



**HAL**  
open science

# Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées du mélanome : implication du facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor

Nina Tardif

► **To cite this version:**

Nina Tardif. Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées du mélanome : implication du facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1B041 . tel-03847626

**HAL Id: tel-03847626**

**<https://theses.hal.science/tel-03847626>**

Submitted on 10 Nov 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.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : Cancérologie

Par **Nina TARDIF**

## **Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées du mélanome : Implication du facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 25 octobre 2019  
Unité de recherche : UMR6290 CNRS-UR1 Institut de Génétique et Développement de Rennes  
Équipe Expression des Gènes et Oncogène

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Corine Bertolotto DR, U1065 Inserm C3M  
Xavier Coumoul PU, Univ. Paris V, UMR-S1124 T3S

### **Composition du Jury :**

Examineurs : Gilles Favre  
Dominique Lagadic-Gossmann

PU-PH, Univ. Toulouse 3, UMR1037 Inserm CRCT  
DR, Univ. Rennes 1, UMR1085 IRSET

Rapporteurs : Corine Bertolotto  
Xavier Coumoul

DR, U1065 Inserm C3M  
PU, Univ. Paris V, UMR-S1124 T3S

Dir. de thèse : Marie-Dominique Galibert  
Co-dir. de thèse : Sébastien Corre

PU-PH, Univ. Rennes 1, UMR6290 UR1-CNRS IGDR  
CR, Univ. Rennes 1, UMR6290 UR1-CNRS IGDR



## Remerciements

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ma thèse. Je remercie en premier lieu le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation d'avoir financé mes travaux de thèse. J'adresse également mes sincères remerciements à Corine Bertolotto, Xavier Coumoul, Gilles Favre et Dominique Lagadic-Gossmann pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie ma directrice de thèse, Marie-Dominique Galibert, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de cette équipe. Merci pour tous les conseils, toutes les discussions scientifiques et pour toute l'aide que vous m'aurez apportée au cours de ces trois ans. Merci d'avoir pris du temps pour moi, même quand vous n'en aviez pas.

Je remercie mon co-directeur de thèse, Sébastien Corre. Merci de m'avoir encadrée au quotidien pendant presque quatre ans. D'abord en M2, où quand tu m'as demandé si je comptais poursuivre en thèse j'ai répondu d'un « non » plus ou moins catégorique, et puis finalement pendant les trois ans qu'auront duré ma thèse. Merci de m'avoir fait découvrir au mieux et aimer le monde de la recherche. Je te remercie pour tout ce que tu m'auras appris, pour la gentillesse et la bonne humeur avec laquelle tu l'auras fait et pour toutes les conversations, scientifiques ou non, qu'on aura pu avoir.

Je remercie également les autres membres de l'équipe GEO, à commencer par Héloïse et Anaïs(bis), membres du clan des « NHA ». Anaïs, je voudrais d'abord m'excuser d'avoir envahi ton bureau en permanence avec toutes mes feuilles volantes. Je te remercie pour ta bonne humeur, et puis plus récemment pour les western blots et autres manip à la chaîne qui m'ont permis d'écrire ma thèse plus sereinement. Je te laisse la relève, j'espère que tu prendras autant de plaisir à faire ta thèse avec Sébastien que j'en aurai eu.

Héloïse, je te remercie pour ton implication sur les projets, mais aussi pour ta joie de vivre, ton esprit d'aventure, pour tous les bons moments qu'on aura partagés et il y en aura eu beaucoup (les soirées, les week-ends surf, les balades à cheval...). Je vous souhaite à toi et Morgan plein de bonnes choses pour la suite de vos aventures en Nouvelle-Zélande.

Je voudrais ensuite remercier les deux autres membres du bureau : Arthur et Anaïs=).

Anaïs, merci de m'avoir tenu compagnie de nombreux soirs au labo, et merci de ne pas te priver pour me faire des remarques à chaque fois que mon vocabulaire ne te plait pas ! Je ne peux pas vous remercier, toi et Héroïse, sans mentionner les (nombreuses) heures qu'on aura passées place du Champ-Jacquet, parce qu'il n'est jamais trop tôt, ni trop tard, pour un verre de Chardonnay (et pour les potins qui vont avec). Je ne sais pas ce que ça dit sur moi, mais c'est sûrement ce qui me manquera le plus !

Arthur merci pour toutes les discussions scientifiques, pour les mille chansons que tu auras réussi à me mettre dans la tête mais surtout, merci d'avoir pris un soin tout particulier à ce que mon égo ne gonfle pas !

Laura, merci pour ton soutien inconditionnel. Merci de toujours avoir pris le temps de m'écouter et de répondre à mes questions diverses et variées à chaque fois que j'en ai eu besoin. J'en profite pour remercier aussi Anthony, tu m'auras évité de perdre six mois de thèse sur ce foutu clonage ! Merci à vous deux pour tous les bons moments qu'on aura passés hors du labo, les soirées jeux de société et pour notre équipe de choc d'escape game. Une chose est sûre, c'est que vous mériterez toutes les bonnes choses qui pourront vous arriver, et j'espère qu'elles seront nombreuses.

Anne, merci pour ta bonne humeur, ton sourire communicatif et ta spontanéité qui égayent le labo chaque jour. Merci pour tous les moments mémorables qu'on aura partagés. Je suis ravie que tu sois arrivée en Bretagne et que tu en sois tombée amoureuse, même si tu exagères un peu à acheter tout ce qui commence par « Breizh » !

Pour tous les « jeunes » de l'équipe, ça aura vraiment été un plaisir de faire une thèse dans cet environnement. Si une thèse n'est pas facile tous les jours, votre présence l'aura facilitée.

Je voudrais également remercier David, merci pour tes nombreux conseils scientifiques, pour toutes les discussions et pour ton engagement sur les projets.

Anne-Gaëlle, Lise et Virginie, merci pour vos conseils et toutes les discussions enrichissantes qu'on aura pu avoir.

Je remercie les anciens membres de l'équipe GEO que j'aurais eu l'occasion de côtoyer pendant ma thèse : Mélodie, Emmanuelle et puis « les Leucémies », Jérémie, Lydie et Hélène, sans oublier Lucie, ma partenaire de Master 2, avec qui j'aurai partagé mes plus belles gaffes de manip et à peu près trois millions de colonnes d'extraction d'ARN.

Je voudrais également remercier toutes les personnes au sein de l'IGDR qui en font un lieu de travail agréable : le service gestion, Géraldine, Philippe, le comité de cohésion sociale ainsi que tous les étudiants de l'institut. Je remercie les membres de mon comité de thèse, Frédéric Mourcin, Farzad Pakdel et Alain Dupuy, d'avoir pris le temps de me conseiller sur mon projet de thèse et pour leurs conseils avisés.

Pour finir, je voudrais remercier ma famille et mes amis. Tout d'abord François, merci pour ton soutien et pour ta patience au quotidien. Merci de m'avoir écouté me plaindre (beaucoup ces dernières semaines), même si des fois tu ne m'écoutes que d'une oreille !

Merci à Clara, Florian, Clem, Fanny, Emma... pour tous les bons moments, les soirées, les souvenirs (t'as capté ?) qu'on a partagés pendant toutes ces années ou qu'on a ramenés de vacances. Je ne sais pas où je serai dans les années à venir mais je sais où je serai chaque premier week-end de Juillet. La vie serait vachement moins fun sans vous.

Je finirai par remercier tous les membres de la famille Tardif-Lecoœur, la meilleure famille au monde, et particulièrement mes parents pour m'avoir laissé la liberté la plus totale dans le choix de mes études. Ce que je fais au quotidien est peut-être un peu vague mais vous m'avez quand même toujours soutenue.

Merci à tous.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>9</b>
<b>I. Le mélanome cutané</b> .....	<b>9</b>
1. STRUCTURE ET FONCTIONS DE LA PEAU .....	9
a. <i>L'épiderme</i> .....	9
b. <i>Les mélanocytes et la production de mélanine</i> .....	10
2. LES DIFFERENTS TYPES DE MELANOMES .....	12
3. CRITERES D'AVANCEE DE LA MALADIE .....	13
4. ÉPIDEMIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE .....	14
5. LE DEVELOPPEMENT DU MELANOME CUTANE .....	15
a. <i>La voie de signalisation des MAPK</i> .....	15
b. <i>Nævus bénin</i> .....	16
c. <i>Nævus dysplasique</i> .....	17
d. <i>Mélanome in situ</i> .....	17
e. <i>Mélanome invasif</i> .....	18
f. <i>Mélanome métastatique</i> .....	20
<b>II. Prise en charge et traitement du mélanome métastatique</b> .....	<b>23</b>
1. LA DACARBAZINE, PREMIERE CHIMIOOTHERAPIE DU MELANOME .....	24
2. LA MUTATION BRAF <sup>V600E</sup> ET CONSEQUENCES FONCTIONNELLES .....	25
3. LES THERAPIES CIBLEES DU MELANOME METASTATIQUE .....	26
a. <i>Première génération : les inhibiteurs non spécifiques de type II</i> .....	26
b. <i>Les inhibiteurs de BRAF de deuxième génération</i> .....	27
c. <i>Les inhibiteurs de BRAF de troisième génération</i> .....	30
d. <i>Association des inhibiteurs de BRAF aux inhibiteurs de MEK</i> .....	31
4. LES IMMUNOTHERAPIES .....	33
a. <i>Anticorps anti-CTLA4</i> .....	34
b. <i>Anticorps anti-PD1</i> .....	35
<b>III. Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées</b> .....	<b>38</b>
1. MECANISMES DE RESISTANCE GENOMIQUES .....	39
a. <i>Résistance génomique dépendante de la voie des MAPK</i> .....	39
b. <i>Résistance génomique indépendante de la voie des MAPK</i> .....	41



2.	MECANISMES DE RESISTANCES NON GENOMIQUES .....	42
3.	EXPRESSION DE MITF ET CONTROLE DES PHENOTYPES CELLULAIRES .....	44
4.	L'IMPORTANCE DU PHENOTYPE « CELLULE SOUCHE » .....	50
<b>IV.</b>	<b>Le facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor .....</b>	<b>52</b>
1.	STRUCTURE .....	53
a.	<i>Domaine bHLH</i> .....	53
b.	<i>Domaine PAS</i> .....	54
c.	<i>Domaine de transactivation</i> .....	54
2.	MODES D'ACTIVATION D' AHR .....	55
a.	<i>Activation canonique</i> .....	55
b.	<i>Activation non-canonique</i> .....	55
c.	<i>Régulation du niveau protéique d'AhR</i> .....	57
3.	DIVERSITE DES LIGANDS D' AHR.....	58
a.	<i>Ligands exogènes</i> .....	58
b.	<i>Ligands endogènes</i> .....	59
4.	FONCTIONS D' AHR.....	60
a.	<i>Le métabolisme des xénobiotiques</i> .....	60
b.	<i>Immunité</i> .....	61
c.	<i>AhR dans la peau</i> .....	62
5.	AHR, ACTEUR DU CANCER .....	63
a.	<i>Fonctions anti-tumorales protectrices d'AhR</i> .....	64
b.	<i>Rôle pro-tumoral d'AhR</i> .....	64
c.	<i>Développement et utilisation thérapeutique des antagonistes d'AhR</i> .....	67
	<b>OBJECTIFS DE THÈSE .....</b>	<b>69</b>
	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>70</b>
	I. L'activation chronique du facteur de transcription AhR participe à l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome.....	73
	II. AhR conduit le switch de phénotype associé à l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome.....	119
	III. Utilisation thérapeutique des antagonistes d'AhR dans le traitement du mélanome en combinaison avec les inhibiteurs de BRAF.....	167
	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>213</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>225</b>

# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE DE LA PEAU ET DE L'EPIDERME.....	10
FIGURE 2 : STADES DE DEVELOPPEMENT DES MELANOSOMES ET PRODUCTION DE MELANINE ASSOCIEE.....	11
FIGURE 3 : LES DIFFERENTS TYPES DE MELANOME .....	12
FIGURE 4 : PROGRESSION DU MELANOME SELON LE MODELE DE CLARK .....	13
FIGURE 5 : CASCADE DE SIGNALISATION DE LA VOIE DES MAPK.....	16
FIGURE 6 : MODELE DE PROGRESSION ET CHARGE MUTATIONNELLE DES MELANOMES ASSOCIES A L'EXPOSITION AUX RAYONS UV.....	19
FIGURE 7 : MODELE D'EXPRESSION DES SIGNATURES GENETIQUES ASSOCIEES A LA PROGRESSION DU MELANOME.....	21
FIGURE 8 : MODELE DE RHEOSTAT DE MITF.....	22
FIGURE 9 : STRUCTURE DE LA DACARBAZINE (DTIC) .....	24
FIGURE 10 : STRUCTURE DE LA PROTEINE BRAF.....	26
FIGURE 11 : MECANISME D'ACTION DES INHIBITEURS DE BRAF ET ACTIVATION PARADOXALE DE LA VOIE DES MAPK.....	29
FIGURE 12 : STRUCTURE DES DIFFERENTS INHIBITEURS DE BRAF.....	31
FIGURE 13 : MECANISME D'ACTION DES IMMUNOTHERAPIES ANTI-CTLA4 ET ANTI-PD1.....	35
FIGURE 14 : ARBRE DECISIONNEL POUR LA PRISE EN CHARGE DE PATIENTS ATTEINTS DE MELANOME DE STADE III OU IV.....	37
FIGURE 15 : MODELE DE REPONSE A LA COMBINAISON BRAFI+MEKI CHEZ LA SOURIS (MODELE PDX).....	39
FIGURE 16 : VOIE DE SIGNALISATION PI3K/AKT/MTOR. ADAPTE DE JANKU ET AL. 2018 .....	41
FIGURE 17 : DIVERSITE DES MECANISMES DE RESISTANCE AUX BRAFI .....	42
FIGURE 18 : DIFFERENTS MECANISMES DE RESISTANCE AUX BRAFI.....	44
FIGURE 19 : SOUS-TYPES CELLULAIRES DU MELANOME SELON TSOI ET AL. 2018.....	45
FIGURE 20 : HETEROGENEITE TUMORALE PENDANT LA PROGRESSION DU MELANOME SELON RAMBOW ET AL. 2018 .....	49
FIGURE 21 : THEORIES D'EVOLUTION ET D'ADAPTATION AU TRAITEMENT SELON DARWIN ET LAMARCK.....	51
FIGURE 22 : STRUCTURES DES PROTEINES DE LA FAMILLE BHLH-PAS.....	54
FIGURE 23 : VOIES DE SIGNALISATION CANONIQUE ET NON CANONIQUE D'AHR.....	57
FIGURE 24 : EXEMPLES DE STRUCTURES DE LIGANDS EXOGENES D'AHR, D'ORIGINE NATURELLE OU SYNTHETIQUE.....	59
FIGURE 25 : METABOLISME DES XENOBIOTIQUES .....	61
FIGURE 26 : MUTATIONS D'AHR IDENTIFIEES DANS LES TUMEURS.....	63
FIGURE 27 : ROLE PRO-TUMORAL D'AHR ET ORIGINE DES LIGANDS ACTIVEURS.....	66



# LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique	DTIC : Dacarbazie
AhR : Aryl hydrocarbon Receptor	EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
AhRR : Aryl hydrocarbon Receptor Repressor	EMT : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
AKT : protéine kinase B, sérine/thréonine kinase	EPHA2 : Ephrin type-A receptor 2
ALDH1A1 : aldéhyde déshydrogénase 1 de type H1	ERK 1/2 : Extracellular signal-regulated kinases 1/2
ALM : Acral Lentiginous Melanoma	FDA : Food and Drug Administration
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique	FICZ : 6-formylindolo[3,2-b]carbazole
AQP1 : Aquaporin 1	FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3
ARID1A : AT-rich interactive domain-containing protein 1A	FOXD3 : Forkhead box D3
ARID2 : AT-rich interactive domain-containing protein 2	FSHR : Follicle Stimulating Hormone Receptor
ARNT : AhR Nuclear Translocator	GST : Glutathion S-transferase
ATP : adénosine triphosphate	HAH : hydrocarbures aromatiques halogénés
AXL : AXL tyrosine kinase	HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques
bHLH : basic helix-loop-helix	HDAC : histone désacétylase
BRAF : proto-oncogène, sérine/thréonine kinase	HGF : Hepatocyte growth factor
BRAFi : inhibiteurs de BRAF	HIF : Hypoxia Inducible Factor
c-SRC : proto-oncogène, sérine/thréonine kinase	Hsp90 : Heat shock protein 90
CAR : Constitutive Androstane Receptor	IDO 1/2 : Indoleamine 2,3-dioxygénase 1/2
CCLÉ : Cancer Cell Line Encyclopedia	IGFR : Insulin-like Growth Factor Receptor
CDKN2A : cyclin dependent kinase inhibitor 2A	ITE : Aryl hydrocarbon receptor ligand
CIRC : Centre International de la Recherche sur le Cancer	KLF6 : Kruppel Like Factor 6
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	KO : Knockout
Cobi : Cobimetinib	KRAS : proto-oncogène, sérine/thréonine kinase
COT : COT protein kinase	Kyn : Kynurénine
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes	LMM : Lentigo Maligna Melanoma
CR : Complete Response	LPS : Lipopolysaccharide
CSC : Cancer Stem Cell	LT : Lymphocytes T
CTLA4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	M : sous-type mélanocytaire
CYP1A1 : Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
Dab : Dabrafenib	MC1R : MelanoCortin 1 Receptor
	MEC : Matrice Extra-Cellulaire
	MEK 1/2 : Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2
	MEKi : inhibiteurs de MEK

MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor

MMP : matrix metalloproteinases

MRD : Minimal Residual Disease

MRP : Multidrug Resistance Protein

mTOR : mechanistic target of rapamycin - auparavant mammalian target of rapamycin

MUP : Melanoma of Unknown Origin

NC : sous-type « neural crest-like »

