Hyperacetylation Impacts Chromosome Folding by Forming a Nuclear Subcompartment ». *Molecular Cell* 78 (1): 112-126.e12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.018>.
- Rothbart, Scott B., Krzysztof Krajewski, Nataliya Nady, Wolfram Tempel, Sheng Xue, Aimee I. Badeaux, Dalia Barsyte-Lovejoy, et al. 2012. « Association of UHRF1 with Methylated H3K9 Directs the Maintenance of DNA Methylation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (11): 1155-60. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2391>.
- Rowley, Janet D. 1973. « A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia Identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining ». *Nature* 243 (5405): 290-93. <https://doi.org/10.1038/243290a0>.
- Royer-Bertrand, Beryl, Matteo Torsello, Donata Rimoldi, Ikram El Zaoui, Katarina Cisarova, Rosanna Pescini-Gobert, Franck Raynaud, et al. 2016. « Comprehensive Genetic Landscape of Uveal Melanoma by Whole-Genome Sequencing ». *American Journal of Human Genetics* 99 (5): 1190-98. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.09.008>.
- Rubio, Eric D., David J. Reiss, Piri L. Welcsh, Christine M. Disteché, Galina N. Filippova, Nitin S. Baliga, Ruedi Aebersold, Jeffrey A. Ranish, et Anton Krumm. 2008. « CTCF physically links cohesin to chromatin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (24): 8309-14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801273105>.
- Saini, Adesh K., Jagpreet S. Nanda, Jon R. Lorsch, et Alan G. Hinnebusch. 2010. « Regulatory Elements in EIF1A Control the Fidelity of Start Codon Selection by Modulating TRNA^{iMet} Binding to the Ribosome ». *Genes & Development* 24 (1): 97-110. <https://doi.org/10.1101/gad.1871910>.
- Santos-Rosa, Helena, Robert Schneider, Andrew J. Bannister, Julia Sherriff, Bradley E. Bernstein, N. C. Tolga Emre, Stuart L. Schreiber, Jane Mellor, et Tony Kouzarides.

2002. « Active Genes Are Tri-Methylated at K4 of Histone H3 ». *Nature* 419 (6905): 407-11. <https://doi.org/10.1038/nature01080>.
- Sanulli, S., Mj Trnka, V. Dharmarajan, R. Tibble, Bd Pascal, A. Burlingame, Pr Griffin, Jd Gross, et G. Narlikar. 2019. « HP1 Reshapes the Nucleosome Core to Promote Phase Separation of Heterochromatin ». *Undefined*. <https://www.semanticscholar.org/paper/HP1-reshapes-the-nucleosome-core-to-promote-phase-Sanulli-Trnka/f2184b6e16dd669b1d0d6ce372302839e79db862>.
- Sanulli, Serena, Neil Justin, Aurélie Teissandier, Katia Ancelin, Manuela Portoso, Matthieu Caron, Audrey Michaud, et al. 2015. « Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation ». *Molecular Cell* 57 (5): 769-83. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.020>.
- Saxonov, Serge, Paul Berg, et Douglas L. Brutlag. 2006. « A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (5): 1412-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>.
- Scheffler, Amy C., Emre Koca, Eric H. Bernicker, et Zelia M. Correa. 2019. « Relationship between Clinical Features, GEP Class, and PRAME Expression in Uveal Melanoma ». *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 257 (7): 1541-45. <https://doi.org/10.1007/s00417-019-04335-w>.
- Schenk, Tino, Sven Stengel, Stefanie Goellner, Daniel Steinbach, et Hans Peter Saluz. 2007. « Hypomethylation of PRAME Is Responsible for Its Aberrant Overexpression in Human Malignancies ». *Genes, Chromosomes and Cancer* 46 (9): 796-804. <https://doi.org/10.1002/gcc.20465>.
- Scheuermann, Johanna C., Andrés Gaytán de Ayala Alonso, Katarzyna Oktaba, Nga Ly-Hartig, Robert K. McGinty, Sven Fraterman, Matthias Wilm, Tom W. Muir, et Jürg Müller. 2010. « Histone H2A Deubiquitinase Activity of the Polycomb Repressive Complex PR-DUB ». *Nature* 465 (7295): 243-47. <https://doi.org/10.1038/nature08966>.
- Scholes, A. G., T. Liloglou, P. Maloney, S. Hagan, J. Nunn, P. Hiscott, B. E. Damato, I. Grierson, et J. K. Field. 2001. « Loss of Heterozygosity on Chromosomes 3, 9, 13, and 17, Including the Retinoblastoma Locus, in Uveal Melanoma ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42 (11): 2472-77.
- Scholl, Florence A., Jivko Kamarashev, Omar V. Murmann, Ralf Geertsen, Reinhard Dummer, et Beat W. Schäfer. 2001. « PAX3 Is Expressed in Human Melanomas and Contributes to Tumor Cell Survival ». *Cancer Research* 61 (3): 823-26.
- Schoumacher, Marie, Stéphanie Le Corre, Alexandre Houy, Eskeatnaf Mulugeta, Marc-Henri Stern, Sergio Roman-Roman, et Raphaël Margueron. 2016. « Uveal Melanoma Cells Are Resistant to EZH2 Inhibition Regardless of BAP1 Status ». *Nature Medicine* 22 (6): 577-78. <https://doi.org/10.1038/nm.4098>.