NC-XRE : Non-canonical XRE

NCSC : Neural Crest-like Stem Cells

NES : Nuclear Export Signal

NF1 : neurofibromatose 1

NF $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B

NGFR : Nerve Growth Factor Receptor

NLS : Nuclear Localization Signal

NM : Nodular Melanoma

NRAS : proto-oncogène, GTPase

NSCLC : Non Small Cell Lung Carcinoma

OS : Overall Survival

p-GP : glycoprotéine P

P23 : protéine p23

PAS : Per-ARNT-Sim family

PAX3 : Paired Box 3

PD1 : Programmed Cell Death 1

PDGFRB : Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta

PDX : Patient Derived Xenograft

PFS : Progression Free Survival

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

POMC : Pro-opiomelanocortin

PR : Partial Response

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PXR : Pregnane X Receptor

RGP : Radial Growth Phase

RTK : Récepteur à activité Tyrosine Kinase

RXRG : Retinoid X Receptor Gamma

SMC : Starved-like Melanoma Cells

SSM : Superficial Spreading Melanoma

SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable

T : sous-type transitoire

TAD : Transactivation Domain

TCAB : 3,4,3',4'-tetrachloroazobenzene

TCAOB : 3,3',4,4'-Tetrachloroazoxybenzene

TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine

TCGA : The Cancer Genome Atlas

TCR : récepteur des cellules T

TDO 1/2 : Tryptophan 2,3-dioxygénase 1/2

TEAD : Transcriptional enhancer factor TEF-1 domain family

TERT : Telomerase reverse transcriptase

TGF- $\beta$  : transforming growth factor beta

Th17 : Lymphocyte T producteur d'IL-17

TN : mélanomes triples négatifs

TNF : Tumor Necrosis Factor

TP53 : Tumor Protein 53

Tram : Trametinib

TRAMP : Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate

Treg : Lymphocyte T régulateur

TYR : Tyrosinase

TYRP1 : Tyrosinase-related protein 1

TYRP2 : Tyrosinase-related protein 2

U : sous-type indifférencié

USF1 : Upstream stimulatory factor 1

UV : rayons Ultra-Violetes

VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

Vem : Vemurafenib

VGP : Vertical Growth Phase

WNT5A : proto-oncogène, glycoprotéine

XAP2 : HBV X-associated protein 2

XRE : Xenobiotic Response Elements

ZEB1 : Zinc finger E-box-binding homeobox 1

ZEB2 : Zinc finger E-box-binding homeobox 2

$\alpha$ -MSH :  $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone

# INTRODUCTION



# INTRODUCTION

## I. Le mélanome cutané

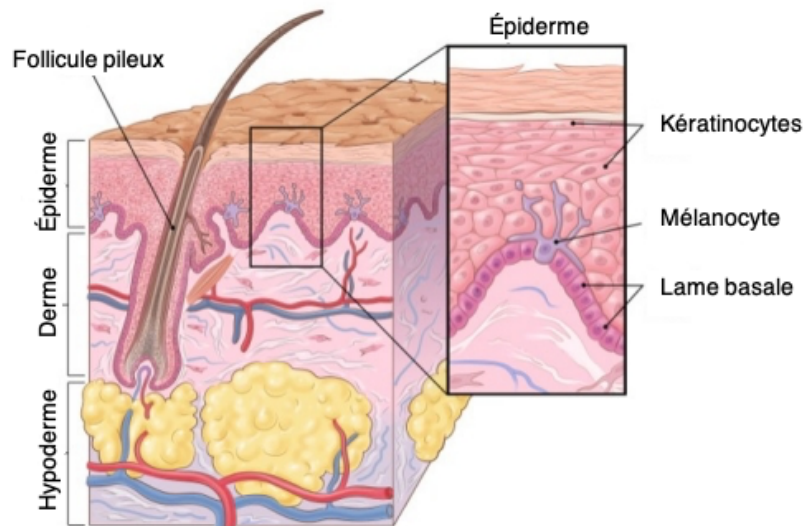
### 1. Structure et fonctions de la peau

La peau représente en moyenne 15% de l'organisme, ce qui en fait le plus vaste organe du corps humain. Elle est la première barrière de protection contre les agressions extérieures, qu'elles soient physiques, chimiques ou biologiques. Elle participe également à la régulation thermique par les mécanismes de sudation et de constriction/dilatation des vaisseaux sanguins. Elle s'organise en trois couches successives : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Figure 1).

#### a. L'épiderme

L'épiderme, couche la plus externe et la plus superficielle de la peau, est un épithélium stratifié, assurant une part majeure du rôle protecteur de la peau (Figure 1). Plusieurs types cellulaires le composent : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans (cellules dendritiques immunitaires de la peau et des muqueuses) et les cellules de Merkel (cellules nerveuses réceptrices, sensibles à la pression). L'épiderme est divisé en quatre couches successives : la lame basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (de la plus profonde à la plus externe). Ces différentes couches sont nommées en fonction de l'état de différenciation des kératinocytes, représentant 85% des cellules. En réponse à différents facteurs environnementaux, les kératinocytes vont se différencier et progresser des couches profondes vers la surface de l'épiderme, pour enfin acquérir les caractéristiques des kératinocytes de la couche cornée (les cornéocytes). Ces cellules ne survivent que peu de temps avant de se détacher de l'épiderme et doivent donc être remplacées continuellement par des cellules provenant des couches inférieures. Leur fonction principale est la production de kératine, protéine fibreuse de la couche cornée. Les kératinocytes, formant un réseau cellulaire très dense et soudé (jonctions cellulaires adhérentes, desmosomes et hémidesmosomes), vont aussi protéger l'organisme contre les pressions mécaniques. Enfin, ils permettent une protection contre les irradiations aux rayons solaires ultra-violet (UV) et les dommages à l'ADN qu'ils induisent, grâce à la mélanine produite par les mélanocytes (Figure 2).





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

### b. Les mélanocytes et la production de mélanine

Les mélanocytes sont, après les kératinocytes, les cellules les plus représentées au sein de l'épiderme et sont localisés au niveau de la lame basale. Originaires des cellules souches de la crête neurale, ils migrent pendant le développement embryonnaire jusque dans l'épiderme où ils se différencient (Larue et al., 2003). L'acquisition de l'expression du facteur de transcription Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF) marque l'engagement dans la lignée mélanocytaire (Mort et al., 2015). Les mélanocytes présentent des prolongements dendritiques s'infiltrant entre les kératinocytes, permettant une communication étroite entre ces deux types cellulaires. Un mélanocyte peut ainsi communiquer avec 30 à 40 kératinocytes (Quevedo et al., 1975), appelée unité épidermique de mélanisation.

La fonction première des mélanocytes est la production de mélanine, pigment assurant la coloration de la peau et des cheveux. Une fois transférée aux kératinocytes, la mélanine permettra leur protection face aux irradiations UV en absorbant ou dispersant ces rayons (Lin and Fisher, 2007). Il existe deux types de mélanines : l'eumélanine (pigment brun photoprotecteur), et la phéomélanine (pigment orange cytotoxique) (Thody et al., 1991). Le ratio de production de ces deux pigments explique la grande diversité de couleurs de peau, mais également le degré de protection face aux UV car la phéomélanine, moins foncée, ne protège que peu. Enfin, il est possible de distinguer la pigmentation constitutive, c'est-à-dire la couleur de la peau, de la pigmentation photo-induite en réponse aux UV.

La synthèse des deux pigments se fait dans un organe spécifique des mélanocytes : le mélanosome (eumélanosome ou phéomélanosome) et implique plusieurs enzymes et protéines structurales. Il existe quatre stades de développement du mélanosome, déterminés par la quantité, la qualité et la structure de la mélanine qui y est produite (Cichorek et al., 2013) (Figure 2).

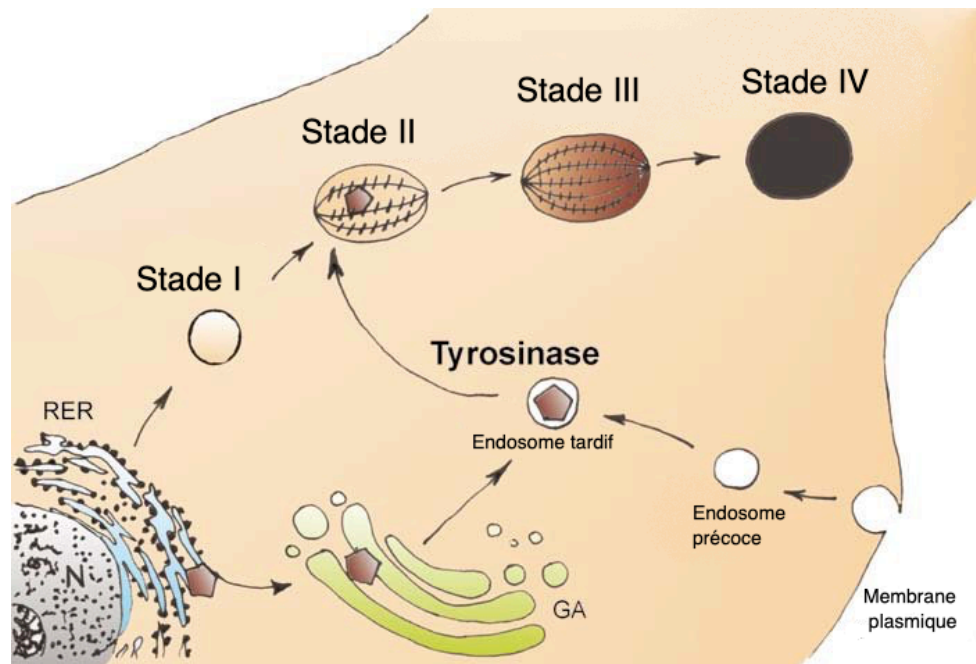


Figure 2 : Stades de développement des mélanosomes et production de mélanine associée. Adapté de Cichorek et al., 2013

Les mélanosomes, de plus en plus matures, migrent vers les dendrites en connexion avec les kératinocytes. La mélanine mature est ensuite transférée aux kératinocytes et leur assure une protection contre les UV. En amont du mélanocyte, la cascade de pigmentation commence par l'exposition aux rayonnements UV des kératinocytes. Les UV, absorbés par les molécules d'ADN, entraînent la formation de photoproduits (Cadet and Douki, 2018) et une réponse de stress cellulaire *via* l'activation du facteur de stress majeur : la protéine p53 (Latonen et al., 2001). Une fois activée, p53 se fixe au promoteur du gène *POMC*, induisant la synthèse de  $\alpha$ -mélanocyte stimulating hormone ou  $\alpha$ -MSH (Cui et al., 2007) qui se fixe alors au récepteur MC1R (Melanocortin-1 Receptor), entraînant l'activation de la voie de signalisation AMPc et l'activation du facteur de transcription MITF. Ce facteur de transcription indispensable à la pigmentation va alors induire l'expression, entre autre, des enzymes essentielles telles que TYRP1 et TYRP2 (Dopachrome Tautomérase) (Goding, 2000).

## 2. Les différents types de mélanomes

Le mélanome est une pathologie cancéreuse résultant de la transformation maligne de cellules cutanées saines : les mélanocytes. Les mélanocytes ne sont pas uniquement présents au niveau de la peau, mais sont aussi retrouvés dans les follicules pileux, au niveau de l'œil dans l'uvéa, dans les méninges et le tractus ano-génital. De ces différentes localisations se développent diverses lésions cancéreuses, différant par leur caractéristiques cliniques, histologiques et génétiques (Bastian, 2014). Chaque type de mélanome se développe à une fréquence et avec une agressivité qui lui sont propres. On distingue quatre types principaux de mélanomes (Clark et al., 1986): le mélanome à dissémination superficielle (SSM, Superficial Spreading Melanoma), le mélanome Lentigo Maligna (LMM), le mélanome nodulaire (NM) et le mélanome acral lentigineux (ALM, Acral Lentiginous Melanoma). Il est à noter que pour 7% des mélanomes métastatiques aucune tumeur primaire n'est retrouvée. Ces mélanomes sont appelés MUP (Melanoma of Unknown Primary) (Dutton-Regester et al., 2013) (Figure 3).

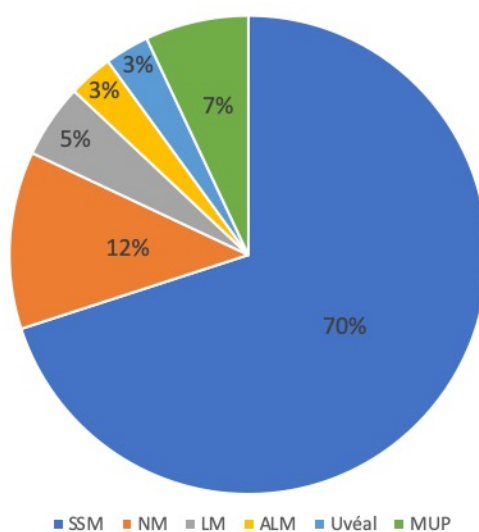


Figure 3 : Les différents types de mélanome

Les mélanomes SSM se développent sur des régions de la peau exposées aux UV mais ne présentant pas de dommages chroniques comme les jambes, les bras ou le dos. On retrouve chez les patients atteints de SSM une mutation récurrente : la mutation T1799A du gène *BRAF*, entraînant la mutation V600E de la kinase BRAF ( $BRAF^{V600E}$ ), qui contribue à l'initiation du développement tumoral (détaillée en partie II.2, p25-26) et sera retrouvée dans 42% des mélanomes métastatiques dont 90% des SSM. Ils se développent relativement tôt (en moyenne 50 ans) et ont une charge mutationnelle moyenne.

### 3. Critères d'avancée de la maladie

Les nævi, ou grains de beauté, sont dans la grande majorité des cas bénins. Cependant, certains critères visuels, communément appelés ABCDE du mélanome, permettent d'identifier un nævus à risque. Ainsi, si un nævus est Asymétrique (A), présente des Bords irréguliers (B), une Couleur non homogène (C), un Diamètre supérieur à 6mm (D) ou une évolution d'un de ces critères (E), il doit alors bénéficier d'une surveillance accrue. D'un point de vue clinique, les mélanomes sont répertoriés selon la classification TNM (Tumor, Node, Metastasis c'est-à-dire tumeur, ganglion, métastase) établie par l'AJCC (American Joint Committee on Cancer). Cette classification comprend quatre stades d'avancée de la lésion cancéreuse (stades I à IV) (Balch et al., 2009). Brièvement, au stade I et II la tumeur reste localisée, mais une ulcération progressive apparaît. Puis des métastases sont retrouvées, tout d'abord au niveau du ganglion lymphatique le plus proche (ganglion sentinelle) au stade III, puis dans des sites distants au stade IV. À ces différents stades de développement de la maladie sont associés des altérations génétiques, de plus en plus nombreuses, qui seront discutées par la suite. Le modèle de Clark distingue lui 5 stades de progression, du nævus bénin au mélanome métastatique (Figure 4) qui sont associés à l'indice de Breslow (profondeur de la lésion), permettant une estimation de la survie à 5 ans en fonction de l'épaisseur de la lésion.

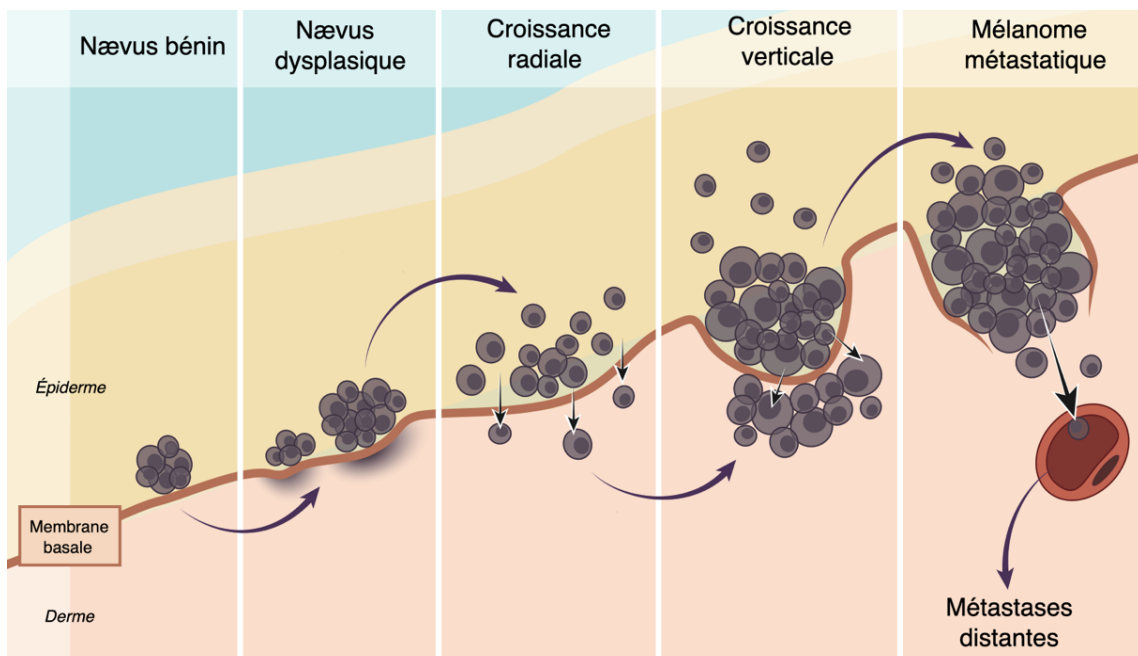


Figure 4 : Progression du mélanome selon le modèle de Clark. Adapté de pathophys.org

#### 4. Épidémiologie et facteurs de risque

Le mélanome cutané représente seulement 10% des cancers cutanés mais est le plus mortel au stade métastatique, comptant pour 75% des décès de cancers cutanés. Le mélanome compte parmi les cancers ayant eu ces 50 dernières années le taux de croissance le plus élevé. Ainsi en France l'incidence du mélanome est passée de 4 nouveaux cas à 11,1 pour 100 000 personnes chez la femme, et de 2,5 à 10,8 chez les hommes entre 1980 et 2012 ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)). Entre 2005 et 2012, l'incidence du mélanome est toujours en augmentation avec +2,9% pour les hommes et +1,7% pour les femmes. De par sa forte incidence, le mélanome reste donc aujourd'hui un problème majeur de santé publique et représente plus de 15 000 nouveaux diagnostics en France en 2018. Si les formes précoces sont associées à un excellent pronostic, ce n'est pas le cas des formes les plus avancées, pour lesquelles les chances de rémission sont extrêmement faibles. Il est donc important de prévenir au maximum le développement de ce cancer, ce qui passe par des campagnes et des consignes de prévention (détaillées par la suite) mais aussi par l'identification des facteurs de risques.

Il est aujourd'hui admis que divers facteurs génétiques et environnementaux participent au développement de la pathologie. Le principal facteur de risque environnemental du mélanome cutané est l'exposition aux rayonnements UV, issue majoritairement de l'exposition naturelle aux rayons solaires (particulièrement durant la petite enfance) mais également des expositions artificielles (cabines UV) (Berwick et al., 2016). En effet les UV entraînent de nombreux dommages à l'ADN comme des transitions C>T. Les mélanomes sont donc des cancers présentant une charge mutationnelle très élevée (Akbari et al., 2015). De façon surprenantes, les mutations driver du mélanome, qui seront décrites par la suite, n'ont pas les caractéristiques d'une signature UV.

Tous les individus ne présentent pas la même sensibilité aux UV. En effet, le phototype c'est-à-dire la couleur de la peau, des yeux et des cheveux, déterminé par le ratio de production de phéomélanine et eumélanine, influe sur la sensibilité aux UV (Fitzpatrick, 1988). Ainsi un phototype « peau claire, cheveux roux » contiendra plus de phéomélanine et moins d'eumélanine qu'un phototype « peau foncée, cheveux bruns », ce qui rendra ces individus plus photosensibles, moins protégés des effets des UV.

Le nombre de nævi a également été associé au risque de développer un cancer de la peau : une personne avec plus de 100 nævi aura 7 fois plus de risques de développer un mélanome qu'une personne en ayant moins de 15 (Berwick et al., 2016). L'histopathologie des

nævi est également un facteur de risque : un nævus atypique est plus propice à évoluer en lésion cancéreuse qu'un nævus commun.

Enfin, certaines familles présentent des formes héréditaires de mélanome, dues à la présence d'une mutation germinale (10% des mélanomes). La mutation germinale la plus fréquente touche le gène Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) (Aoude et al., 2015; Berwick et al., 2016). Entre 30 et 50% des individus porteurs d'une mutation germinale *CDKN2A* auront développé un mélanome à l'âge de 80 ans.

## 5. Le développement du mélanome cutané

Le développement du mélanome est dans la plupart des cas un processus long et graduel, passant par plusieurs stades de progression, associés à l'accumulation de nombreuses altérations génétiques somatiques. Ainsi, au stade métastatique, le mélanome cutané présente une charge mutationnelle conséquente (Chalmers et al., 2017). Les mutations initiatrices dites « driver », qui apportent généralement un avantage sélectif prolifératif important à un clone, sont à distinguer des mutations secondaires ou « passager », ne conférant qu'un avantage faible mais qui, lorsqu'elles s'accumulent et sont associées à une mutation driver, permettent l'expansion clonale et la croissance tumorale.

### a. La voie de signalisation des MAPK

Parmi les mutations driver du mélanome, nombreuses sont celles qui impactent la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Cette voie de signalisation, dérégulée dans près d'un cancer sur trois et ayant un rôle majeur dans le développement du mélanome, est impliquée dans la régulation de la prolifération, la migration et la survie cellulaire (Dhillon et al., 2007). L'activation de cette voie commence par la fixation d'un facteur de croissance ou d'une cytokine sur un récepteur transmembranaire. Portant une activité tyrosine kinase leur permettant une activation par autophosphorylation, ces récepteurs à tyrosine kinase (RTK) vont permettre l'activation d'une cascade de phosphorylations touchant diverses protéines kinases cytoplasmiques, de façon classique par ordre d'activation : RAS-RAF-MEK-ERK. L'activation de ERK aboutit à sa translocation nucléaire et à l'activation de la transcription, et ainsi à la régulation de nombreux gènes impliqués notamment dans la prolifération et la survie cellulaire (Figure 5).

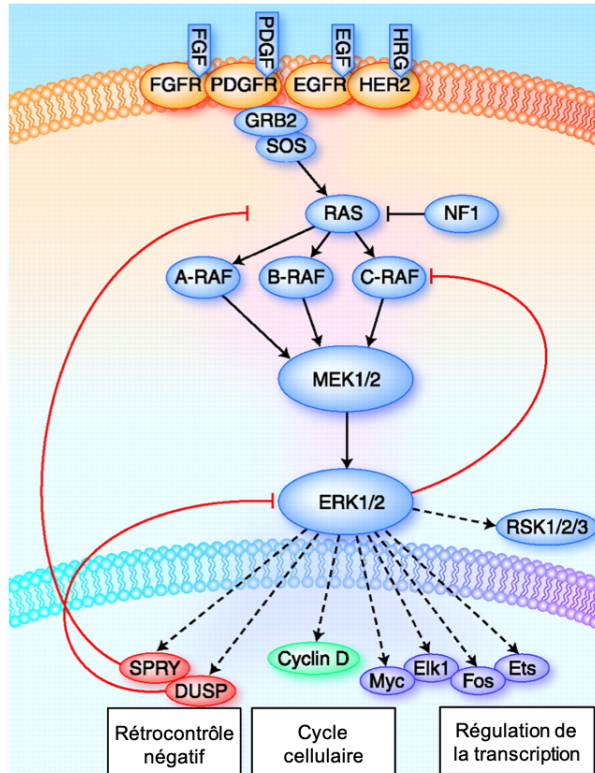


Figure 5 : Cascade de signalisation de la voie des MAPK. Adapté de Pratilas and Solit, 2010

## b. Nævus bénin

Les nævi bénins sont issus d'une prolifération clonale et bénigne de mélanocytes. Ces lésions peuvent rester stables pendant de nombreuses années, et une évolution en mélanome est très peu probable. Il existe plusieurs types de nævi bénins : congénitaux, acquis, nævi bleus et nævi de Spitz (Roh et al., 2015). Seuls les plus communs, les nævi acquis, seront discutés ici. Non présents à la naissance, les nævi acquis apparaissent majoritairement pendant l'enfance et, s'ils ne progressent pas, ont tendance à régresser après soixante ans (Zalaudek et al., 2011). Ils se développent sur des zones de la peau exposées aux UV.

Des mutations de la voie des MAPK sont retrouvées dans les nævi. Certains présentent en effet une mutation perte de fonction de *NF1* (15%), inhibiteur de la voie des MAPK. 15% des nævi portent une mutation *NRAS*. Une majorité des nævi acquis (90%) sont porteurs d'une mutation du gène *BRAF* (Pollock et al., 2003; Shain et al., 2015) entraînant la substitution d'une valine par un acide glutamique en position 600 de la protéine ( $BRAF^{V600E}$ ). Cette mutation sera retrouvée chez près de 50% des patients atteints de mélanome cutané métastatique (Akbari et al., 2015; Davies et al., 2002). La présence de ces mutations dès le stade de nævus en fait des mutations drivers, initiatrices de la nævogenèse. Bien que permettant initialement l'expansion clonale d'un mélanocyte et la formation d'un nævus, la mutation  $BRAF^{V600E}$  entraîne

systématiquement un arrêt de la prolifération et un phénotype proche de la sénescence « senescence-like », accompagnés de l'activation de la protéine suppresseur de tumeur p16<sup>INK4</sup>, résultat de l'expression du gène *CDKN2A* (Michaloglou et al., 2005). La sénescence des lésions bénignes est maintenue par un équilibre entre les acteurs du cycle cellulaire, le contrôle de la longueur des télomères et du système immunitaire (Bastian, 2014). Une altération progressive de l'ensemble de ces voies de signalisation permettra aux mélanocytes des nævi bénins de contourner la sénescence induite et de progresser dans leur transformation tumorale.

Ainsi, les mutations initiatrices du mélanome sont nécessaires mais non suffisantes au développement du mélanome, et l'acquisition de mutations secondaires permettra la progression tumorale.

### c. Nævus dysplasique

L'état de nævus dysplasique est une phase intermédiaire du développement du mélanome. Il est généralement plus étendu que le nævus bénin (diamètre supérieur à 5mm) et présente un désordre architectural tel des bords asymétriques et une pigmentation irrégulière. Comme détaillé précédemment, les mutations driver présentes dans un nævus bénin ne sont pas suffisantes pour la progression tumorale. La charge mutationnelle d'un nævus dysplasique est donc plus importante que celle d'un nævus bénin (Shain et al., 2015), de par l'apparition de mutations secondaires somatiques, engageant les mélanocytes un peu plus dans leur transformation. Ces mutations, souvent caractéristiques d'une signature UV, permettent de contourner le mécanisme de sénescence instauré par les mutations driver. Des mutations sont fréquemment retrouvées au niveau du promoteur du gène *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase), enzyme essentielle au contrôle de l'intégrité chromosomique par le maintien des télomères. Une délétion mono-allélique du gène *CDKN2A* apparaît également dans une proportion de nævi dysplasiques. Codant pour deux protéines suppresseurs de tumeur (p16<sup>INK4</sup> et p14<sup>ARF</sup>), la perte progressive de *CDKN2A* va permettre aux cellules de contourner la sénescence et de progresser dans le cycle cellulaire.

### d. Mélanome *in situ*

L'apparition d'altérations génétiques additionnelles permet alors au nævus de se transformer en mélanome. Les cellules ont accumulé des dommages suffisants pour contourner la sénescence, et la prolifération reprend. A ce stade, la prolifération reste restreinte au sein de



l'épiderme, permettant une résection totale du mélanome et une survie des patients avoisinant les 100%.

D'un point de vue histologique, deux profils de croissance sont retrouvés. Pour une majorité des mélanomes *in situ*, les caractéristiques histologiques observées pendant la croissance permettent de distinguer les mélanomes dérivant d'un nævus de ceux sans lésion précurseur. Les mélanomes dérivant de nævi, mutés BRAF<sup>V600E</sup> et liés à une exposition intermédiaire aux UV, ont à ce stade des mutations additionnelles de la voie des MAPK mais aussi des gènes *TERT* ou *CDKN2A* (Poynter et al., 2006). Les mélanocytes superficiels ont une signature UV de plus en plus conséquente, faisant des UV le principal facteur de progression de la maladie à ce stade. Les mélanomes sans lésion précurseur, non mutés BRAF<sup>V600E</sup> et pour lesquels on retrouve des signes de dommages chroniques aux UV (élastose solaire), apparaissent *de novo* au sein du tissu. Le mélanocyte d'origine, menant à la pathologie, ne peut être identifié. Ces mélanomes ont une signature UV extrêmement conséquente et de nombreuses mutations somatiques driver ou passager.

Indépendamment de son origine, un mélanome *in situ* aura en premier lieu une phase de croissance radiale (Radial Growth Phase, RGP), permettant une prolifération au sein de l'épiderme, non suffisante pour coloniser le derme. Cette progression peut être longue, et permet l'accumulation de nouveaux dommages qui permettront d'évoluer vers une phase invasive. Le mélanome entre alors dans une phase de croissance verticale (Vertical Growth Phase, VGP), correspondant à l'apparition d'une masse tumorale se développant en surface mais aussi en profondeur au sein de l'épiderme. L'instabilité chromosomique des cellules augmente, et avec elle le risque d'évolution.

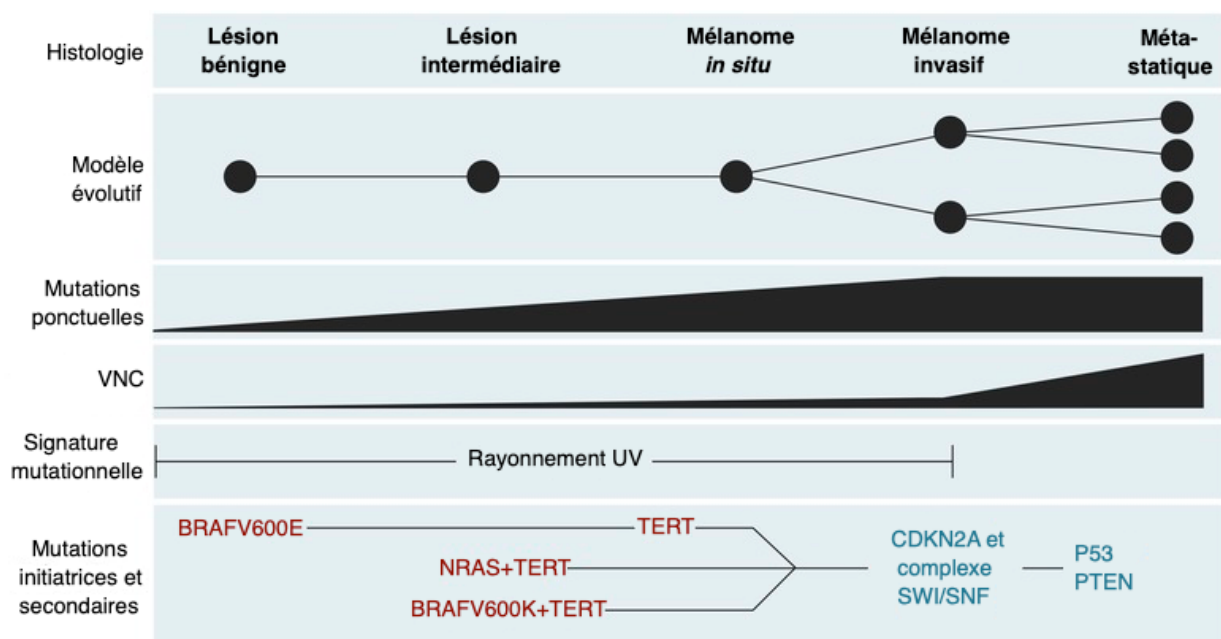
#### e. Mélanome invasif

Une fois que les cellules de mélanomes ont envahi le derme, le mélanome est invasif. La profondeur de la lésion au sein du derme détermine le risque de métastase (Balch et al., 2009). Le mélanome invasif hérite des mutations accumulées pendant la progression, notamment des mutations drivers de la voie des MAPK. La présence de ces mutations permet de classifier les mélanomes invasifs en quatre sous-types : mutés *BRAF* (52%, majoritairement V600E mais aussi V600K), *NRAS* (28%), *NF1* (14%) ou triple-négatifs (TN, 10%). Une signature UV (transition C>T) est retrouvée dans près de 90% des mélanomes mutés soit pour *BRAF*, *NRAS* ou *NF1* (Krauthammer et al., 2012). À l'inverse, les mélanomes TN ont une

charge mutationnelle largement inférieure mais plus de variations du nombre de copies d'un gène (Akbari et al., 2015).

60% des mélanomes invasifs présentent une perte de *CDKN2A* (mutation ou délétion), favorisant l'invasion (Akbari et al., 2015; Zeng et al., 2018). Le promoteur de *TERT* est également muté dans 80% des mélanomes mutés mais dans seulement 10% des TN. De nouvelles mutations sont également observées lors du passage au stade invasif, en particulier au niveau du complexe suppresseur de tumeurs SWI/SNF (*ARID2*, *ARID1A*) impliqué dans le remaniement de la chromatine et donc dans la stabilité génomique.

Une fois que les cellules de mélanomes ont profondément envahi le derme, elles sont hors d'atteinte de l'effet mutagène des rayonnements UV. C'est pourquoi à ce stade la charge mutationnelle n'augmente plus, mais les variations du nombre de copies d'un gène augmentent (Bauer and Bastian, 2006). Certaines mutations tardives apparaissent cependant à ce stade, par exemple des mutations des gènes suppresseurs de tumeur *TP53* (20%) et des pertes de fonction de *PTEN* (Akbari et al., 2015), bien que plus fréquemment retrouvées au stade de mélanome métastatique (Bucheit et al., 2014; Shain et al., 2018). Les caractéristiques mutationnelles du mélanome, en fonction du stade d'évolution, sont résumées Figure 6.



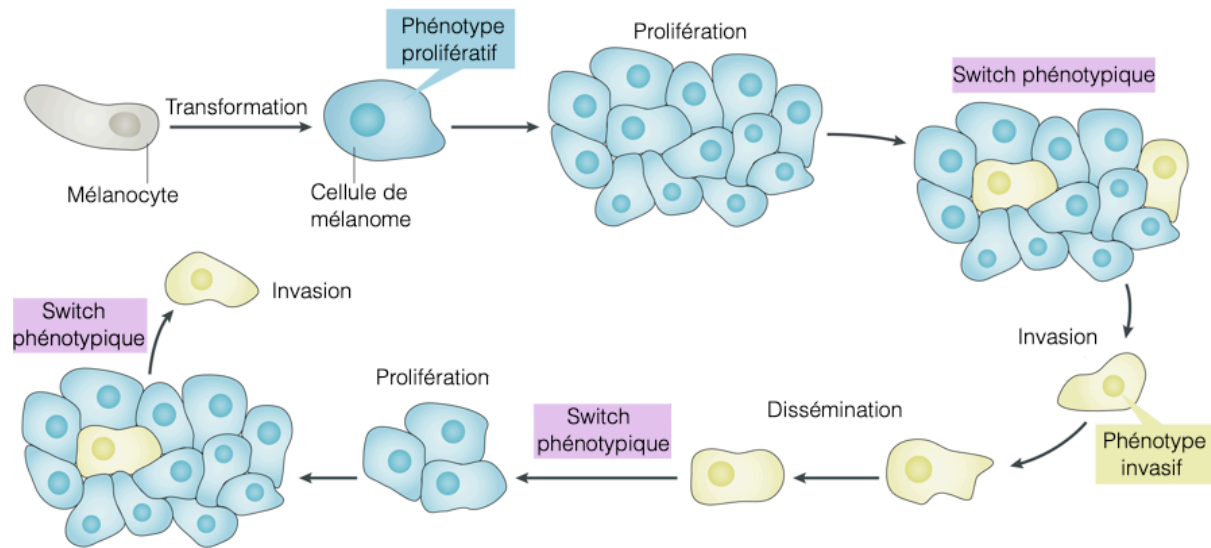
Cette voie de progression du mélanome, du nævus bénin au mélanome métastatique, n'est cependant pas retrouvée pour la majorité des patients. En effet, seuls 25% des mélanomes peuvent être associés au développement progressif d'un nævus bénin (Shain and Bastian, 2016).

C'est le cas d'une grande majorité des mélanomes SSM (BRAF<sup>V600E</sup>). A l'inverse pour une grande partie des mélanomes, comme les mélanomes ALM, il est impossible d'associer la lésion tumorale à une lésion précurseur. Certains mélanomes, comme les mélanomes nodulaires, apparaissent au stade invasif sans aucun signe de lésion antérieure. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette absence de lésion précurseur : une accumulation rapide d'un nombre de dommages suffisant à la progression tumorale, ou alors l'émergence d'un mélanocyte déjà porteur de mutations secondaires ou tertiaires qui acquiert ensuite la mutation primaire nécessaire à la prolifération et au développement d'un mélanome (Shain and Bastian, 2016).

#### f. Mélanome métastatique

Une fois les cellules disséminées au-delà du site primaire, le mélanome devient métastatique. Comme pour une majorité des tumeurs solides, il est supposé que les métastases du mélanome cutané apparaissent en premier lieu au niveau d'un ganglion lymphatique (ganglion lymphatique sentinelle) avant d'atteindre des sites plus distants. Afin de quitter le site primaire, les cellules de mélanomes, alors prolifératives, doivent acquérir des caractéristiques migratoires et invasives. Bien que n'étant pas épithéliales, les cellules de mélanomes changent leur phénotype par un processus similaire à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT-like) (Li et al., 2015; Pearlman et al., 2017). L'EMT, observée lors de la progression des cancers épithéliaux, altère l'intégrité des jonctions cellulaires et résulte en une perte des contacts cellulaires, ce qui rend les cellules mésenchymateuses : leurs capacités migratoires et invasives sont accrues et elles peuvent interagir avec la matrice extracellulaire (MEC). Ainsi, les cellules perdent l'expression des marqueurs de l'intégrité épithéliale (E-cadhérine, Claudines) et acquièrent l'expression de marqueurs mésenchymateux (Vimentine, N-cadhérine). En se transformant par un mécanisme similaire, appelé switch phénotypique « EMT-like », les cellules de mélanome (non épithéliales) peuvent coloniser les vaisseaux sanguins et ainsi atteindre des sites distants où, après un mécanisme inverse proche de la transition mésenchymo-épithéliale, elles pourront reprendre leur prolifération et ainsi former des métastases (Figure 7). Deux signatures génétiques ont été établies, reflétant l'état phénotypique des tumeurs : une signature proliférative et une signature invasive, terminologie aujourd'hui largement utilisée. Le passage d'un phénotype prolifératif à un phénotype invasif ne résulte pas de l'apparition d'altérations génétiques, mais est le résultat de l'expression différentielle d'un pool de facteurs

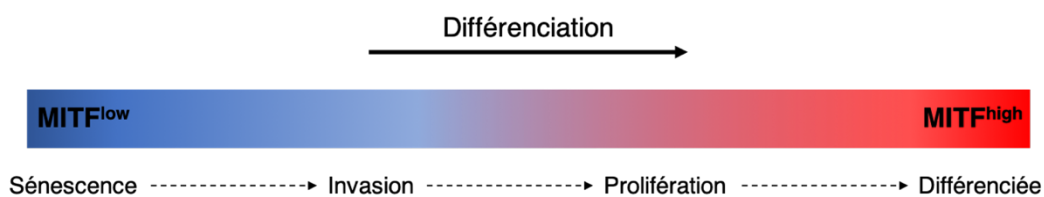
de transcription impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'invasion, induisant une reprogrammation transcriptionnelle.