- Serrano-Quílez, Joan, Sergi Roig-Soucase, et Susana Rodríguez-Navarro. 2020. « Sharing Marks: H3K4 Methylation and H2B Ubiquitination as Features of Meiotic Recombination and Transcription ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (12): E4510. <https://doi.org/10.3390/ijms21124510>.
- Servant, Nicolas, Nelle Varoquaux, Edith Heard, Emmanuel Barillot, et Jean-Philippe Vert. 2018. « Effective normalization for copy number variation in Hi-C data ». *BMC Bioinformatics* 19 (septembre). <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2256-5>.
- Sexton, Tom, Heiko Schober, Peter Fraser, et Susan M. Gasser. 2007. « Gene Regulation through Nuclear Organization ». *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (11): 1049-55. <https://doi.org/10.1038/nsmb1324>.
- Shain, A. Hunter, Mette M. Bagger, Richard Yu, Darwin Chang, Shanshan Liu, Swapna Vemula, Jingly F. Weier, et al. 2019. « The Genetic Evolution of Metastatic Uveal Melanoma ». *Nature Genetics* 51 (7): 1123-30. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0440-9>.
- Shaw, Alice T., Beow Y. Yeap, Benjamin J. Solomon, Gregory J. Riely, Justin Gainor, Jeffrey A. Engelman, Geoffrey I. Shapiro, et al. 2011. « Effect of Crizotinib on Overall Survival in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring ALK Gene Rearrangement: A Retrospective Analysis ». *The Lancet. Oncology* 12 (11): 1004-12. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70232-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70232-7).
- Shi, Yang, et Johnathan R. Whetstine. 2007. « Dynamic Regulation of Histone Lysine Methylation by Demethylases ». *Molecular Cell* 25 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.010>.
- Shi, Yujiang, Fei Lan, Caitlin Matson, Peter Mulligan, Johnathan R. Whetstine, Philip A. Cole, Robert A. Casero, et Yang Shi. 2004. « Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1 ». *Cell* 119 (7): 941-53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>.
- Shilatifard, A. 2012. « The COMPASS Family of Histone H3K4 Methylases: Mechanisms of Regulation in Development and Disease Pathogenesis ». *Annual review of biochemistry* 81: 65-95. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051710-134100>.
- Shilatifard, Ali. 2006. « Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression ». *Annual Review of Biochemistry* 75 (1): 243-69. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142422>.
- Shin, M. K., J. M. LeVorse, R. S. Ingram, et S. M. Tilghman. 1999. « The Temporal Requirement for Endothelin Receptor-B Signalling during Neural Crest Development ». *Nature* 402 (6761): 496-501. <https://doi.org/10.1038/990040>.
- Simon, M. I., M. P. Strathmann, et N. Gautam. 1991. « Diversity of G Proteins in Signal Transduction ». *Science (New York, N.Y.)* 252 (5007): 802-8. <https://doi.org/10.1126/science.1902986>.

- Singh, Arun D., Mary E. Turell, et Allan K. Topham. 2011. « Uveal Melanoma: Trends in Incidence, Treatment, and Survival ». *Ophthalmology* 118 (9): 1881-85. <https://doi.org/10.1016/j.ophttha.2011.01.040>.
- Singh, Devendra, Joseph Minhow Chan, Pietro Zoppoli, Francesco Niola, Ryan Sullivan, Angelica Castano, Eric Minwei Liu, et al. 2012. « Transforming Fusions of FGFR and TACC Genes in Human Glioblastoma ». *Science (New York, N.Y.)* 337 (6099): 1231-35. <https://doi.org/10.1126/science.1220834>.
- Slansky, Jill E., et Paul T. Spellman. 2019. « Alternative Splicing in Tumors - A Path to Immunogenicity? ». *The New England Journal of Medicine* 380 (9): 877-80. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1814237>.
- Slominski, Andrzej. 2009. « Neuroendocrine Activity of the Melanocyte ». *Experimental Dermatology* 18 (9): 760-63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00892.x>.
- Smit, Kyra N., Ruben Boers, Jolanda Vaarwater, Joachim Boers, Tom Brands, Hanneke Mensink, Robert M. Verdijk, et al. 2022. « Genome-Wide Aberrant Methylation in Primary Metastatic UM and Their Matched Metastases ». *Scientific Reports* 12 (1): 42. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03964-8>.
- Soda, Manabu, Young Lim Choi, Munehiro Enomoto, Shuji Takada, Yoshihiro Yamashita, Shunpei Ishikawa, Shin-ichiro Fujiwara, et al. 2007. « Identification of the Transforming EML4-ALK Fusion Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Nature* 448 (7153): 561-66. <https://doi.org/10.1038/nature05945>.
- Sofueva, Sevil, Eitan Yaffe, Wen-Ching Chan, Dimitra Georgopoulou, Matteo Vietri Rudan, Hegias Mira-Bontenbal, Steven M. Pollard, Gary P. Schroth, Amos Tanay, et Suzana Hadjur. 2013. « Cohesin-Mediated Interactions Organize Chromosomal Domain Architecture ». *The EMBO Journal* 32 (24): 3119-29. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.237>.
- Sommer, Lukas. 2011. « Generation of Melanocytes from Neural Crest Cells ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 24 (3): 411-21. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00834.x>.
- Souroullas, George P., William R. Jeck, Joel S. Parker, Jeremy M. Simon, Jie-Yu Liu, Joshiawa Paulk, Jessie Xiong, et al. 2016. « An Oncogenic Ezh2 Mutation Induces Tumors through Global Redistribution of Histone 3 Lysine 27 Trimethylation ». *Nature Medicine* 22 (6): 632-40. <https://doi.org/10.1038/nm.4092>.
- SPF. s. d. « Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Tumeurs solides : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim ». Consulté le 11 août 2020. /import/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1990-et-2018-tumeurs-solides-etude-a-partir.
- Spilka, Rita, Christina Ernst, Anita Kuldeep Mehta, et Johannes Haybaeck. 2013. « Eukaryotic Translation Initiation Factors in Cancer Development and Progression ». *Cancer Letters* 340 (1): 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.06.019>.