**Figure 7 : Modèle d'expression des signatures génétiques associées à la progression du mélanome.**  
Adapté de Arozarena & Wellbrock 2019

Différentes voies majeures de la signalisation cellulaire peuvent influencer l'EMT, comme la voie des MAPK, la voie PI3K/AKT/mTOR, la voie Wnt ou la signalisation TGF- $\beta$  (Pearlman et al., 2017). Ces voies de signalisation participent à la régulation de facteurs de transcription clés, permettant la régulation de l'EMT. Parmi ces facteurs de transcription jouant un rôle important dans la régulation de l'EMT, on retrouve les protéines à doigts de zinc Snail et Slug, mais aussi les facteurs de la famille Zinc finger E-box-binding homeobox (ZEB) : ZEB1 et ZEB2 (Pearlman et al., 2017). Dans le mélanome, si ZEB1 est associé à un mauvais pronostic et inhibe l'expression de la E-cadhérine, ZEB2 semble lui anti-tumoral et associé à la différenciation mélanocytaire et à l'expression de *MITF* (Caramel et al., 2013).

Dans le cas du mélanome, un acteur joue un rôle particulièrement important : le facteur de transcription *MITF*. S'il est indispensable à l'établissement de la lignée mélanocytaire et à la pigmentation, *MITF* agit également comme un rhéostat du phénotype cellulaire en fonction de son niveau d'expression. Ainsi, une expression importante de *MITF* induit une différenciation cellulaire et un phénotype prolifératif. A l'inverse, une faible expression du facteur de transcription est associée à une dédifférenciation et à l'augmentation des capacités invasives des cellules (Figure 8). Lorsque les cellules atteignent un niveau très faible d'expression de *MITF*, elles montrent alors un phénotype proche de la sénescence. Des anomalies de *MITF* sont retrouvées dans le mélanome : une amplification du gène est retrouvée pour 10 à 20% des patients (Akbari et al., 2015).



*Figure 8 : Modèle de rhéostat de MITF*

MITF, ainsi que ses gènes cibles impliqués dans la pigmentation, sont retrouvés dans la signature proliférative ; à l'inverse, on retrouve dans la signature invasive l'expression de la kinase AXL, des facteurs de transcription de la famille TEAD et de WTN5A (Bittner et al., 2000; Hoek et al., 2008; Verfaillie et al., 2015). L'analyse de l'expression des ARN au niveau de la cellule unique (single cell RNAseq) à partir de tumeurs de mélanome a permis de confirmer cette hétérogénéité intra-tumorale : des populations cellulaires prolifératives MITF<sup>high</sup> et, bien que significativement rares, invasives AXL<sup>high</sup> sont retrouvées dans les 19 tumeurs analysées (Tirosh et al., 2016). Les populations MITF<sup>high</sup>/AXL<sup>low</sup> et AXL<sup>high</sup>/MITF<sup>low</sup> sont couramment utilisées pour caractériser le phénotype tumoral.

Ainsi, la transformation d'un mélanocyte sain en cellule tumorale de mélanome est un processus long et progressif. Les mécanismes moléculaires par lesquels le mélanome se forme puis se développe sont complexes et résultent non seulement de l'accumulation d'anomalies génétiques mais aussi de la régulation de nombreuses voies de signalisations cellulaires. La plasticité phénotypique des cellules de mélanome, induite par le changement d'activité transcriptionnelle de facteurs de transcription et permettant le passage d'un phénotype prolifératif à invasif, permet l'acquisition des propriétés nécessaires à l'invasion et la progression du mélanome. Étant donné le faible pronostic des patients au stade métastatique et l'incidence croissante du mélanome, les efforts thérapeutiques se sont renforcés ces dernières années.

## II. Prise en charge et traitement du mélanome métastatique

Le mélanome métastatique est la forme la plus sévère des cancers de la peau avec une incidence croissante et un taux de mortalité important. La prévention de son apparition et son dépistage sont donc essentiels afin d'empêcher le développement de ce type de cancer. Depuis 1996, des campagnes de prévention solaires sont menées chaque année par les pouvoirs publics. Aujourd'hui, si les principaux conseils de prévention sont connus (éviter l'exposition entre 12h et 16h, protéger systématiquement la peau des enfants, se couvrir et appliquer de la crème toutes les deux heures...), ils ne sont pas toujours appliqués. L'institut national du cancer déploie chaque année une campagne d'information afin de sensibiliser en priorité les parents de jeunes enfants aux conséquences de l'exposition aux UV. Ces conseils de prévention sont également nécessaires pour les personnes exposées au soleil dans le cadre de leur profession (agriculteurs, personnels des BTP, marins...). Il est également indispensable, notamment pour les personnes à risque, d'adopter des mesures de détection précoce du mélanome. Ces mesures consistent dans un premier temps en un auto-examen régulier (tous les 3 mois) de la peau qui permet le repérage de toute lésion suspecte. L'observation d'un grain de beauté différent des autres ou d'un changement significatif (apparition d'une tache brune ou d'un grain de beauté qui change d'aspect rapidement) n'est pas systématiquement synonyme de mélanome, mais justifie de demander un avis médical. Les critères ABCDE décrit précédemment permettent d'évaluer facilement un changement morphologique d'un nævus pouvant laisser suspecter un éventuel problème. Pour les personnes qui présentent un ou plusieurs facteurs de risque de mélanome, il est recommandé de se faire examiner au moins une fois par an par un dermatologue.

Lorsque le mélanome est détecté à un stade précoce et localisé, le traitement se fait par exérèse chirurgicale de la lésion. Elle permet en général de retirer la totalité du mélanome, et est donc associée à un taux de survie globale (Overall Survival, OS) à 5 ans extrêmement élevé (environ 98%). En fonction de la taille et de la profondeur de la lésion il peut être décidé de retirer de manière préventive un excès de tissu sain autour de la lésion, ou même le ganglion sentinelle, afin d'éviter la propagation d'éventuelles cellules tumorales métastatiques. Dès lors que la lésion est disséminée et métastatique, une opération chirurgicale ne peut suffire et un traitement systémique doit être administré. La survie chute alors dramatiquement, avec une OS à 5 ans de 23% (pour un diagnostic entre 2008 et 2014). Les traitements du mélanome métastatique se sont donc développés afin d'améliorer la survie des patients.

## 1. La dacarbazine, première chimiothérapie du mélanome

Avant les récents progrès sur la compréhension des mécanismes moléculaires responsable de la progression de la pathologie, la première ligne de traitement du mélanome métastatique était la chimiothérapie. Des années 1970 aux années 2000, peu de molécules cytotoxiques ont été approuvées dans le traitement du mélanome par manque d'efficacité. Cependant, les nombreux essais ont conduit à la mise sur le marché de la dacarbazine (Figure 9) en 1975. Bien que n'améliorant que peu la survie des patients, la dacarbazine (DTIC) a été pendant de nombreuses années la seule chimiothérapie efficace dans le traitement du mélanome (Eggermont and Kirkwood, 2004).

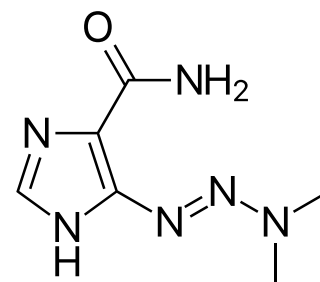


Figure 9 : Structure de la dacarbazine (DTIC)

La DTIC est un agent alkylant dont les effets antinéoplasiques sont dus à une inhibition de la croissance cellulaire liée à une inhibition de la synthèse d'ADN, indépendamment du cycle cellulaire. Elle n'a aucun effet à elle seule mais est rapidement métabolisée en 5-aminoimidazole-4-carboxamide ainsi qu'un cation méthyle qui auront des effets alkylants. Capables de se fixer à des substrats nucléophiles, ces agents alkylants vont se fixer à l'ADN, bloquant la réplication et la transcription.

Les premiers essais cliniques utilisant la DTIC dans les années 1970 lui démontre un taux de réponses partielles (Partial Response, PS) avoisinant les 20%, et un taux de réponses complètes (Complete Response, CR) inférieur à 10% (Eggermont and Kirkwood, 2004). Cependant, les études suivantes vont revoir à la baisse les bénéfices du traitement notamment du fait d'une augmentation des critères d'exigences pour caractériser le bénéfice thérapeutique. Ainsi, la DTIC a un taux de PS compris entre 7% et 12% et une survie médiane globale (OS médiane) de 5,6 à 7,6 mois après initiation du traitement (Avril et al., 2004; Middleton et al., 2000). Certains essais combinant plusieurs molécules de chimiothérapie, comme le régime « Darthmouth » (dacarbazine + cisplatine + carmustine + tamoxifène), s'avèrent aussi peu efficace que la dacarbazine seule et n'améliorent pas la survie moyenne des patients (Chapman et al., 1999). Au-delà du faible taux de réponse et de leur brièveté, l'inconvénient de ces molécules sont leurs effets secondaires lourds. En effet, la chimiothérapie cible les cellules se divisant rapidement, caractéristique des cellules tumorales mais également de certains types de cellules saines, comme les cellules épithéliales, les kératinocytes et les globules blancs. Ainsi, les patients développent régulièrement des problèmes sanguins (anémie, leucopénie,

thrombocytopénie), une insuffisance médullaire, une alopecie et des vomissements, qui peuvent être d'intensité variable et peuvent conduire à l'interruption du traitement.

Malgré ce faible constat, la dacarbazine a été utilisée en première ligne de traitement du mélanome métastatique pendant de nombreuses années. Le besoin en nouvelles thérapies est donc très présent, mais il faudra attendre le développement des méthodes d'analyse génétique et la compréhension des mécanismes moléculaires pour faire renaître l'espoir et développer la première thérapie ciblée du mélanome.

## 2. La mutation BRAF<sup>V600E</sup> et conséquences fonctionnelles

C'est en 2002 que le groupe du « Cancer Genome Project » identifie une mutation récurrente, portée par plus de 50% des patients de mélanome : la mutation activatrice de la kinase BRAF (BRAF<sup>V600</sup>), entraînant chez les patients mutés une activité kinase anormale (Davies et al., 2002). Parmi ces patients, 90% portent la même mutation : la mutation 1799 T>A, entraînant la substitution d'une valine par un acide glutamique en position 600 de la protéine, BRAF<sup>V600E</sup> (initialement identifiée en position 599). La seconde mutation la plus fréquente entraîne l'expression de la protéine BRAF<sup>V600K</sup>, observée chez 5% des patients. Les mutations de *BRAF* sont aussi retrouvées dans 60% des cancers de la thyroïde, 10% des cancers colorectaux et 6% des cancers du poumon (Holderfield et al., 2014). Depuis 2002 et l'identification des premières mutation de *BRAF*, plus de 300 mutations non-sens de la kinase ont été identifiées (Holderfield et al., 2014). Comme décrit précédemment, les mutations de BRAF sont retrouvées dès le stade de nævus bénin (80%), et sont donc des événements précoces du développement tumoral.

La protéine BRAF est une sérine/thréonine kinase de la famille RAF qui contient trois isoformes (ARAF, BRAF et CRAF) codées par le gène *RAF* et faisant partie de la voie de signalisation des MAPK décrite précédemment. En 1983, Rapp et al. identifient le gène *v-Raf* (Virus-induced Rapidly Accelerated Fibrosarcoma), un oncogène rétroviral murin, ainsi que son homologue humain, *CRAF (RAF1)* (Rapp et al., 1983). Les gènes *ARAF* et *BRAF* sont ensuite identifiés chez la souris et l'homme (Bonner et al., 1984).

Ces trois isoformes sont constituées de trois domaines conservés (Figure 10) :

- CR1, contenant les domaines de liaison à RAS (RBD) et à la membrane (CRD)



- CR2, riche en sérines et thréonine, domaine régulateur de l'activité kinase
- CR3, domaine portant l'activité kinase

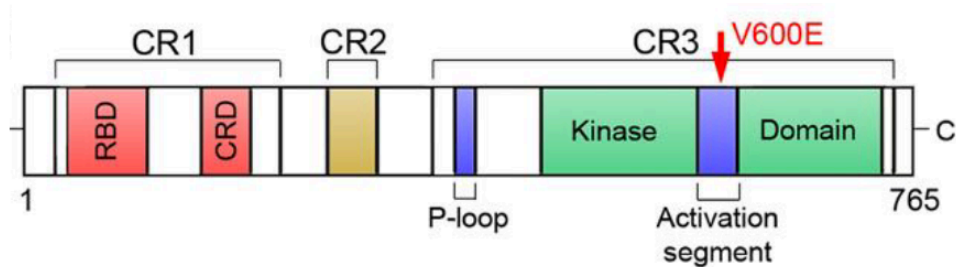


Figure 10 : Structure de la protéine BRAF. Adapté de Huang et al. 2013

Située dans le domaine portant l'activité kinase (site catalytique), la mutation activatrice BRAF<sup>V600E</sup> augmente de façon significative la fonction sérine/thréonine kinase de BRAF et entraîne une activation constitutive de la voie des MAPK, même en absence des facteurs de croissance normalement nécessaires. En effet, la protéine BRAF inactive est dans une conformation telle que le site catalytique est inaccessible à son substrat, grâce à la formation d'une poche par liaisons hydrophobes au sein de laquelle se trouve la valine 600. La mutation BRAF<sup>V600E</sup> entraîne une stabilisation de BRAF dans sa forme active par la rupture de ces liaisons hydrophobes, ouvrant la poche de façon stable et rendant accessible le domaine catalytique. (Karoulia et al., 2016, 2017).

### 3. Les thérapies ciblées du mélanome métastatique

L'identification de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> a conduit au développement d'inhibiteurs de BRAF (BRAFi) ciblant le site de liaison de l'ATP au sein du domaine kinase. Leur mécanisme d'action est donc d'empêcher la liaison de l'ATP et ainsi l'activation de la signalisation oncogénique. Il en existe deux types différents : les inhibiteurs de type I, qui inhibent la conformation active de BRAF, et les inhibiteurs de type II, qui eux ciblent la forme inactive de BRAF (Zhang et al., 2009).

#### a. Première génération : les inhibiteurs non spécifiques de type II

La première génération de BRAFi à avoir été développée contient en grande majorité des inhibiteurs de type II. Ces molécules, qui ont été développées avant l'identification des

mutations BRAF, ciblent la forme inactive de la kinase et ne sont donc pas spécifiques de la protéine mutée. Les inhibiteurs de type II se sont donc révélés peu efficaces lors des essais cliniques. En effet ces inhibiteurs ciblent aussi bien la kinase sauvage que mutée, entraînant une forte toxicité et une dose maximale tolérée faible.

Le sorafenib (BAY 43-9006) est le premier inhibiteur de RAF à entrer en essai clinique en 2001. Cette molécule a été identifiée lors d'un crible moléculaire ciblant l'activité de CRAF, dans le but de traiter les cancers mutés pour RAS (Lyons et al., 2001). Cependant, étant donné les homologies de structure du domaine de liaison à l'ATP entre différentes protéines, le sorafenib cible aussi bien ARAF et BRAF que CRAF, sauvages ou mutés, et peut même inhiber d'autres kinases comme FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3), PDGFR $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor- $\beta$ ) et VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) (Holderfield et al., 2014). Un essai clinique randomisé de phase I/II mené sur 22 patients de mélanome démontre la faible efficacité du sorafenib seul malgré la bonne tolérance des patients au traitement : un seul patient sur les 15 ayant reçu le sorafenib montre une réponse partielle, douze patients ont une stabilisation de la maladie, avec une survie sans progression (PFS) médiane de 4 mois (Flaherty et al., 2005). Suivant ces résultats, plusieurs essais cliniques randomisés de phase III utilisant le sorafenib en combinaison avec la carboplatine et le paclitaxel sont lancés (Flaherty et al., 2013; Hauschild et al., 2009). Aucun de ces deux essais ne montrera d'augmentation de la PFS chez les patients avec le sorafenib en combinaison avec la chimiothérapie. Le sorafenib ne sera donc pas approuvé pour le traitement du mélanome mais obtiendra l'autorisation de la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement du carcinome rénal et du carcinome de la thyroïde.

D'autres inhibiteurs non sélectifs de types II comme RAF265 ou AZ628 n'ont également pas montré de bénéfice et leur développement c'est donc arrêté respectivement en essai clinique de phase I ou en phase préclinique.

## b. Les inhibiteurs de BRAF de deuxième génération

Malgré l'absence d'efficacité des BRAFi de première génération, l'opportunité thérapeutique qu'a représenté l'identification de la mutation BRAF<sup>V600-</sup> a conduit au développement d'une deuxième génération : les inhibiteurs de type I, spécifiques de la kinase mutée.

Le premier BRAFi de type I à entrer en essai clinique est le Vemurafenib (PLX4032) (Figure 12), identifié par une approche de crible basé sur la structure des molécules (Bollag et al., 2010). Compétiteur de l'ATP, le Vemurafenib (Vem) se fixe au niveau de la poche de l'ATP spécifiquement sur la protéine mutée, ce qui inhibe son activité et donc la signalisation de la voie des MAPK. L'essai clinique de phase I est mené par Flaherty et al., d'abord chez 49 patients atteints de mélanome sans distinction pour l'état de BRAF pour déterminer les conditions et la dose de traitement optimale. Puis 32 nouveaux patients tous mutés BRAF<sup>V600E</sup> rejoignent l'essai clinique et reçoivent la dose déterminée de Vem, parmi lesquels 24 auront une réponse partielle et 2 une réponse complète (Flaherty et al., 2010). L'essai clinique randomisé de phase III comparant le Vem à la DTIC chez 675 patients portant la mutation BRAF<sup>V600E</sup> est publié en 2011 (BRIM-3, NCT01006980)(Chapman et al., 2011a). Le taux de réponse (PR ou CR) est de 48% avec une PFS médiane de 5,3 mois dans la cohorte traitée par le Vem, contre 5% (PR+CR) et une PFS de 1,6 mois pour les patients traités à la DTIC. Au vu de la nette amélioration de la PFS par rapport à la dacarbazine, le Vem obtient l'autorisation de la FDA en 2011 pour le traitement des mélanomes mutés BRAF<sup>V600E</sup> et est commercialisé sous le nom Zelboraf®. La dernière mise à jour de l'essai clinique en 2017 montre une OS médiane significativement plus longue avec le Vem (13,6 vs 9,7 mois) (Chapman et al., 2011b). Cependant l'écart entre le Vem et la DTIC est minimisé dû au fait que les patients initialement traités à la DTIC peuvent recevoir du Vem après observation des réponses initiales.

En 2013, un deuxième BRAFi obtient l'autorisation de la FDA pour le traitement des mélanomes mutés BRAF<sup>V600E/V600K</sup> : le Dabrafenib (Dab, GSK2118436) (Figure 12), compétiteur de l'ATP hautement spécifique de la kinase mutée, commercialisé sous le nom Tafinlar®. En effet, la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de BRAF<sup>V600E</sup> (IC<sub>50</sub>) est cinq fois inférieure à l'IC<sub>50</sub> pour BRAF sauvage ou CRAF. Contrairement au Vem, le Dab a également une activité similaire pour l'inhibition de BRAF<sup>V600E</sup> et BRAF<sup>V600K</sup> (Kefford et al., 2010). L'essai clinique randomisé de phase III mené par Hauschild et al. sur 733 patients de mélanome mutés BRAF<sup>V600E</sup> et comparant le Dab à la DTIC démontre une PFS médiane de 5,1 mois et un taux de réponse de 50% pour le Dab contre 2,7 mois et 6% de réponses pour la DTIC selon les critères définis par l'essai clinique (Hauschild et al., 2012) (BREAK-3, NCT01227889). Comme pour le Vem, les patients du groupe contrôle peuvent recevoir le Dab après observation des réponses initiales, ce qui empêche la comparaison des survies globales à long terme.

Malgré leur efficacité importante, permettant pour la première fois l'amélioration significative la survie des patients *via* une inhibition quasi complète de la signalisation aberrante de la voie des MAPK, l'utilisation des BRAFi est associée à de nombreux effets secondaires, notamment au niveau de la peau (Gençler and Gönül, 2016) (Tableau 1). Certains patients peuvent ainsi développer des cancers secondaires dû à leur traitement initial par les BRAFi. Ceux-ci peuvent être liés à un des défauts majeurs des inhibiteurs de BRAF de deuxième génération : l'activation paradoxale de la voie des MAPK (Figure 11). En effet les BRAFi, bien que plus spécifiques de la forme mutée de BRAF que de la forme sauvage, peuvent activer la voie des MAPK de façon RAS-dépendante dans les lésions précancéreuses BRAF sauvage, promouvant la croissance tumorale (Boussemart et al., 2016). Les BRAFi activent la forme sauvage de RAF en induisant sa dimérisation avec BRAF sauvage ou avec CRAF et ainsi sa localisation membranaire, où le dimère de RAF peut interagir avec RAS et activer la voie de signalisation (Poulikakos et al., 2010; Zhang et al., 2015) (Figure 11). Cela résulte chez le patient au développement de carcinomes cutanés squameux et kératoacanthomes (Su et al., 2012). Ces tumeurs cutanées développées par les patients sous BRAFi montrent une forte incidence de mutations de *RAS*, suggérant que ces molécules développées pour inhiber la signalisation oncogénique BRAF<sup>V600E</sup> peuvent induire des cancers secondaires via l'activation paradoxale de RAF, favorisés par une mutation de *RAS* en amont. L'absence d'activation de RAS dans les tumeurs mutées BRAF permet de minimiser cet effet de transactivation.

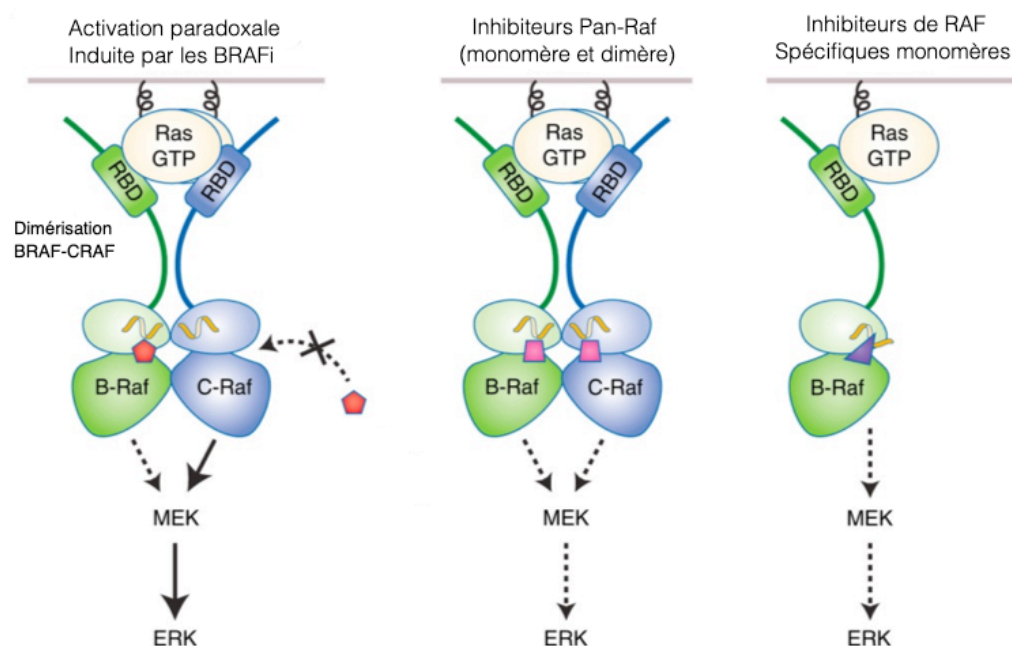


Figure 11 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de BRAF et activation paradoxale de la voie des MAPK. Adapté de Durrant & Morrison 2018

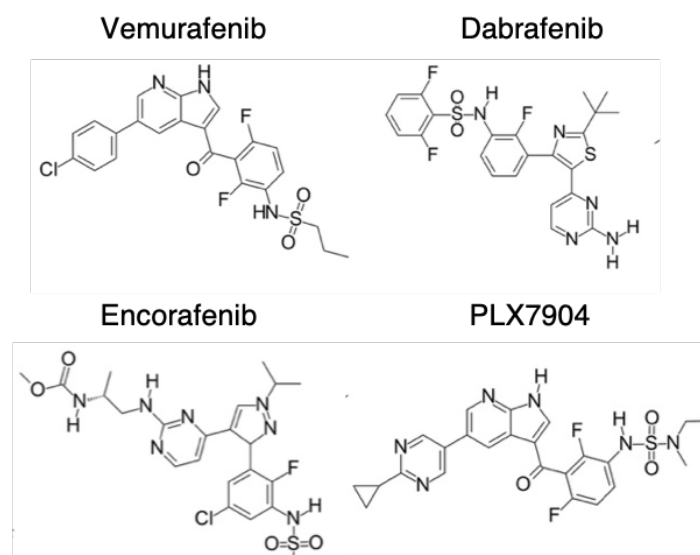
*Tableau 1 : Effets secondaires des inhibiteurs de BRAF en monothérapie*

<b>Effet secondaire</b>	<b>Vemurafenib</b>	<b>Dabrafenib</b>
<b>Éruption cutanée</b>	30-50%	15%
<b>Photosensibilité</b>	15-40%	5%
<b>Arthralgie</b>	35-65%	15%
<b>Nausée</b>	25-40%	10%
<b>Pyrexie</b>	15-20%	15%
<b>Syndrome « main-pieds »</b>	15-20%	20%
<b>Cancers secondaires</b>	10-18%	7%

L'apparition des effets secondaires non désirables des BRAFi, et spécifiquement le développement de cancers secondaires, peut conduire à l'interruption du traitement, à une diminution de la dose administrée et dans les cas les plus grave à l'arrêt du traitement, ce qui limite le bénéfice thérapeutique. Cependant, si l'apparition de cancer secondaires est un inconvénient et peut conduire à l'interruption du traitement, le réel problème est le développement de mécanismes de résistance. En effet les patients répondeurs ne le sont que pour une courte durée et les mécanismes de résistance acquise limitent la survie sans progression et conduisent à la rechute du patient. Ces mécanismes seront détaillés par la suite.

### c. Les inhibiteurs de BRAF de troisième génération

Afin de contrer l'activation paradoxale de la voie des MAPK engendrée par l'utilisation du Vem ou du Dab, une troisième génération de BRAFi a été développée : les « paradox breakers », qui suppriment l'activation délétère de la voie des MAPK liée à la mutation BRAF<sup>V600E</sup> tout en évitant l'activation paradoxale dans les cellules BRAF sauvage. Il existe deux molécules paradox breakers : le PLX7904 (Figure 12) et son homologue utilisable en clinique, le PLX8394 (Zhang et al., 2015). Ces molécules sont structurellement différentes des BRAFi de deuxième génération et sont ainsi plus spécifiques de la kinase mutée et non de la forme sauvage (Yao et al., 2019). Malgré l'absence de tests cliniques, il est imaginable que ce traitement pourrait être intéressant pour les patients devenus résistants aux BRAFi de deuxième génération et dont le mécanisme de résistance passe par une mutation de *RAS*.



**Figure 12 : Structure des différents inhibiteurs de BRAF**

#### d. Association des inhibiteurs de BRAF aux inhibiteurs de MEK

En parallèle du développement des BRAFi de troisième génération, une autre stratégie thérapeutique a été mise en place afin de diminuer l'activation paradoxale de la voie des MAPK : l'association des BRAFi avec des inhibiteurs de MEK (MEKi), kinase située en aval de BRAF. Le développement des inhibiteurs de MEK a commencé avant l'identification de la mutation BRAF et donc avant l'apparition des inhibiteurs de BRAF. L'association en combinaison d'un MEKi avec un BRAFi a montré une double efficacité : d'une part l'activation paradoxale de la voie des MAPK est amoindrie mais le développement des mécanismes de résistance sont eux aussi retardés. En effet certains mécanismes de résistance passent par une réactivation de la voie des MAPK, le double blocage des acteurs de cette voie permet donc de retarder leur apparition et ainsi d'allonger la phase de réponse au traitement. De plus, l'utilisation combinée d'un BRAFi et d'un MEKi permet de réduire la toxicité de chaque médicament quand il est administré seul. Il existe à ce jour trois combinaisons proposées par les industries pharmaceutiques et approuvées par la FDA pour le traitement du mélanome métastatique : Vemurafenib+Cobimetinib, Dabrafenib+Trametinib et Encorafenib+ Binimetinib.

La combinaison du Vem avec le Cobimetinib (Cobi), inhibiteur allostérique de MEK, s'est en effet révélée significativement plus efficace que le Vemurafenib en monothérapie. L'essai clinique randomisé de phase III mené sur 495 patients de mélanome métastatique muté BRAF<sup>V600-</sup> et comparant l'utilisation de la combinaison par rapport au Vem seul (coBRIM, NCT01689519) montre une PFS médiane de 9,9 mois et un taux de réponse global de 68% avec

la combinaison contre 6,2 mois et 45% avec le Vem seul (Larkin et al., 2014). Cette combinaison sera approuvée par la FDA en 2015.

Le Dab sera lui aussi approuvé par la FDA en 2017 pour le traitement du mélanome en combinaison avec un inhibiteur allostérique de MEK, le Trametinib (GSK1120212, Mekinist). Le Trametinib (Tram) est un inhibiteur puissant et réversible de MEK, qui contrairement au Cobi a montré une faible efficacité en monothérapie chez les patients portant la mutation BRAF<sup>V600E</sup> (Flaherty et al., 2012). L'essai clinique de phase III utilisant la combinaison Dab+Tram comparée au Vem seul chez les patients mutés BRAF<sup>V600E/K</sup> (COMBI-v, NCT01597908) montre quant à lui un bénéfice clinique important. En effet, le traitement Dab+Tram permet une OS à 1 an de 72% contre 65% avec le Vem seul. La PFS médiane passe quant à elle de 7,3 mois en monothérapie à 11,4 mois avec la combinaison Dab+Tram. L'apparition des cancers secondaires (carcinomes squameux cutanés et kératoacanthomes) est également significativement diminuée puisque 1% des patients en développent contre 18% pour les patients traités au Vem (Robert et al., 2015). Ainsi, l'association d'un MEKi avec un BRAFi permet non seulement de prolonger la fenêtre d'efficacité du traitement mais aussi de réduire la toxicité et l'apparition des effets secondaires indésirables cutanés.

Plus récemment l'Encorafenib (LGX818) (Figure 12), BRAFi de type I, a été développé avec comme caractéristique intéressante son importante demi-vie d'association pour BRAF<sup>V600-</sup>. L'Encorafenib a en effet une demi-vie d'association à BRAF de 30 heures, contre 30 minutes pour le Vem, ce qui résulte en une amélioration significative des propriétés pharmacocinétiques : la dose nécessaire pour inhiber la voie des MAPK est donc largement inférieure, tout comme la fréquence d'apparition d'effets secondaires indésirables. Il est directement testé en essai clinique en combinaison avec un inhibiteur de MEK, le Binimetinib, dont les résultats permettront leur mise sur le marché pour le traitement du mélanome muté BRAF<sup>V600-</sup> en 2018 (BRAFTOVI et MEKTOVI). En effet, l'essai clinique de phase III comparant la combinaison à l'Encorafenib seul ou au Vemurafenib sont en faveur de la combinaison : la PFS médiane atteint un seuil encore jamais vu, proche de 15 mois avec la combinaison, contre 9,6 pour l'Encorafenib seul (COLUMBUS, NCT01909453) (Dummer et al., 2018a).

Malgré les efforts thérapeutiques et les combinaisons de traitements, deux problèmes sont toujours présents et limitent les réponses thérapeutiques : la résistance primaire (l'incapacité d'un patient à répondre au traitement), et la résistance acquise aux thérapies ciblées (mécanismes qui seront détaillés en partie III). Ainsi, bien que l'apparition des thérapies

ciblées soit une avancée majeure et représente un espoir considérable pour la prise en charge et le traitement du mélanome, seul une fraction des patients y sont éligibles et y répondent. Les besoins thérapeutiques sont donc toujours présents, et la compréhension des interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement vont permettre le développement de nouveaux traitements : les immunothérapies.

#### 4. Les immunothérapies

Les premières immunothérapies, non spécifiques, utilisaient des molécules activatrices des cellules immunitaires, indépendamment des cellules tumorales. Par exemple, l'interleukine-2 (IL-2), molécule activatrice des lymphocytes T helper induisant la survie et la prolifération des lymphocytes T (LT), a été approuvée par la FDA pour le traitement du mélanome en 1998. L'interféron- $\alpha$ , première cytokine utilisée dans le traitement du mélanome, est quant à lui approuvé en 1995. Ces traitements, très lourds pour l'organisme, n'obtiennent que de faibles réponses.

Récemment, l'amélioration de la compréhension des mécanismes tumoraux et de l'implication du système immunitaire a permis le développement d'une nouvelle classe de traitements anti-cancéreux : les immunothérapies, qui ciblent les cellules immunitaires plutôt que la tumeur elle-même. En effet il est maintenant connu que le développement tumoral ne résulte pas uniquement de l'action des cellules cancéreuses mais de l'étroite collaboration entre ces cellules et leur microenvironnement. Ainsi, le système immunitaire permet l'élimination des cellules cancéreuses reconnues comme étrangères à l'organisme grâce à l'expression d'antigènes tumoraux à leur surface, limitant ainsi la croissance tumorale. Mais il est également établi qu'il participe à la transformation cellulaire et à la progression tumorale par un processus appelé « immunoediting » (Dunn et al., 2006; Shankaran et al., 2001), favorisant l'échappement à la surveillance immunitaire. L'immunothérapie vise donc à activer les réponses immunitaires effectrices et bloquer les cellules immunitaires suppressives pour empêcher l'échappement des cellules cancéreuses et ainsi limiter la progression tumorale.

Les premiers résultats prometteurs de l'immunothérapie sont obtenus avec l'identification des points de contrôle immunitaires (checkpoints) comme l'antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique (CTLA4) et le Programmed cell Death 1 (PD1) qui permettent de réguler les réponses immunitaires induites par les lymphocytes T (Melero et al., 2007). Cependant, les cellules cancéreuses peuvent détourner ce processus immuno-régulateur à leur



avantage en exprimant à leur surface les ligands de CTLA4 et de PD1, induisant un arrêt des réponses immunitaires cytotoxiques. Ainsi, des anticorps monoclonaux reconnaissant les checkpoints (inhibiteurs de checkpoints : anti-CTLA4 et anti-PD1) sur les cellules immunitaires ont été développés afin d'empêcher l'interaction entre cellules immunitaire et cellules cancéreuses et ainsi restaurer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

#### a. Anticorps anti-CTLA4

Le récepteur CTLA4, exprimé sur les lymphocytes T (LT) activés interagit avec son ligand, le récepteur B7 exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), et bloque ainsi la réponse immunitaire des LT. En effet l'activation des LT nécessite en premier lieu l'interaction d'une CPA via l'antigène présenté sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) avec le récepteur des cellules T (TCR), ce qui constitue le signal d'activation principal. Mais à la surface des LT est aussi exprimé le récepteur CD28, dont l'interaction avec le B7 des CPA constitue un signal de co-stimulation nécessaire pour l'activation complète du LT. Ainsi, ce checkpoint fonctionne par compétition pour la liaison du récepteur B7 (Figure 13).

L'anticorps anti-CTLA4 Ipilimumab est le premier inhibiteur de checkpoint à avoir été approuvé pour le traitement du mélanome. Deux essais cliniques de phase III, un comparant l'Ipilimumab à une vaccination peptidique (gp100) inefficace (NCT00094653) et l'autre comparant l'Ipilimumab à la dacarbazine (NCT00324155), permettent de démontrer l'amélioration de la survie des patients et l'anticorps anti-CTLA4 est approuvé par la FDA en 2011 pour le traitement du mélanome, indépendamment du statut de BRAF. L'essai clinique comparant l'Ipilimumab au gp100, mené sur 676 patients avec un mélanome de stade 3 ou 4, montre une amélioration significative de la survie avec une OS médiane passant de 6,4 mois pour le gp100 seul à 10,1 mois avec l'Ipilimumab (Hodi et al., 2010). L'essai de phase III comparant l'Ipilimumab à la DTIC montre quant à lui une OS médiane passant de 9,2 mois avec la DTIC seule contre 11,2 mois pour le groupe ayant reçu DTIC+Ipilimumab (Robert et al., 2011).