- Stein, Marta M., Karin U. Loeffler, Frank G. Holz, et Martina C. Herwig. 2016. « Animal Models of Uveal Melanoma: Methods, Applicability, and Limitations ». *BioMed Research International* 2016: 4521807. <https://doi.org/10.1155/2016/4521807>.
- Steinbach, Daniel, Nadine Pfaffendorf, Susan Wittig, et Bernd Gruhn. 2007. « PRAME Expression Is Not Associated with Down-Regulation of Retinoic Acid Signaling in Primary Acute Myeloid Leukemia ». *Cancer Genetics and Cytogenetics* 177 (1): 51-54. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2007.05.011>.
- Strange, R. C., T. Ellison, F. Ichii-Jones, J. Bath, P. Hoban, J. T. Lear, A. G. Smith, et al. 1999. « Cytochrome P450 CYP2D6 Genotypes: Association with Hair Colour, Breslow Thickness and Melanocyte Stimulating Hormone Receptor Alleles in Patients with Malignant Melanoma ». *Pharmacogenetics* 9 (3): 269-76.
- Stransky, Nicolas, Céline Vallot, Fabien Rey, Isabelle Bernard-Pierrot, Sixtina Gil Diez de Medina, Rick Segraves, Yann de Rycke, et al. 2006. « Regional Copy Number-Independent Deregulation of Transcription in Cancer ». *Nature Genetics* 38 (12): 1386-96. <https://doi.org/10.1038/ng1923>.
- Streilein, J. Wayne. 1999. *Immune Response and the Eye*. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Strub, Thomas, Arnaud Martel, Sacha Nahon-Esteve, Stéphanie Baillif, Robert Ballotti, et Corine Bertolotto. 2021. « Translation of Single-Cell Transcriptomic Analysis of Uveal Melanomas to Clinical Oncology ». *Progress in Retinal and Eye Research* 85 (novembre): 100968. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100968>.
- Sun, Zu-Wen, et C. David Allis. 2002. « Ubiquitination of Histone H2B Regulates H3 Methylation and Gene Silencing in Yeast ». *Nature* 418 (6893): 104-8. <https://doi.org/10.1038/nature00883>.
- Sungalee, Stephanie, Yuanlong Liu, Ruxandra A. Lambuta, Natalya Katanayeva, Maria Donaldson Collier, Daniele Tavernari, Sandrine Roulland, Giovanni Ciriello, et Elisa Oricchio. 2021. « Histone Acetylation Dynamics Modulates Chromatin Conformation and Allele-Specific Interactions at Oncogenic Loci ». *Nature Genetics* 53 (5): 650-62. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00842-x>.
- Syed, Aleem, et John A. Tainer. 2018. « The MRE11–RAD50–NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair ». *Annual review of biochemistry* 87 (juin): 263-94. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012415>.
- Ta, Lan, Adrian Zordan, Bruce Mercer, Lynda J. Campbell, et Ruth N. MacKinnon. 2013. « The Breakage-Fusion-Bridge Cycle Producing MLL Amplification in a Case of Myelodysplastic Syndrome ». *Journal of Cancer Research* 2013 (juillet): e452809. <https://doi.org/10.1155/2013/452809>.
- Tachibana, M. 1999. « Sound Needs Sound Melanocytes to Be Heard ». *Pigment Cell Research* 12 (6): 344-54. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1999.tb00518.x>.
- Takai, Daiya, et Peter A. Jones. 2002. « Comprehensive Analysis of CpG Islands in Human Chromosomes 21 and 22 ». *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* 99 (6): 3740-45.
<https://doi.org/10.1073/pnas.052410099>.
- Takata, Katsuyoshi, Lauren C. Chong, Daisuke Ennishi, Tomohiro Aoki, Michael Yu Li, Avinash Thakur, Shannon Healy, et al. 2022. « Tumor-Associated Antigen PRAME Exhibits Dualistic Functions That Are Targetable in Diffuse Large B Cell Lymphoma ». *The Journal of Clinical Investigation* 132 (10).
<https://doi.org/10.1172/JCI145343>.
- Takeda, Norifumi, Masabumi Shibuya, et Yoshiro Maru. 1999. « The BCR-ABL oncoprotein potentially interacts with the xeroderma pigmentosum group B protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1): 203-7.
- Takemoto, Yuji, Margaret Keighren, Ian J. Jackson, et Hiroaki Yamamoto. 2006. « Genomic Localization of a Dct-LacZ Transgene Locus: A Simple Assay for Transgene Status ». *Pigment Cell Research* 19 (6): 644-45.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00343.x>.
- Tamborero, David, Carlota Rubio-Perez, Jordi Deu-Pons, Michael P. Schroeder, Ana Vivancos, Ana Rovira, Ignasi Tusquets, et al. 2018. « Cancer Genome Interpreter Annotates the Biological and Clinical Relevance of Tumor Alterations ». *Genome Medicine* 10 (1): 25. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0531-8>.
- Taylor-Papadimitriou, Joyce, et Joy M. Burchell. 2022. « Histone Methylases and Demethylases Regulating Antagonistic Methyl Marks: Changes Occurring in Cancer ». *Cells* 11 (7): 1113. <https://doi.org/10.3390/cells11071113>.
- Tenney, Kristen, et Ali Shilatifard. 2005. « A COMPASS in the Voyage of Defining the Role of Trithorax/MLL-Containing Complexes: Linking Leukemogenesis to Covalent Modifications of Chromatin ». *Journal of Cellular Biochemistry* 95 (3): 429-36. <https://doi.org/10.1002/jcb.20421>.
- Testa, Joseph R., Mitchell Cheung, Jianming Pei, Jennifer E. Below, Yinfei Tan, Eleonora Sementino, Nancy J. Cox, et al. 2011. « Germline BAP1 Mutations Predispose to Malignant Mesothelioma ». *Nature Genetics* 43 (10): 1022-25.
<https://doi.org/10.1038/ng.912>.
- Theos, Alexander C., Danièle Tenza, José A. Martina, Ilse Hurbain, Andrew A. Peden, Elena V. Sviderskaya, Abigail Stewart, et al. 2005. « Functions of Adaptor Protein (AP)-3 and AP-1 in Tyrosinase Sorting from Endosomes to Melanosomes ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (11): 5356-72. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-07-0626>.
- Thiery, Jean Paul, Hervé Acloque, Ruby Y. J. Huang, et M. Angela Nieto. 2009. « Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease ». *Cell* 139 (5): 871-90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>.
- Tian, Zheng, Ming Liu, Ya Zhang, et Xin Wang. 2021. « Bispecific T Cell Engagers: An Emerging Therapy for Management of Hematologic Malignancies ». *Journal of Hematology & Oncology* 14 (1): 75. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01084-4>.