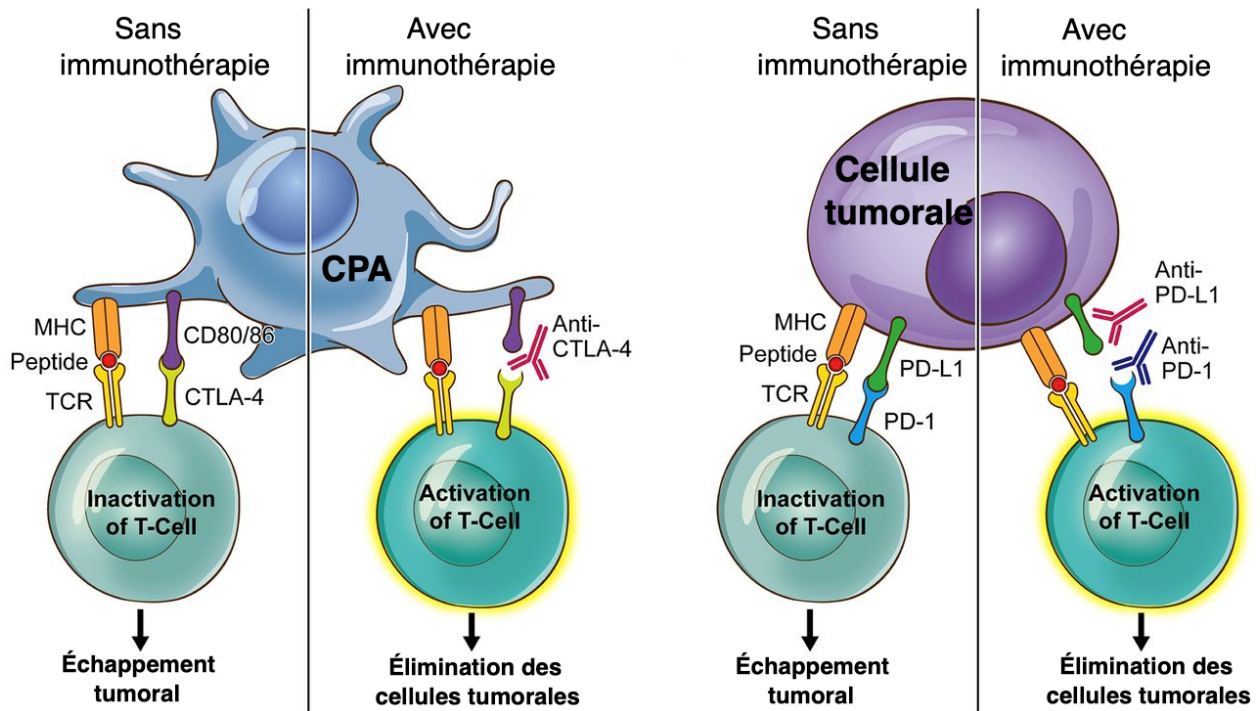


Figure 13 : Mécanisme d'action des immunothérapies anti-CTLA4 et anti-PD1

## b. Anticorps anti-PD1

Le récepteur PD1 est exprimé à la surface des LT activés CD8+, et dans un mécanisme similaire à CTLA4 il interagit avec son ligand PD-L1 exprimé par les cellules tumorales. Cette interaction induit une modulation de la réponse cytotoxique. Ainsi, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales leur permet d'échapper à la cytotoxicité induite par les LT CD8+ (Figure 13). Deux inhibiteurs de checkpoints (anticorps monoclonaux) dirigés contre PD1 ont été développés et montrent des réponses impressionnantes en essai clinique : le Pembrolizumab et le Nivolumab. L'essai clinique de phase III comparant 2 doses différentes de Pembrolizumab à l'Ipilimumab montre une PFS à 6 mois de 47,3% pour les patients traités au Pembrolizumab toutes les deux semaines, 46,4 pour ceux traités toutes les trois semaines contre 26,5 pour les patients traités à l'Ipilimumab. Le taux de réponses objectives au Pembrolizumab est également beaucoup plus important qu'avec l'Ipilimumab (environ 33% contre 12%). Le Pembrolizumab obtient l'autorisation de la FDA pour le mélanome en 2014 et est commercialisé en tant que Keytruda®.

L'essai clinique randomisé de phase III comparant l'Ipilimumab seul, le Nivolumab seul, ou la combinaison Nivolumab+Ipilimumab montre des PFS médianes de respectivement

2,9 mois, 6,0 mois et 11,5 mois (Hodi et al., 2018). Le Nivolumab est approuvé par la FDA pour le traitement du mélanome en 2014 et est commercialisé sous le nom Opdivo®. Cette étude démontre de plus que le traitement combiné par deux types d'anticorps monoclonaux (anti-PD1 et anti-CTLA4) permet l'allongement de la réponse thérapeutique et donc de la survie des patients, résultats confirmés par d'autres études (Rotte, 2019).

Ainsi, la nette supériorité des anti-PD1 par rapport aux anti-CTLA4, que ce soit en termes de taux de réponse ou de survie sans progression, leur a permis de devenir le traitement de première ligne chez les patients atteints de mélanome métastatique non muté BRAF<sup>V600</sup>. Mais malgré leur efficacité, les inhibiteurs de checkpoint sont associés à de nombreux effets secondaires sévères. En effet ces traitements ont pour but d'accentuer les réponses immunitaires et peuvent donc déclencher des réactions auto-immunes importantes, conduisant dans les cas les plus extrêmes au décès du patient.

Pour conclure, la prise en charge du mélanome métastatique a connu ces dix dernières années un essor sans précédent et les traitements actuels, immunothérapies ou inhibiteurs de BRAF, permettent d'améliorer la survie sans progression des patients. Si les BRAFi ne peuvent être administrés qu'aux patients porteurs de la mutation BRAF<sup>V600E/K</sup> (représentant moins de 50% des patients), les immunothérapies peuvent être administrées indépendamment du contexte génétique. Bien que les taux de réponses soient relativement faibles (environ 25%), les patients répondeurs restent stables pendant une durée prolongée. Malgré des recherches intensives, les facteurs pouvant prédire les réponses aux immunothérapies ne sont pas encore bien connus. Le problème principal des traitements actuels reste donc le développement des mécanismes de résistance, qui limitent le potentiel thérapeutique et la durée de réponse aux traitements. La Figure 14 représente la prise en charge des patients atteints d'un mélanome de stade III ou IV, selon les recommandations de 2017 de la société française de dermatologie.

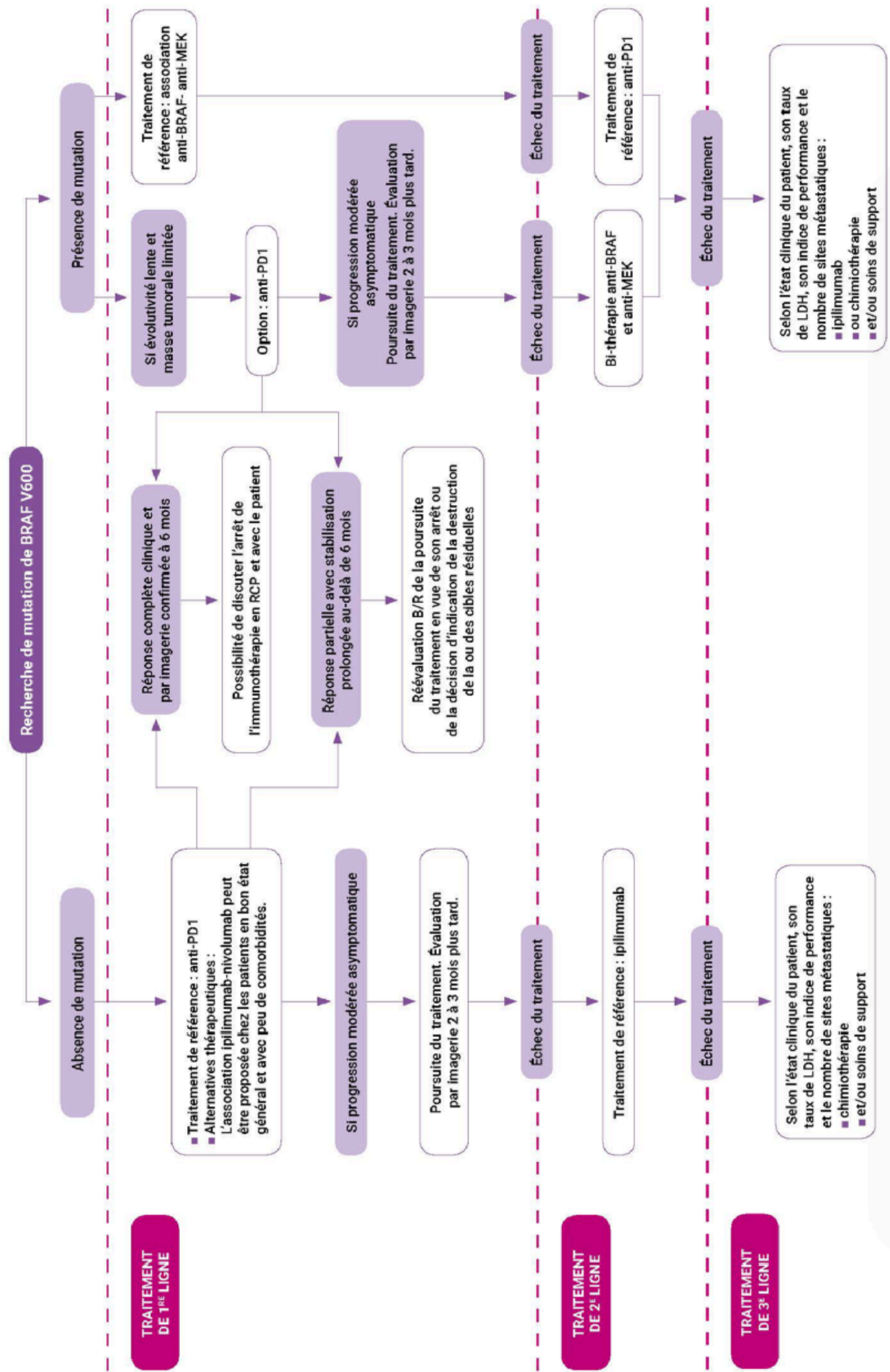


Figure 14 : Arbre décisionnel pour la prise en charge de patients atteints de mélanome de stade III ou IV, selon les recommandations de la Société Française de Dermatologie de 2017

### III. Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées

Il existe de formes distinctes de résistance :

- La résistance primaire, c'est-à-dire l'incapacité du patient à développer une réponse clinique suivant l'initiation du traitement
- La résistance acquise : le patient montre dans un premier temps des signes cliniques de réponse au traitement (régression ou arrêt de la progression de la maladie) avant de rechuter

Seuls les mécanismes de résistance acquise seront détaillés ci-dessous.

Les inhibiteurs de BRAF sont les premières thérapies approuvées dans le traitement du mélanome à avoir apporté une réelle amélioration aux patients porteurs de la mutation BRAF<sup>V600E/K</sup> (représentant moins de 50% des patients). Porteuses d'énormément d'espoirs, ces molécules se sont avérées décevantes : après une réponse initiale impressionnante et une stabilisation de la maladie, les cellules tumorales développent des mécanismes de résistance limitant l'efficacité thérapeutique. Ainsi, plus de 90% des patients auront rechuté dans l'année suivant l'initiation du traitement. Le schéma classique de réponse aux BRAFi suivi de la rechute chez la souris est représenté Figure 15. Lors de l'initiation du traitement, certaines de ces populations vont être sensibles aux BRAFi et conduire à la diminution du volume tumoral et à l'efficacité de la thérapie (Figure 15, phase 1). Cependant, un pool de cellules ayant des caractéristiques transcriptomiques différentes les rendant résistantes au traitement persistent, et conduisent à un stade de maladie résiduelle minimale ou Minimal Residual Disease (MRD), aussi appelé phase de tolérance (Figure 15, phase 2). L'enrichissement progressif de ces cellules résistantes au profit des cellules sensibles conduira alors à l'inefficacité de la thérapie et à la rechute du patient. Contrairement aux mécanismes de résistances observés avec d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase (par exemple les inhibiteurs d'EGFR), ces mécanismes de résistances ne passent pas par l'acquisition de mutation *de novo* sur la kinase BRAF. Une réactivation de la voie des MAPK est fréquemment observée dans les cellules résistantes. La plasticité transcriptomique des cellules de mélanome, capables de passer d'un phénotype prolifératif à invasif et inversement, ainsi que l'hétérogénéité intra-tumorale présente à l'initiation du traitement, leur donne également la capacité de s'adapter aux traitements et de devenir résistantes.

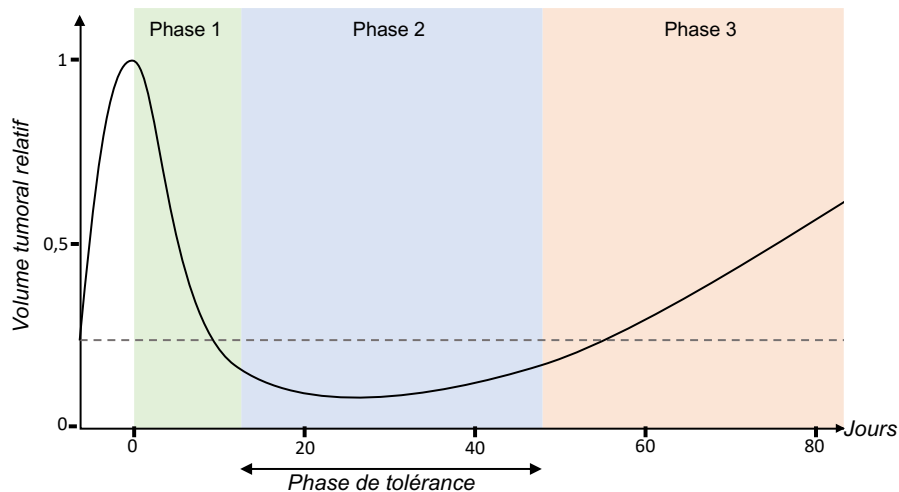


Figure 15 : Modèle de réponse à la combinaison BRAFi+MEKi chez la souris (modèle PDX). Adapté de Rambow et al. 2018

Les mécanismes de résistance secondaire peuvent être classés en deux grandes catégories : les mécanismes de résistance génomiques (mutations de novo sur des acteurs des voies de signalisation) et non génomiques (reprogrammation transcriptionnelle, émergence de clones intrinsèquement résistants). Quel que soit le mécanisme intervenant, cela aboutit à une des deux conséquences suivantes :

- Réactivation d'une voie de signalisation : voie des MAPK ou voie PI3K/AKT
- Changement du programme d'expression transcriptionnel des cellules

## 1. Mécanismes de résistance génomiques

Les premières études cherchant à élucider les mécanismes aboutissant à la résistance aux BRAFi ont cherché à mettre en évidence l'apparition de mutations pouvant expliquer la réactivation des voies de signalisation. Deux hypothèses étaient alors possibles :

- L'émergence de cellules porteuses d'une mutation préexistante au début du traitement mais minoritaire, qui est enrichie au cours du traitement avec la disparition des cellules mutées pour BRAF
- L'apparition d'une mutation *de novo* pendant le traitement, apportant un avantage sélectif à un clone particulier

### a. Résistance génomique dépendante de la voie des MAPK

Bien que la kinase BRAF ne soit que très rarement retrouvée mutée dans les cellules de mélanome résistantes aux BRAFi, l'analyse détaillée des échantillons cliniques met en évidence

la réactivation de la voie des MAPK (indépendamment de BRAF) pour près de 70% des patients (Van Allen et al., 2014). Dans 10% des cas, une hyper-activation de NRAS est observée, due soit à une mutation activatrice de *NRAS* soit à la perte de fonction de *NF1* (Nazarian et al., 2010). Ces mutations, qui permettent l'activation de ERK indépendamment de BRAF, peuvent coexister avec les mutations de BRAF dans un contexte de résistance aux BRAFi alors qu'elles sont mutuellement exclusives lors de la phase de développement du mélanome. Récemment, Dietrich et al. ont montré que l'expression accrue de *KRAS* sauvage était associée à la progression du mélanome, et que l'inhibition de KRAS en parallèle de l'utilisation d'un BRAFi prévenait l'activation paradoxale tout en re-sensibilisant des lignées cellulaires résistantes (Dietrich et al., 2018). L'utilisation combinée d'un inhibiteur de MEK permet donc de bloquer la voie en aval et éviter le développement de ce mécanisme de résistance, et ainsi d'allonger la phase de réponse clinique des patients.

Si aucune mutation de BRAF (hors BRAF<sup>V600E</sup>) n'est retrouvée de manière récurrente dans les tumeurs résistantes, plusieurs processus lui permette néanmoins d'influer sur la réactivation de la voie des MAPK. Des études ont montré l'existence d'un variant d'épissage alternatif de BRAF, aboutissant à la synthèse d'une protéine tronquée pour le site de liaison à RAS dans des tumeurs de patients résistants au Vem (Poulikakos, 2012). Cette protéine, pouvant se dimériser indépendamment de RAS, ne sera pas sensible aux inhibiteurs qui ne peuvent se fixer qu'aux monomères de RAF. L'amplification du gène *BRAF*, résultant en l'expression accrue de BRAF a également été identifiée comme mécanisme de résistance (Corcoran et al., 2010), et est retrouvée chez près de 20% des patients.

Tous les mécanismes décrit précédemment impliquent une dimérisation accrue de RAF, mais certains sont complètement indépendants de la kinase et agissent en aval, notamment sur MEK. La kinase COT (codée par le gène *MAP3K8*), capable d'activer MEK indépendamment de RAF, a été identifiée comme acteur de la résistance acquise aux BRAFi en 2010 lors d'un crible de surexpression de plus de 600 kinases (Johannessen et al., 2010). Des mutations touchant directement le gène *MAP2K1*, codant pour MEK1, participent également à l'établissement de la résistance aux MEKi et BRAFi en monothérapie mais aussi à la combinaison BRAFi+MEKi (Emery et al., 2009; Wagle et al., 2014). Ainsi, les mutations MEK1<sup>P124L</sup>, MEK1<sup>C121S</sup>, MEK1<sup>Q65P</sup> et MEK1<sup>E203K</sup> ont été identifiées comme participant à la résistance au Vem (Emery et al., 2009; Trunzer et al., 2013; Wagle et al., 2011).

Concernant ERK, dernier effecteur de la voie des MAPK, des études *in vitro* sur des lignées cellulaires de mélanome ont mis en évidence le rôle de certaines mutations dans la résistance aux BRAFi et MEKi, seuls ou combinés (Goetz et al., 2014). Ces mutations n'ont cependant pas été retrouvées dans les biopsies de patients résistants.

### b. Résistance génomique indépendante de la voie des MAPK

L'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (Figure 16), en aval des récepteurs IGF-R et MET, permet aux cellules tumorales de se désengager de RAS et de la signalisation des MAPK. Cette voie de signalisation cellulaire est, tout comme la voie des MAPK, impliquée dans la régulation de la prolifération et la survie cellulaire ainsi que de la différenciation. Son activation commence par la fixation d'un facteur de croissance à un RTK comme l'Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R) ou Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR = MET), induisant le recrutement de PI3K et l'activation d'une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation des effecteurs comme AKT. Il existe trois isoformes d'AKT : AKT1, AKT2 et AKT3.

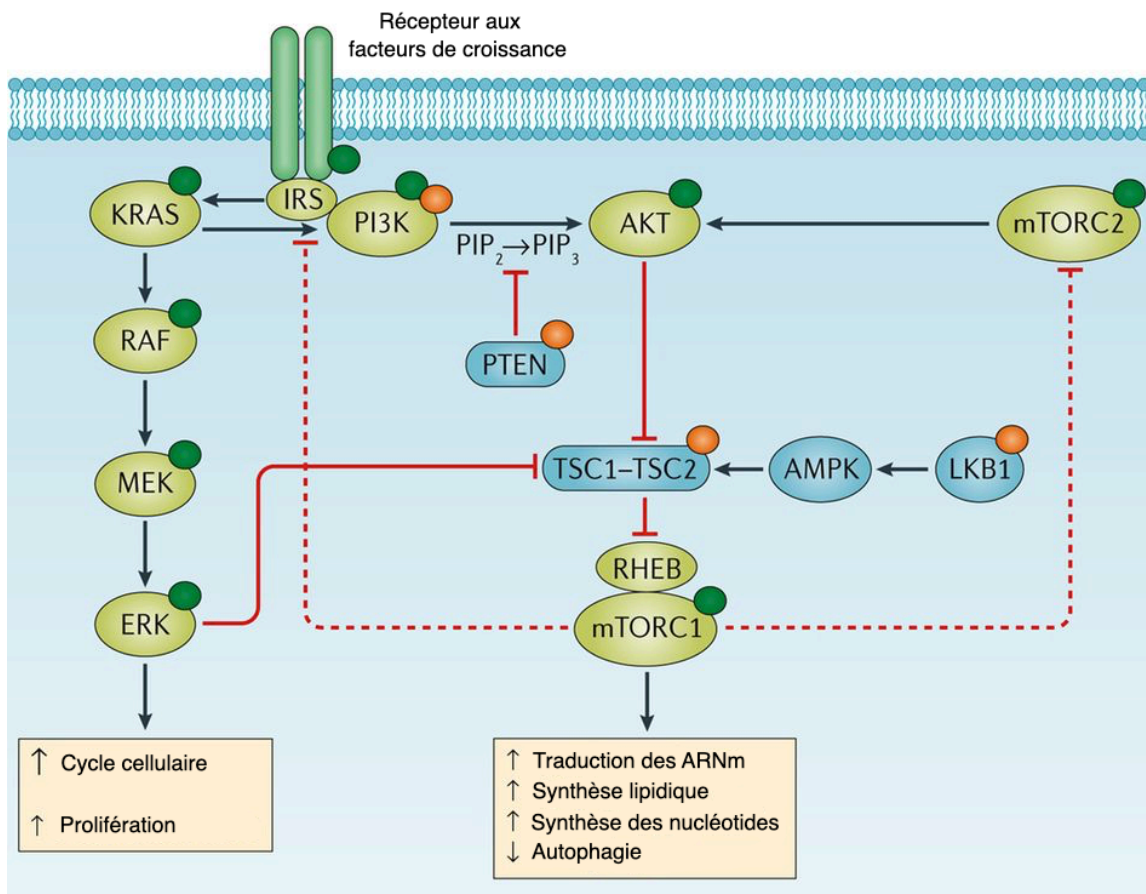


Figure 16 : Voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Adapté de Janku et al. 2018



Une hyper-activation de la voie PI3K/AKT est retrouvée dans plus de 20% des biopsies de tumeurs résistantes aux thérapies ciblées (Shi et al., 2014). L'activation de cette voie va limiter la cytotoxicité induite par les BRAFi en activant une signalisation de survie cellulaire parallèle à la voie des MAPK. Cette activation peut survenir suite à deux processus : la surexpression d'un RTK en amont de la voie ou l'apparition de mutations au niveau des acteurs de la signalisation. Des mutations des isoformes AKT1 et AKT3, bien que rarement observées, participent à l'établissement de la résistance aux BRAFi, comme les mutations AKT1<sup>Q79K</sup>, AKT1<sup>E17K</sup> et AKT3<sup>E17K</sup> (Shi et al., 2014). L'hyper-activation de la kinase AKT, effecteur principal de la voie de signalisation, représente quant à elle la majorité des mécanismes de résistance impliquant la voie PI3K/AKT.

La perte de PTEN, régulateur négatif de la voie PI3K/AKT, entraîne une activation constitutive de la signalisation et une indépendance vis-à-vis de la voie des MAPK, entraînant l'inefficacité des BRAFi (Arozarena and Wellbrock, 2017).

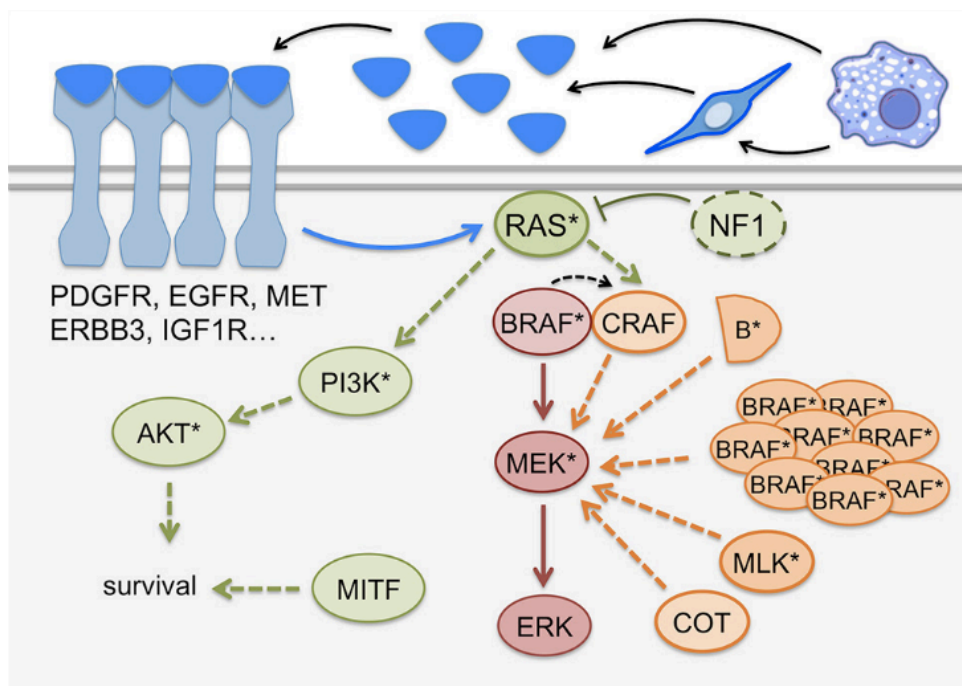


Figure 17 : Diversité des mécanismes de résistance aux BRAFi. Tiré de Arozarena & Wellbrock 2017

## 2. Mécanismes de résistances non génomiques

Bien que les mécanismes décrits précédemment expliquent partiellement les résistances observées au cours du traitement par les BRAFi, il est aujourd'hui admis qu'ils ne peuvent résumer entièrement la complexité de l'acquisition de la résistance aux thérapies des cellules

tumorales. Des études plus récentes démontrent ainsi l'existence de mécanismes dits « non génomiques », c'est-à-dire ne faisant pas intervenir de modifications de l'ADN (comme des changements d'expression transcriptomiques ou encore des modifications épigénétiques).

C'est en 2010 que la surexpression d'un récepteur à tyrosine kinase RTK est montrée pour la première fois comme mécanisme de résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPK, *in vitro* et *in vivo* (Nazarian et al., 2010). En effet, dans des lignées cellulaires résistantes aux BRAFi, il est observé une surexpression du récepteur Platelet Derived Growth Factor Receptor beta (PDGFR $\beta$ ), également observée dans des cultures à court terme de tumeurs de patients résistants. Cependant, cette même étude montre que l'induction d'une surexpression de PDGFR $\beta$  dans des lignées cellulaires sensibles aux BRAFi, bien qu'augmentant la dose d'IC50, n'était pas suffisante pour induire une résistance significative aux BRAFi. Cela suggère que les mécanismes de résistance non génomiques résultent plus d'un changement global du transcriptome des cellules plutôt que de l'altération d'un facteur ou d'une voie en particulier.

De nombreuses études suivantes démontrent l'importance de la surexpression des RTK, sans identification d'altérations génomiques, dans l'établissement de la résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPK. Ainsi, les récepteurs IGF1R (Villanueva et al., 2010), EGFR (Girotti and Marais, 2013), FOXD3 (Basile et al., 2012) ou plus récemment EPHA2 (Miao et al., 2015) ont tous été associés à la résistance aux BRAFi, associée à une activité accrue de la voie PI3K/AKT.

La suractivation des RTK peut également intervenir via la présence de facteurs de croissance ou cytokines dans le microenvironnement tumoral. Ainsi, Straussman et al. ont démontré que la sécrétion d'HGF par les cellules du microenvironnement et notamment par les fibroblastes activait le récepteur c-Met, induisant l'activation des voies des MAPK et PI3K/AKT dans les cellules résistantes aux BRAFi (Straussman et al., 2012). Ces cellules stromales exprimant l'HGF apparaissent chez les patients après initiation du traitement par les BRAFi. Une étude a également démontré que le traitement par le Vem entraînait la production de TGF $\beta$  par les cellules de mélanome BRAF<sup>V600-</sup>. Une fois sécrété, le TGF $\beta$  induit la différenciation des fibroblastes du microenvironnement et ainsi la production d'HGF, aboutissant à l'activation de la voie PI3K/AKT dans les mélanocytes (Fedorenko et al., 2015).

En 2015, Hugo et al. démontrent par l'analyse comparée du génome de tumeurs avant traitement ou résistantes (traitées par les BRAFi seuls ou en combinaison BRAFi+MEKi) que 38% des patients développent des résistances associées à des mécanismes purement non

génomiques (Hugo et al., 2015). Pour 56% des patients, des altérations génomiques sont identifiées, mais elles sont toujours retrouvées en association avec des mécanismes non génomiques (Hugo et al., 2015) (Figure 18). Ainsi, la caractérisation et la compréhension de ces mécanismes de résistances non génomique représentent un nouvel espoir pour la pérennisation de l'utilisation de ces thérapies.

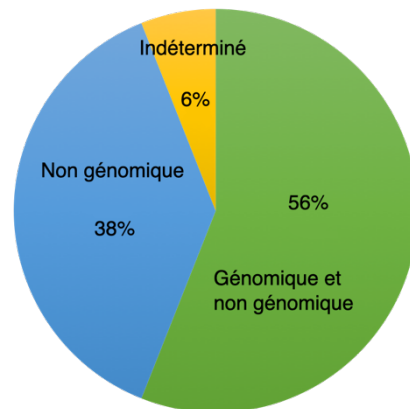


Figure 18 : Différents mécanismes de résistance aux BRAFi selon Hugo et al., 2015

Comme suggéré précédemment, il semble s'établir que la résistance non génomique résulte de la reprogrammation transcriptomique globale des cellules cancéreuses. Or il est déjà décrit que lors de la progression du mélanome, les cellules subissent un « switch phénotypique » (I.5.f, p20-22), passant d'un phénotype prolifératif à un phénotype invasif. Le facteur de transcription MITF y joue un rôle complexe et capital en agissant comme un rhéostat, donnant en fonction de son niveau d'expression un phénotype prolifératif et différencié (MITF<sup>high</sup>) ou à l'inverse un phénotype invasif et indifférencié (MITF<sup>low</sup>). Comme lors de la progression du mélanome, MITF est un acteur important de la reprogrammation cellulaire conduisant à la résistance aux BRAFi et son rôle a été largement investigué ces dernières années.

### 3. Expression de MITF et contrôle des phénotypes cellulaires

Dans la majorité des études, il est montré que l'acquisition de la résistance s'accompagne de la perte de l'expression du facteur de transcription MITF ainsi que de l'ensemble de ses gènes cibles, associés à un phénotype prolifératif, différencié et sensible aux BRAFi, au profit d'une signature transcriptomique associée à l'invasion, à la dédifférenciation

et à la résistance aux BRAFi. Une étude in vitro, utilisant les données d'expression de 53 lignées de mélanome humaines, a récemment établi qu'il existait 4 états de différenciation progressifs du mélanome (Tsoi et al., 2018) (Figure 19). Du plus différencié au moins différencié :

- Sous-type mélanocytique (M) : caractérisé par un fort enrichissement des gènes de la pigmentation associé à une expression élevée de MITF (MITF<sup>high</sup>), ainsi que l'absence d'expression des gènes associés au phénotype cellule souche
- Sous-type transitoire (T) : caractérisé par un enrichissement mutuel des signatures pigmentation et cellule souche « neural-crest like »
- Sous-type « neural-crest like » (NC) : caractérisé par l'expression des gènes associés à l'invasion et l'inflammation mais également par l'expression d'une signature « crête neurale » ou cellules souches de la crête neurale
- Sous-type indifférencié (U) : caractérisé par l'expression d'une signature invasive (adhésion et migration cellulaire) et inflammatoire associées à l'absence d'expression de MITF (MITF<sup>low</sup>)

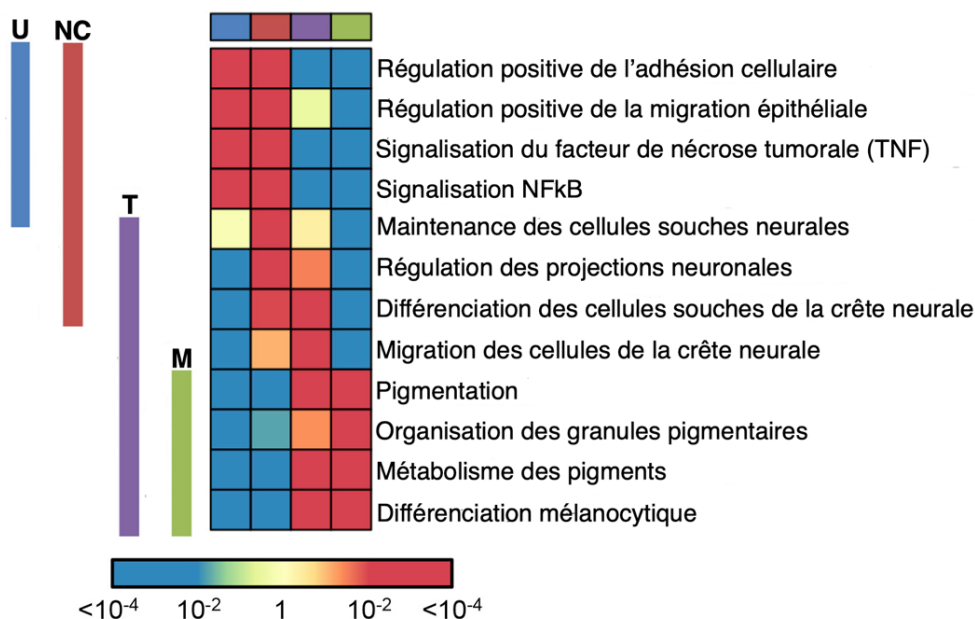


Figure 19 : Sous-types cellulaires du mélanome selon Tsoi et al. 2018

L'étude démontre que la dédifférenciation progressive des cellules apparaît au cours du traitement par les BRAFi. Ainsi, avant traitement les tumeurs contiennent une majorité de cellules des sous-types M et T (MITF<sup>high</sup>), puis les cellules se dédifférencient progressivement pour qu'au stade de résistance on retrouve une majorité de cellules NC ou U (MITF<sup>low</sup>). Ainsi, cette étude reflète d'une part l'hétérogénéité intra-tumorale mais également la plasticité des

cellules de mélanome, capable de se dédifférencier au cours du traitement (Tsoi et al., 2018). Si les cellules résistantes perdent l'expression de la signature MITF, associée à la sensibilité, elles acquièrent à l'inverse une signature invasive, avec par exemple l'augmentation de RTK comme EGFR, AXL, PDGFR ou NGFR.

Ainsi, plusieurs études ont impliqué l'expression accrue d'AXL dans les échantillons résistants. Bien que la fonction de cette protéine n'ait pas été directement identifiée, son rôle dans la progression oncogénique et dans la résistance aux traitements, et notamment aux thérapies ciblées du mélanome, a été largement caractérisé ces dernières années. En 2014, une étude démontre que la kinase AXL, exprimée dans les sous-types dédifférenciés NC et U (Tsoi et al., 2018), a une expression inversement corrélée à MITF, et ce aussi bien dans des lignées cellulaires que dans des tumeurs humaines. Ainsi, le phénotype MITF<sup>high</sup>/AXL<sup>low</sup> est associé à la sensibilité aux BRAFi alors que le phénotype MITF<sup>low</sup>/AXL<sup>high</sup> est associé à la résistance intrinsèque aux inhibiteurs de la voie des MAPK (Konieczkowski et al., 2014). Dans cette étude, l'expression d'AXL est associée à l'activation de la voie NFκB, signalisation de survie cellulaire. De façon intéressante, si la simple surexpression d'AXL suffit à rendre des lignées cellulaires de mélanome résistantes au BRAFi, mettant en évidence le rôle direct de la kinase, son expression n'est pas nécessaire pour le maintien de la résistance. Enfin, les tumeurs de patients présentant avant traitement un phénotype MITF<sup>low</sup>/AXL<sup>high</sup> sont associées à une survie sans progression significativement plus faible que les tumeurs MITF<sup>high</sup>/AXL<sup>low</sup> (Konieczkowski et al., 2014).