- Timms, Richard T., et Itay Koren. 2020. « Tying up loose ends: the N-degron and C-degron pathways of protein degradation ». *Biochemical Society Transactions* 48 (4): 1557-67. <https://doi.org/10.1042/BST20191094>.
- Tirode, Franck, Didier Surdez, Xiaotu Ma, Matthew Parker, Marie Cécile Le Deley, Armita Bahrami, Zhaojie Zhang, et al. 2014. « Genomic Landscape of Ewing Sarcoma Defines an Aggressive Subtype with Co-Association of STAG2 and TP53 Mutations ». *Cancer Discovery* 4 (11): 1342. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0622>.
- Toma, Jean G., Ian A. McKenzie, Darius Bagli, et Freda D. Miller. 2005. « Isolation and Characterization of Multipotent Skin-Derived Precursors from Human Skin ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23 (6): 727-37. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0134>.
- Tosi, Anna, Rocco Cappellesso, Angelo Paolo Dei Tos, Valentina Rossi, Camillo Aliberti, Jacopo Pigozzo, Alessio Fabozzi, et al. 2021. « The immune cell landscape of metastatic uveal melanoma correlates with overall survival ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 40 (1): 154. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01947-1>.
- Toussi, Atrine, Nicole Mans, Jeanna Welborn, et Maija Kiuru. 2020. « Germline Mutations Predisposing to Melanoma ». *Journal of Cutaneous Pathology* 47 (7): 606-16. <https://doi.org/10.1111/cup.13689>.
- Tricarico, Rossella, Salvatore Cortellino, Antonio Riccio, Shantie Jagmohan-Changur, Heleen Van der Klift, Juul Wijnen, David Turner, et al. 2015. « Involvement of MBD4 Inactivation in Mismatch Repair-Deficient Tumorigenesis ». *Oncotarget* 6 (40): 42892-904. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5740>.
- Trolet, Julien, Philippe Hupé, Isabelle Huon, Ingrid Lebigot, Charles Decraene, Olivier Delattre, Xavier Sastre-Garau, et al. 2009. « Genomic Profiling and Identification of High-Risk Uveal Melanoma by Array CGH Analysis of Primary Tumors and Liver Metastases ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (6): 2572-80. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2296>.
- Tschentscher, Frank, Johannes Hüsing, Tanja Hölter, Elisabeth Kruse, Irina Gana Dresen, Karl-Heinz Jöckel, Gerasimos Anastassiou, et al. 2003. « Tumor Classification Based on Gene Expression Profiling Shows That Uveal Melanomas with and without Monosomy 3 Represent Two Distinct Entities ». *Cancer Research* 63 (10): 2578-84.
- Tsukada, Yu-ichi, Jia Fang, Hediye Erdjument-Bromage, Maria E. Warren, Christoph H. Borchers, Paul Tempst, et Yi Zhang. 2006. « Histone Demethylation by a Family of JmjC Domain-Containing Proteins ». *Nature* 439 (7078): 811-16. <https://doi.org/10.1038/nature04433>.
- Tubbs, Anthony, et André Nussenzweig. 2017. « Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer ». *Cell* 168 (4): 644-56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.002>.

- Tyagi, Monica, Nasir Imam, Kirtika Verma, et Ashok K. Patel. 2016. « Chromatin remodelers: We are the drivers!! » *Nucleus* 7 (4): 388-404. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1211217>.
- Urbanska, K., B. Romanowska-Dixon, M. Elas, S. Pajak, E. Paziewski, J. Bryk, B. Kukiela, A. Slominski, H. Zygulska-Mach, et S. Lukiewicz. 2000. « Experimental Ruthenium Plaque Therapy of Amelanotic and Melanotic Melanomas in the Hamster Eye ». *Melanoma Research* 10 (1): 26-35.
- Valouev, Anton, Steven M. Johnson, Scott D. Boyd, Cheryl L. Smith, Andrew Z. Fire, et Arend Sidow. 2011. « Determinants of Nucleosome Organization in Primary Human Cells ». *Nature* 474 (7352): 516-20. <https://doi.org/10.1038/nature10002>.
- Van Kolen, Kristof, Frank M. Dautzenberg, Karin Verstraeten, Ines Royaux, Ronald De Hoogt, Eric Gutknecht, et Pieter J. Peeters. 2010. « Corticotropin Releasing Factor-Induced ERK Phosphorylation in AtT20 Cells Occurs via a CAMP-Dependent Mechanism Requiring EPAC2 ». *Neuropharmacology* 58 (1): 135-44. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.022>.
- Van Pel, A., P. van der Bruggen, P. G. Coulie, V. G. Brichard, B. Lethé, B. van den Eynde, C. Uyttenhove, J. C. Renauld, et T. Boon. 1995. « Genes Coding for Tumor Antigens Recognized by Cytolytic T Lymphocytes ». *Immunological Reviews* 145 (juin): 229-50. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1995.tb00084.x>.
- Van Raamsdonk, Catherine D., Vladimir Bezrookove, Gary Green, Jürgen Bauer, Lona Gaugler, Joan M. O'Brien, Elizabeth M. Simpson, Gregory S. Barsh, et Boris C. Bastian. 2009. « Frequent Somatic Mutations of GNAQ in Uveal Melanoma and Blue Naevi ». *Nature* 457 (7229): 599-602. <https://doi.org/10.1038/nature07586>.
- Van Raamsdonk, Catherine D., Klaus G. Griewank, Michelle B. Crosby, Maria C. Garrido, Swapna Vemula, Thomas Wiesner, Anna C. Obenaus, et al. 2010. « Mutations in GNA11 in Uveal Melanoma ». *The New England Journal of Medicine* 363 (23): 2191-99. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1000584>.
- Vanni, Irene, Enrica Teresa Tanda, Bruna Dalmaso, Lorenza Pastorino, Virginia Andreotti, William Bruno, Andrea Boutros, Francesco Spagnolo, et Paola Ghiorzo. 2020. « Non-BRAF Mutant Melanoma: Molecular Features and Therapeutical Implications ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 7: 172. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00172>.
- Varier, Radhika A., et H. T. Marc Timmers. 2011. « Histone Lysine Methylation and Demethylation Pathways in Cancer ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1815 (1): 75-89. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.10.002>.
- Varley, Katherine E., Jason Gertz, Kevin M. Bowling, Stephanie L. Parker, Timothy E. Reddy, Florencia Pauli-Behn, Marie K. Cross, et al. 2013. « Dynamic DNA Methylation across Diverse Human Cell Lines and Tissues ». *Genome Research* 23 (3): 555-67. <https://doi.org/10.1101/gr.147942.112>.
- Vazquez, J, et P Schedl. 2000. « Deletion of an insulator element by the mutation facet-strawberry in *Drosophila melanogaster*. » *Genetics* 155 (3): 1297-1311.

- Verfaillie, C. M., R. Hurley, B. I. Lundell, C. Zhao, et R. Bhatia. 1997. « Integrin-Mediated Regulation of Hematopoiesis: Do BCR/ABL-Induced Defects in Integrin Function Underlie the Abnormal Circulation and Proliferation of CML Progenitors? » *Acta Haematologica* 97 (1-2): 40-52. <https://doi.org/10.1159/000203658>.
- Virgili, Gianni, Gemma Gatta, Laura Ciccolallo, Riccardo Capocaccia, Annibale Biggeri, Emanuele Crocetti, Jean-Michel Lutz, Eugenio Paci, et EURO CARE Working Group. 2007. « Incidence of Uveal Melanoma in Europe ». *Ophthalmology* 114 (12): 2309-15. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2007.01.032>.
- Visel, Axel, Matthew J. Blow, Zirong Li, Tao Zhang, Jennifer A. Akiyama, Amy Holt, Ingrid Plajzer-Frick, et al. 2009. « ChIP-Seq Accurately Predicts Tissue-Specific Activity of Enhancers ». *Nature* 457 (7231): 854-58. <https://doi.org/10.1038/nature07730>.
- Vivet-Noguer, Raquel, Malcy Tarin, Sergio Roman-Roman, et Samar Alsafadi. 2019. « Emerging Therapeutic Opportunities Based on Current Knowledge of Uveal Melanoma Biology ». *Cancers* 11 (7). <https://doi.org/10.3390/cancers11071019>.
- Vogelmann, Jutta, Alessandro Valeri, Emmanuelle Guillou, Olivier Cuvier, et Marcello Nollmann. 2011. « Roles of Chromatin Insulator Proteins in Higher-Order Chromatin Organization and Transcription Regulation ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 2 (5): 358-69. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.5.17860>.
- Vogelstein, Bert, Nickolas Papadopoulos, Victor E. Velculescu, Shibin Zhou, Luis A. Diaz, et Kenneth W. Kinzler. 2013. « Cancer Genome Landscapes ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6127): 1546-58. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>.
- Vos, Erica S.M., Christian Valdes-Quezada, Yike Huang, Amin Allahyar, Marjon J.A.M. Verstegen, Anna-Karina Felder, Floor van der Vegt, Esther C.H. Uijttewaai, Peter H.L. Krijger, et Wouter de Laat. 2021. « Interplay between CTCF Boundaries and a Super Enhancer Controls Cohesin Extrusion Trajectories and Gene Expression ». *Molecular Cell* 81 (15): 3082-3095.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.06.008>.
- Wadelin, Frances, Joel Fulton, Paul A McEwan, Keith A Spriggs, Jonas Emsley, et David M Heery. 2010. « Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia ». *Molecular Cancer* 9 (août): 226. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-226>.
- Wadt, Karin, Jiyeon Choi, Joon-Yong Chung, Jens Kiilgaard, Steffen Heegaard, Krzysztof T. Drzewiecki, Jeffrey M. Trent, et al. 2012. « A cryptic BAP1 splice mutation in a family with uveal and cutaneous melanoma, and paraganglioma ». *Pigment cell & melanoma research* 25 (6): 815-18. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12006>.
- Wagner, Eric J., et Phillip B. Carpenter. 2012. « Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3 ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (2): 115-26. <https://doi.org/10.1038/nrm3274>.
- Walport, Louise J., Richard J. Hopkinson, Melanie Vollmar, Sarah K. Madden, Carina Gileadi, Udo Oppermann, Christopher J. Schofield, et Catrine Johansson. 2014. « Human UTY(KDM6C) Is a Male-specific Nε-Methyl Lysyl Demethylase ». *The*

- Journal of Biological Chemistry* 289 (26): 18302-13.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.555052>.
- Wang, Hao, Matthew T. Maurano, Hongzhu Qu, Katherine E. Varley, Jason Gertz, Florencia Pauli, Kristen Lee, et al. 2012. « Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation ». *Genome Research* 22 (9): 1680-88.
<https://doi.org/10.1101/gr.136101.111>.
- Wang, Nan, Yong Li, et Jianhong Zhou. 2017. « miR-31 Functions as an Oncomir Which Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition via Regulating BAP1 in Cervical Cancer ». *BioMed Research International* 2017: 6361420.
<https://doi.org/10.1155/2017/6361420>.
- Wang, Shuhang, Kun Chen, Qi Lei, Peiwen Ma, Andy Qingan Yuan, Yong Zhao, Youwei Jiang, et al. 2021. « The state of the art of bispecific antibodies for treating human malignancies ». *EMBO Molecular Medicine* 13 (9): e14291.
<https://doi.org/10.15252/emmm.202114291>.
- Wang, Ting, Lucinda Antonacci-Fulton, Kerstin Howe, Heather A. Lawson, Julian K. Lucas, Adam M. Phillippy, Alice B. Popejoy, et al. 2022. « The Human Pangenome Project: A Global Resource to Map Genomic Diversity ». *Nature* 604 (7906): 437-46. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04601-8>.
- Wang, Zhibin, Chongzhi Zang, Jeffrey A. Rosenfeld, Dustin E. Schones, Artem Barski, Suresh Cuddapah, Kairong Cui, et al. 2008. « Combinatorial Patterns of Histone Acetylations and Methylations in the Human Genome ». *Nature Genetics* 40 (7): 897-903. <https://doi.org/10.1038/ng.154>.
- Weber, Jason D., Laura J. Taylor, Martine F. Roussel, Charles J. Sherr, et Dafna Bar-Sagi. 1999. « Nucleolar Arf Sequesters Mdm2 and Activates P53 ». *Nature Cell Biology* 1 (1): 20-26. <https://doi.org/10.1038/8991>.
- Weber, Michael, Jonathan J. Davies, David Wittig, Edward J. Oakeley, Michael Haase, Wan L. Lam, et Dirk Schübeler. 2005. « Chromosome-Wide and Promoter-Specific Analyses Identify Sites of Differential DNA Methylation in Normal and Transformed Human Cells ». *Nature Genetics* 37 (8): 853-62.
<https://doi.org/10.1038/ng1598>.
- Weidmann, Cindy, Jade Pomerleau, Laurence Trudel-Vandal, et Solange Landreville. 2017. « Differential responses of choroidal melanocytes and uveal melanoma cells to low oxygen conditions ». *Molecular Vision* 23 (mars): 103-15.
- Welshons, W. J., et D. O. Keppy. 1975. « Intragenic Deletions and Salivary Band Relationships in *Drosophila* ». *Genetics* 80 (1): 143-55.
<https://doi.org/10.1093/genetics/80.1.143>.
- Werf, F. van der, B. Baljet, et A. J. Otto. 1992. « Pigment-Containing Cells in Extraocular Tissues of the Primate ». *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology* 81 (4): 357-68. <https://doi.org/10.1007/BF00169097>.
- White, V. A., B. K. McNeil, et D. E. Horsman. 1998. « Acquired Homozygosity (Isodisomy) of Chromosome 3 in Uveal Melanoma ». *Cancer Genetics and Cytogenetics* 102 (1): 40-45. [https://doi.org/10.1016/s0165-4608\(97\)00290-2](https://doi.org/10.1016/s0165-4608(97)00290-2).

- Wiesner, Thomas, Anna C. Obenauf, Rajmohan Murali, Isabella Fried, Klaus G. Griewank, Peter Ulz, Christian Windpassinger, et al. 2011. « Germline Mutations in BAP1 Predispose to Melanocytic Tumors ». *Nature Genetics* 43 (10): 1018-21. <https://doi.org/10.1038/ng.910>.
- Wijchers, Patrick J., Peter H. L. Krijger, Geert Geeven, Yun Zhu, Annette Denker, Marjon J. A. M. Verstegen, Christian Valdes-Quezada, et al. 2016. « Cause and Consequence of Tethering a SubTAD to Different Nuclear Compartments ». *Molecular Cell* 61 (3): 461-73. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.001>.
- Williams, Patricia F., Catherine M. Olsen, Nicholas K. Hayward, et David C. Whiteman. 2011. « Melanocortin 1 Receptor and Risk of Cutaneous Melanoma: A Meta-Analysis and Estimates of Population Burden ». *International Journal of Cancer* 129 (7): 1730-40. <https://doi.org/10.1002/ijc.25804>.
- Williams, Sarah V., Carolyn D. Hurst, et Margaret A. Knowles. 2013. « Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer ». *Human Molecular Genetics* 22 (4): 795-803. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds486>.
- Wilson, Jon R. 2007. « Targeting the JMJD2A Histone Lysine Demethylase ». *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (8): 682-84. <https://doi.org/10.1038/nsmb0807-682>.
- Wong, Y. H., J. S. Chan, L. Y. Yung, et H. R. Bourne. 1995. « Mutant Alpha Subunit of Gz Transforms Swiss 3T3 Cells ». *Oncogene* 10 (10): 1927-33.
- Woo, Xing Yi, Jessica Giordano, Anuj Srivastava, Zi-Ming Zhao, Michael W. Lloyd, Roebi de Bruijn, Yun-Suhk Suh, et al. 2021. « Conservation of Copy Number Profiles during Engraftment and Passaging of Patient-Derived Cancer Xenografts ». *Nature Genetics* 53 (1): 86-99. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00750-6>.
- Wozniak, R. J., W. T. Klimecki, S. S. Lau, Y. Feinstein, et B. W. Futscher. 2007. « 5-Aza-2'-Deoxycytidine-Mediated Reductions in G9A Histone Methyltransferase and Histone H3 K9 Di-Methylation Levels Are Linked to Tumor Suppressor Gene Reactivation ». *Oncogene* 26 (1): 77-90. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209763>.
- Wu, Xiaoji, et Yi Zhang. 2017. « TET-Mediated Active DNA Demethylation: Mechanism, Function and Beyond ». *Nature Reviews Genetics* 18 (9): 517-34. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>.
- Wu, Yi-Mi, Fengyun Su, Shanker Kalyana-Sundaram, Nick Khazanov, Bushra Ateeq, Xuhong Cao, Robert J. Lonigro, et al. 2013. « Identification of Targetable FGFR Gene Fusions in Diverse Cancers ». *Cancer discovery* 3 (6): 636-47. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0050>.
- Wu, Zhao-Qiu, Thomas Brabletz, Eric Fearon, Amanda L. Willis, Casey Yuexian Hu, Xiao-Yan Li, et Stephen J. Weiss. 2012. « Canonical Wnt suppressor, Axin2, promotes colon carcinoma oncogenic activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (28): 11312-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203015109>.
- Xu, N, L Bradley, I Ambdukar, et J S Gutkind. 1993. « A mutant alpha subunit of G12 potentiates the eicosanoid pathway and is highly oncogenic in NIH 3T3 cells. »

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (14): 6741-45.
- Xu, N., T. Voino-Yasenetskaya, et J. S. Gutkind. 1994. « Potent Transforming Activity of the G13 Alpha Subunit Defines a Novel Family of Oncogenes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201 (2): 603-9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1744>.
- Yamane, Kenichi, Keisuke Tateishi, Robert J. Klose, Jia Fang, Laura A. Fabrizio, Hediye Erdjument-Bromage, Joyce Taylor-Papadimitriou, Paul Tempst, et Yi Zhang. 2007. « PLU-1 Is an H3K4 Demethylase Involved in Transcriptional Repression and Breast Cancer Cell Proliferation ». *Molecular Cell* 25 (6): 801-12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.001>.
- Yamane, Kenichi, Charalambos Toumazou, Yu-ichi Tsukada, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Jiemin Wong, et Yi Zhang. 2006. « JHDM2A, a JmjC-Containing H3K9 Demethylase, Facilitates Transcription Activation by Androgen Receptor ». *Cell* 125 (3): 483-95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.027>.
- Yang, Hua, Guofu Fang, Xinping Huang, Jie Yu, Chia-Ling Hsieh, et Hans E. Grossniklaus. 2008. « In-vivo xenograft murine human uveal melanoma model develops hepatic micrometastases ». *Melanoma research* 18 (2): 95-103. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e3282f628df>.
- Yang, Xiaojing, Han Han, Daniel D. De Carvalho, Fides D. Lay, Peter A. Jones, et Gangning Liang. 2014. « Gene Body Methylation Can Alter Gene Expression and Is a Therapeutic Target in Cancer ». *Cancer Cell* 26 (4): 577-90. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.028>.
- Yavuzigitoglu, Serdar, Anna E. Koopmans, Robert M. Verdijk, Jolanda Vaarwater, Bert Eussen, Alice van Bodegom, Dion Paridaens, Emine Kiliç, et Annelies de Klein. 2016. « Uveal Melanomas with SF3B1 Mutations: A Distinct Subclass Associated with Late-Onset Metastases ». *Ophthalmology* 123 (5): 1118-28. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.01.023>.
- Yewdell, Jonathan W., Devin Dersh, et Robin Fåhræus. 2019. « Peptide Channeling: The Key to MHC Class I Immunosurveillance? » *Trends in Cell Biology* 29 (12): 929-39. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.09.004>.
- Yu, Fa-Xing, Jing Luo, Jung-Soon Mo, Guangbo Liu, Young Chul Kim, Zhipeng Meng, Ling Zhao, et al. 2014. « Mutant Gq/11 promote uveal melanoma tumorigenesis by activating YAP ». *Cancer cell* 25 (6): 822-30. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.017>.
- Yu, Jindan, Jianjun Yu, Ram-Shankar Mani, Qi Cao, Chad J. Brenner, Xuhong Cao, Xiaoju Wang, et al. 2010. « An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression ». *Cancer Cell* 17 (5): 443-54. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.018>.
- Yu, Mengchao, Hongwei Liang, Zheng Fu, Xueliang Wang, Zhicong Liao, Yong Zhou, Yanqing Liu, et al. 2016. « BAP1 Suppresses Lung Cancer Progression and Is

- Inhibited by MiR-31 ». *Oncotarget* 7 (12): 13742-53. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7328>.
- Zecca, Luigi, Luigi Casella, Alberto Albertini, Chiara Bellei, Fabio A. Zucca, Mireille Engelen, Andrzej Zadło, Grzegorz Szewczyk, Mariusz Zareba, et Tadeusz Sarna. 2008. « Neuromelanin Can Protect against Iron-Mediated Oxidative Damage in System Modeling Iron Overload of Brain Aging and Parkinson's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 106 (4): 1866-75. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05541.x>.
- Zhang, Jian, Yen K. Lieu, Abdullah M. Ali, Alex Penson, Kathryn S. Reggio, Raul Rabadan, Azra Raza, Siddhartha Mukherjee, et James L. Manley. 2015. « Disease-associated mutation in SRSF2 misregulates splicing by altering RNA-binding affinities ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (34): E4726-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514105112>.
- Zhang, Rui, Hao-Xiang Wu, Ming Xu, et Xiaoyan Xie. 2020. « KMT2A/C mutations function as a potential predictive biomarker for immunotherapy in solid tumors ». *Biomarker Research* 8 (décembre): 71. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00241-0>.
- Zhang, Xueling, Jini Qiu, Feifei Huang, Peizhen Han, Kun Shan, et Chaoran Zhang. 2022. « Construction and Verification of a Hypoxia-Related Nine-Gene Prognostic Model in Uveal Melanoma Based on Integrated Single-Cell and Bulk RNA Sequencing Analyses ». *Experimental Eye Research* 223 (août): 109214. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.109214>.
- Zhang, Yanmei, Mei Gong, Huiling Yuan, Hong G. Park, Henry F. Frierson, et Hui Li. 2012. « Chimeric Transcript Generated by Cis-Splicing of Adjacent Genes Regulates Prostate Cancer Cell Proliferation ». *Cancer Discovery* 2 (7): 598-607. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0042>.
- Zhang, Yu, Rachel Patton McCord, Yu-Jui Ho, Bryan R. Lajoie, Dominic G. Hildebrand, Aline C. Simon, Michael S. Becker, Frederick W. Alt, et Job Dekker. 2012. « Chromosomal translocations are guided by the spatial organization of the genome ». *Cell* 148 (5): 908-21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.002>.
- Zhao, Bin, Li Li, Qunying Lei, et Kun-Liang Guan. 2010. « The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version ». *Genes & Development* 24 (9): 862-74. <https://doi.org/10.1101/gad.1909210>.
- Zhao, Jonathan C., Jianjun Yu, Christine Runkle, Longtao Wu, Ming Hu, Dayong Wu, Jun S. Liu, Qianben Wang, Zhaohui S. Qin, et Jindan Yu. 2012. « Cooperation between Polycomb and Androgen Receptor during Oncogenic Transformation ». *Genome Research* 22 (2): 322-31. <https://doi.org/10.1101/gr.131508.111>.
- Zhu, Jiang, Fuhong He, Songnian Hu, et Jun Yu. 2008. « On the Nature of Human Housekeeping Genes ». *Trends in Genetics: TIG* 24 (10): 481-84. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.08.004>.

**RAPPORT DE SOUTENANCE DU PR STEPHANE LE CROM, PRESIDENT DU JURY
DE THESE**

Rapport de soutenance – David Gentien
Thèse soutenue le lundi 10 octobre 2022

La soutenance orale de David Gentien et la clarté avec laquelle il a réussi à présenter et expliquer le sujet complexe de l'analyse multi-omique du mélanome uvéal ont permis de démontrer ses qualités de pédagogue. Le travail réalisé est véritablement impressionnant. Un effort important a été effectué au moment de l'oral pour présenter la somme des données accumulées pendant toutes ces années lors d'une soutenance bien construite et dont le fil directeur était clairement mis en avant. Il faut souligner que la recherche menée par David Gentien a été faite en parallèle de son travail de responsable de plateforme nécessitant de concilier l'avancement de sa thèse avec ses obligations envers ses utilisateurs.

David Gentien lors de la soutenance a aussi fait preuve d'un grand esprit de synthèse. Sa présentation très structurée par rapport au manuscrit a permis de clairement poser les questions importantes et de souligner les aspects les plus novateurs de son travail. Une sélection personnelle a été réalisée dans la sélection des données présentées pour rendre la présentation accessible à tout l'auditoire. Il faut saluer la quantité de données qui ont été générées qui seront utiles dans l'avenir à tous ceux qui travailleront dans le domaine. On ne peut que souhaiter que ce travail puisse être publié dans une revue permettant de rendre facilement visible cette ressource inestimable.

L'échange ouvert et animé avec le jury qui a suivi la présentation orale, a couvert un large spectre de questions auxquelles David Gentien a su répondre avec précision en faisant non seulement preuve de maturité et de recul mais également de polyvalence pour aborder aussi bien les questions expérimentales que les enjeux médicaux derrière les résultats présentés. Le jury a été impressionné par l'honnêteté dont a fait preuve David Gentien en indiquant précisément les limites de ses connaissances actuelles. Le jury a eu plaisir à discuter avec un collègue chercheur suffisamment à l'aise pour qu'on lui pose des questions difficiles tout en faisant preuve d'un véritable esprit critique sur les résultats produits. Même si tous les aspects de son travail ont été abordés, David a su conserver un fil directeur clair de son analyse. Il a ainsi démontré son intérêt pour tous les aspects technologiques de ce projet dont nous sommes certains que ses futurs collègues pourront profiter sur sa plateforme.

Le jury à l'unanimité félicite David Gentien pour tout son travail et en conséquence, lui décerne le grade de Docteur de l'université Paris-Saclay.

Stéphane Le Crom
Président du jury



Title : Gene expression regulation analysis by a multi-omics approach in two models of aggressive uveal melanoma.

Keywords : Uveal Melanoma, Multiomic Analysis, Genomic instability, DNA topology, BAP1, PRAME.

Abstract : Uveal melanoma (UM) is a rare cancer resulting from transformation of melanocytes residing in the uveal tract and is associated with a very poor outcome in the metastatic setting. Integrative analysis including copy number alterations, DNA methylation, recurrent mutations, and gene expression profiles, has identified four molecular and clinical subsets in UM.

To improve our understanding of UM tumorigenesis, we performed an extensive multi-omics characterization by comparing pure melanocyte populations obtained from two aggressive UM patient-derived xenograft models (PDX) with normal choroidal melanocytes (NM). Our study addresses for the first time in UM, optical DNA mapping, multispectral FISH analysis, specific modifications of histone marks and Hi-C analysis of DNA topology.

Comparisons of gene expression profiles between aggressive UM and NM models

suggest that deregulation of DNA repair is a hallmark of UM. In addition, high-resolution cytogenetic analyses reveal evidence of genomic instability in UM samples.

Our study also identified a deletion with hypermethylated boundaries in the BAP1 gene promoter that results in the absence of expression of this gene, the inactivation of which is associated with a high risk of metastasis in UM patients. DNA topology studies reveal stable compartments with TADs containing the majority of differentially expressed genes. Importantly, changes in chromatin topology are associated with upregulation of PRAME, a recognized independent prognostic biomarker in UM and a potential therapeutic target.

In conclusion, our study illustrates how multi-omics integrative approaches can improve the understanding of tumorigenesis and reveals two novel mechanisms of gene expression dysregulation in UM.

Titre : Etude de la régulation de l'expression génique par une approche multi-omique dans deux modèles de mélanome uvéal agressif.

Mots clés : Mélanome Uveal, Analyse multi-omique, Instabilité génomique, Topologie de l'ADN, BAP1, PRAME.

Résumé : Le mélanome uvéal (UM) est un cancer rare résultant de la transformation des mélanocytes résidant dans le tractus uvéal et est associé à un très mauvais pronostic en situation métastatique. L'analyse intégrative, comprenant les altérations du nombre de copies, la méthylation de l'ADN, les mutations récurrentes et les profils d'expression génique, a identifié quatre sous-ensembles moléculaires et cliniques dans l'UM.

Pour améliorer notre compréhension de la tumorigenèse de l'UM, nous avons effectué une caractérisation multi-omique approfondie en comparant des populations de mélanocytes purs obtenues à partir de deux modèles agressifs de xénogreffes dérivées de patients UM (PDX) avec des mélanocytes choroïdiens normaux (NM). Notre étude aborde pour la première fois dans l'UM, la cartographie optique de l'ADN, l'analyse FISH multispectrale, les modifications spécifiques des marques d'histones et l'analyse de la topologie de l'ADN par Hi-C. Les comparaisons de profils d'expression génique entre les modèles d'UM agressif et les NM suggèrent que la dérégulation de la réparation de l'ADN est une

caractéristique de l'UM. De plus, des analyses cytogénétiques à haute résolution révèlent des signes d'instabilité génomique dans les échantillons d'UM.

Notre étude a également identifié une délétion avec des limites hyper méthylées dans le promoteur du gène *BAP1* qui se traduit par l'absence d'expression de ce gène dont l'inactivation est associée à un risque élevé de métastases chez les patients UM. Les études de topologie de l'ADN révèlent des compartiments stables avec des TAD contenant la majorité des gènes exprimés de manière différentielle. Il est important de noter que les modifications de la topologie de la chromatine sont associées à une régulation à la hausse de PRAME, un biomarqueur pronostique indépendant reconnu dans l'UM et une cible thérapeutique potentielle.

En conclusion, notre étude illustre comment les approches intégratives multi-omiques peuvent améliorer la compréhension de la tumorigenèse et révèle deux nouveaux mécanismes de dérégulation de l'expression génique dans l'UM.