Par la suite, d'autres investigations viendront confirmer le rôle de l'expression d'AXL dans la résistance aux BRAFi ainsi que la balance d'expression entre MITF et AXL (Barretina et al., 2012; Müller et al., 2014; Shaffer et al., 2017; Verfaillie et al., 2015). De par son rôle important dans le mélanome mais également dans d'autres cancers, un anticorps spécifique a récemment été développé afin de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses exprimant fortement AXL (Boshuizen et al., 2018). Cet anticorps, conjugué au MMAE (Monométhyl auristatin E), un agent cytotoxique entraînant le désassemblage des microtubules, est internalisé après fixation à AXL et permet ainsi l'élimination des cellules AXL<sup>high</sup>. Testé dans un modèle *in vivo* de Patient Derived Xenograft (PDX), l'anticorps AXL-107-MMAE en combinaison avec BRAFi+MEKi permet de diminuer significativement la croissance tumorale dans plusieurs modèles comme le mélanome mais aussi le cancer du poumon et le cancer du col de l'utérus (Boshuizen et al., 2018). L'élimination de la population AXL<sup>high</sup> permet ainsi de réduire l'hétérogénéité intra-tumorale et d'éviter l'émergence de cette sous-population, retardant

l'apparition des résistances. Cependant, l'existence de plusieurs sous-populations, l'importance de l'hétérogénéité ainsi que la plasticité des cellules et leurs capacités d'adaptation laissent peu d'espoir à une thérapie aussi spécifique. Il est en effet probable qu'une telle thérapie entraîne l'émergence d'une autre population, comme une population NC, au phénotype proche des cellules souche de la crête neurale.

Une autre kinase à avoir été intensément étudiée pour sa participation à l'acquisition de la résistance est EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). De façon similaire à AXL, son expression est retrouvée dans les sous-types différenciés NC et U (Tsoi et al., 2018). L'expression d'EGFR est inversement corrélée à celle de MITF et est associée à la résistance aux BRAFi dans les lignées cellulaires de mélanome humaines et dans les tumeurs de patients (Akbari et al., 2015; Barretina et al., 2012; Ji et al., 2015; Sun et al., 2014; Tsoi et al., 2018). En 2014, Sun et al. démontrent que si la surexpression d'EGFR dans le mélanome diminue la croissance tumorale (les cellules n'ont plus un phénotype différencié et donc moins prolifératif), elle augmente la résistance aux MEKi et aux BRAFi (Sun et al., 2014). Dans le cancer colorectal, les patients porteurs de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> sont intrinsèquement résistants aux inhibiteurs de la voie des MAPK en raison de l'activation d'EGFR (Prahallad et al., 2012). La surexpression d'EGFR dans les tumeurs résistantes aux BRAFi serait due à la déméthylation des éléments d'ADN régulateurs (Wang et al., 2015). Un essai clinique a testé les BRAFi+MEKi combinés à un inhibiteur d'EGFR (Panitumumab) chez des patients atteints d'un cancer colorectal muté BRAF<sup>V600E</sup> (Corcoran et al., 2018). Bien qu'ayant des résultats significatifs, cette combinaison ne fait que retarder le développement des résistances et n'empêche donc pas l'émergence d'une sous-population invasive et résistante.

L'apparition des nouvelles technologies comme le single-cell RNAseq, permettant l'analyse du transcriptome à l'échelle de la cellule unique, a permis d'identifier et de caractériser l'hétérogénéité intra-tumorale comme acteur important de la résistance aux thérapies. L'hétérogénéité tumorale participe en effet grandement à l'échappement tumoral, et en particulier l'hétérogénéité intra-tumorale. Ainsi, plusieurs études ont démontré l'existence de plusieurs sous-populations cellulaires existantes au sein d'une même tumeur. En 2016, Tirosh et al. analysent près de 5000 cellules issues de 19 patients atteints de mélanome en single-cell RNAseq. Il en ressort que l'hétérogénéité transcriptomique des cellules tumorales est associée à la localisation des cellules au sein de la tumeur ainsi qu'à leur sensibilité ou résistance aux thérapies (Tirosh et al., 2016). Plus récemment, Tsoi et al. définissent 4 états de

différenciation cellulaire, et associent la dédifférenciation à la résistance aux BRAFi (Tsoi et al., 2018). Toutes les études précédemment décrites permettent ainsi d'établir que pour devenir résistantes, les cellules tumorales subissent un changement (« switch ») phénotypique et une dédifférenciation, associés à la perte d'expression de MITF au profit d'une signature associée à l'invasion et aux cellules souches de la crête neurale.

Plus récemment, Rambow et al. démontrent une grande hétérogénéité cellulaire durant la phase de tolérance (MRD) (Rambow et al., 2018). En effet, par l'analyse en single cell RNAseq de tumeurs obtenues à partir d'un modèle PDX (tumeur de patient xénotransplantée chez la souris) permet l'identification de 4 sous-population aux caractéristiques transcriptomiques distinctes coexistant au stade de MRD, après traitement par les BRAFi+MEKi :

- Les cellules « pigmentées » : expression élevée du programme de pigmentation associé à MITF
- Les cellules « starved-like » ou SMC, qui présentent un programme d'expression similaire à celui retrouvé dans les cellules privées de nutriments. Ces cellules présentent une expression de MITF intermédiaire
- Les cellules « Neural-crest stem cells » ou NCSC, exprimant des gènes spécifiques des cellules souches de la crête neurale comme le Nerve Growth Factor Receptor (NGFR) ou l'Aquaporine-1 (AQP1), MITF<sup>low</sup>
- Les cellules « invasives », exprimant des gènes de l'EMT, MITF<sup>low</sup>

Si les cellules au phénotype prolifératif, exprimant fortement MITF et ses cibles, sont majoritaires avant l'initiation du traitement, la sélection par les BRAFi+MEKi entraîne l'émergence de ces cellules persistantes au stade de MRD. Cette étude montre que les cellules émergent au stade de MRD, conduisant les rechutes, sont les NCSC, aux propriétés similaires aux cellules souches de la crête neurale. Une analyse bio-informatique prédictive de trajectoire suppose la réversibilité de ces états cellulaires et la transition d'un état à l'autre plutôt que l'enrichissement d'une sous-population. Ainsi, l'enrichissement des NCSC observé au cours de la phase de tolérance résulte de la transition phénotypique des autres populations cellulaires. Cette analyse de trajectoire émet également l'hypothèse que la population SMC précède les trois autres stades phénotypiques (pigmentées, NCSC et invasives). Les cellules prolifératives, majoritaires au début du traitement, passeraient donc par un état transitoire de SMC avant d'évoluer dans l'un des trois autres états phénotypiques au stade de MRD (Rambow et al., 2018) (Figure 20).

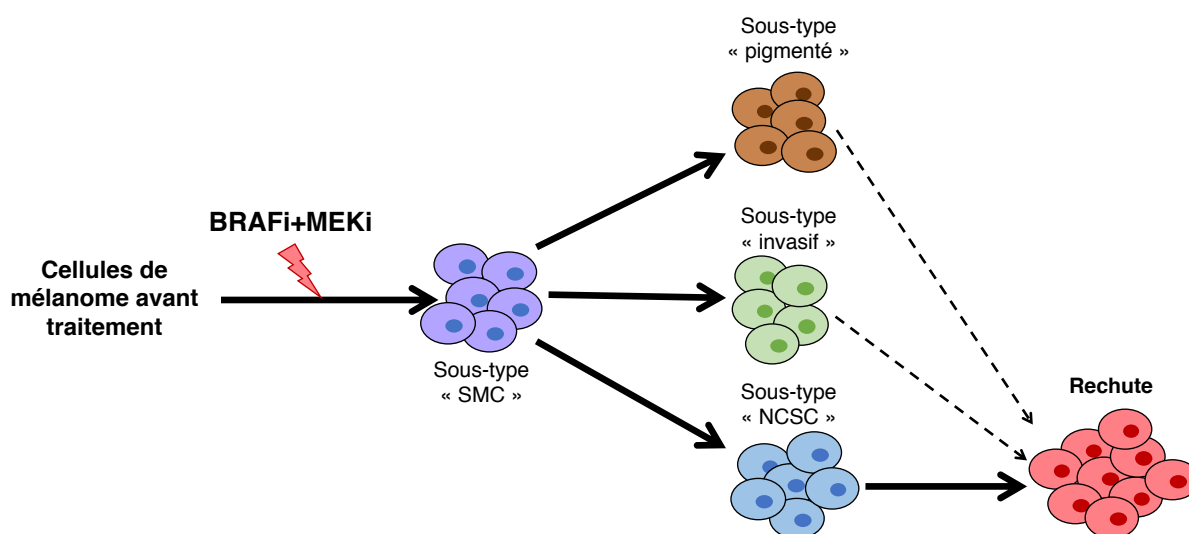


Figure 20 : Hétérogénéité tumorale pendant la progression du mélanome selon Rambow et al. 2018

Cette étude dénote également la grande variabilité inter-patients en termes de composition cellulaire au stade de MRD, posant un challenge supplémentaire pour l'éradication potentielle de ces cellules avec une thérapie complémentaire aux inhibiteurs de la voie des MAPK. Contrairement aux autres travaux précédemment réalisés, cette étude propose de cibler les cellules présentes en phase de tolérance, avant qu'elles n'émergent, plutôt que de cibler les cellules aux propriétés invasives observées au stade de résistance.

De façon intéressante, dans le modèle de PDX utilisé dans cette étude (MEL006), le récepteur Retinoid X Receptor Gamma (RXRG) est identifié comme driver de l'état cellulaire NCSC et est donc considéré comme cible thérapeutique. Ce récepteur a des propriétés similaires au facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), notre protéine d'intérêt qui sera discuté en profondeur dans la suite de ce manuscrit. Il faut cependant prendre en compte que toute cette étude a été menée sur un seul modèle de PDX, donc une seule tumeur de patient, ce qui ne peut refléter l'hétérogénéité inter-patients.

Bien que la majorité des études associent l'expression de MITF à la sensibilité et la perte de son expression à la résistance aux inhibiteurs de la voie des MPAK, certaines études sont en contradiction avec ces observations. Par exemple, un cribble surexprimant individuellement plus de 15 000 gènes dans une lignée cellulaire de mélanome humaine mutée BRAF<sup>V600E</sup> (A375) identifie une signature mélanocytaire, régulée par MITF, associée à la résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPK (Johannessen et al., 2013). Cette étude associe l'expression et l'activité de MITF à l'activation de l'AMP cyclique (AMPC) et propose donc l'utilisation



d'inhibiteurs de HDAC (histone désacétylase), prévenant l'activation de la voie de l'AMPc et donc l'expression de la signature mélanocytaire. En 2016, l'équipe du Pr. Wellbrock identifie MITF comme acteur précoce de la résistance non génomique, agissant pendant la phase de tolérance au traitement. Lors de cette phase, pendant laquelle les cellules tumorales acquièrent les capacités nécessaires pour la reprise de la prolifération, l'expression de MITF augmente progressivement et est contrôlée par le facteur de transcription PAX3 (Paired Box 3).

#### 4. L'importance du phénotype « cellule souche »

Comme décrit en première partie de cette introduction, les mélanocytes dérivent de la crête neurale, tous comme les neurones et les cellules de Schwann. Certaines cellules tumorales de mélanome vont retourner à un état transcriptomique « basal » et ainsi exprimer des gènes spécifiques des précurseurs de la crête neurale comme NGFR. Dès les premières études de single cell dans le mélanome une population de cellules se divisant peu et exprimant NGFR est retrouvée (Tirosh et al., 2016). La signature transcriptomique « neural crest-like » est également plus exprimée dans des lignées cellulaires humaines de mélanome (BRAF<sup>V600E</sup>) rendues résistantes au BRAFi que dans les lignées sensibles (Su et al., 2017). Si on reprend l'étude de Tsoi et al., NGFR est spécifique du sous-type indifférencié NC, contrairement à d'autres facteurs (comme AXL) qui seront retrouvés et dans les populations NC et U (Tsoi et al., 2018). La majorité des études opposent l'expression de la signature NGFR/indifférenciée à la signature MITF/différenciée (Rambow et al., 2018; Tirosh et al., 2016; Tsoi et al., 2018). Cependant dans l'étude de Tsoi et al., l'état NC n'est pas une finalité mais un état intermédiaire entre les états différenciés M et T et l'état U, très indifférencié.

Ainsi il semble aujourd'hui s'établir que les tumeurs de mélanome présentent une forte hétérogénéité intra-tumorale. Au cours du traitement, l'élimination des cellules présentant des caractéristiques prolifératives/différenciées (MITF<sup>high</sup>), population majoritaire, permettra l'effet cytotoxique du traitement et la réduction monumentale du volume tumorale. Mais certaines cellules aux caractéristiques transcriptomiques différentes persistent et donnent lieu à la phase de tolérance (MRD). La transition transcriptomique progressive de ces populations cellulaires, leur adaptation au traitement, leur permettra ensuite d'émerger et de donner lieu à la phase de résistance, conduisant à la rechute du patient.

Cependant, il reste peu établi la façon dont les cellules sont capables de s'adapter et de changer leur programme d'expression. Deux hypothèses coexistent de nos jours (Figure 21) :

- L'hypothèse « Darwinienne » : sélection et enrichissement d'un clone résistant qui présente un avantage sélectif pour la reprise de la prolifération sous thérapie (Figure 21A)
- L'hypothèse « Lamarckienne » : la thérapie elle-même induit une modification de l'état phénotypique des cellules, évoluant vers un état de tolérance au traitement persistant au cours des générations grâce à une reprogrammation transcriptomique et une modification de l'activité des voies de signalisation (Figure 21B) (Su et al., 2017)

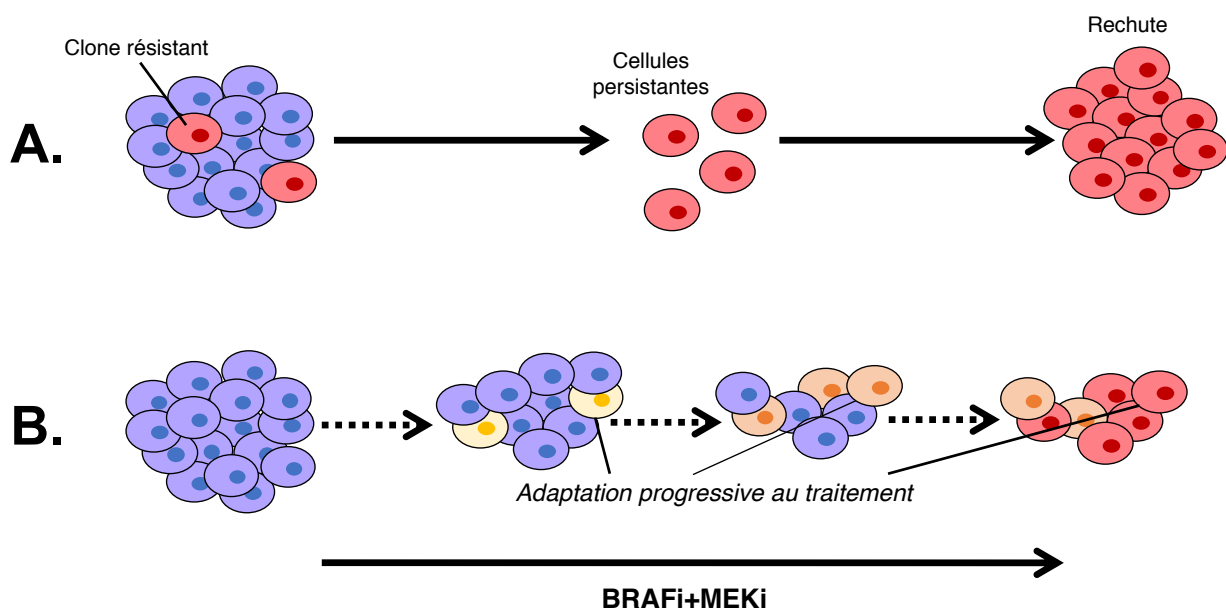


Figure 21 : Théories d'évolution et d'adaptation au traitement selon Darwin et Lamarck

Plusieurs études remarquent l'existence avant traitement de cellules exprimant des marqueurs de la résistance comme AXL ou EGFR (Boshuizen et al., 2018; Shaffer et al., 2017; Tirosch et al., 2016). En 2017, Shaffer et al. démontrent à partir de cellules de mélanome dérivées de patients que les tumeurs sont hétérogènes et que leur état transcriptomique varie au cours du temps. Les cellules passeraient d'un état non-résistant à un état pré-résistant par changement d'expression transcriptomique. Ainsi, avant l'initiation du traitement, une population minoritaire de cellules sera dans un état pré-résistant réversible, exprimant un faible nombre de marqueurs de la résistance. Au cours du traitement, ces cellules pré-résistantes passent alors progressivement dans un état résistant qui n'est plus réversible et expriment alors tout un panel de gènes de la résistance aux BRAFi comme *EGFR*, *AXL*, *PDGFRB*, *NGFR*, *WNT5A*...

L'élimination des cellules dans l'état non-résistant, et l'adaptation progressive des cellules pré-résistantes conduit alors à l'émergence d'une population résistante .

De façon intéressante, cette étude crée donc une troisième hypothèse : une combinaison de l'évolution Darwinienne et de l'évolution Lamarckienne : une minorité de cellules présente avant l'initiation du traitement un avantage sélectif, puis leur adaptation transcriptomique progressive (expression de plus en plus de gènes impliqués dans la résistance), aboutissant à l'expression coordonnée d'un panel de gènes de résistance, leurs permet de passer dans un état résistant définitif. L'idée globale de cette étude rejoint celle de Tsoi et al., où il est démontré que les cellules de mélanome s'adaptent progressivement au traitement et passent d'un état très différencié/mélanocytique à un état très indifférencié, en passant par un état intermédiaire de type « neural crest-like » (Tsoi et al., 2018). À l'inverse de cette évolution linéaire, Rambow et al. proposent un modèle différent où l'évolution à partir d'un état phénotypique (SMC) peut aboutir à trois états cellulaires distincts : pigmentées, NCSC ou invasives (Rambow et al., 2018).

Pour conclure, malgré l'efficacité des nouveaux traitements du mélanome (immunothérapies et thérapies ciblées), les mécanismes de résistance acquise limitent le potentiel thérapeutique. L'essor des nouvelles technologies et les efforts de la communauté scientifique dans la compréhension de ces phénomènes n'ont permis à ce jour que de décaler le développement de ces mécanismes de résistance. Aucune combinaison de thérapies ne permet cependant d'éviter l'émergence de ces cellules. Au sein de l'équipe, nous nous sommes donc ces dernières années intéressés à l'identification de nouveaux acteurs de l'acquisition de la résistance et du switch phénotypique, et avons focalisé notre étude sur le facteur de transcription AhR.

## IV. Le facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor

Le récepteur Aryl hydrocarbon Receptor, ou récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR), est un senseur environnemental très conservé au cours de l'évolution, identifié en 1976 pour son rôle dans les effets cutanés observés après exposition au 3,4,3',4'-tetrachloroazoxybenzene (TCAOB) et 3,4,3',4'-tetrachloroazobenzene (TCAB) (Poland et al., 1976). Le facteur AhR appartient à la famille des facteur de transcription des basic helix-loop-helix (bHLH) PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS), sous-groupe de la superfamille des basic helix-

loop-helix (bHLH). Les facteurs de transcription retrouvés dans cette famille interviennent dans plusieurs voies de signalisation comme la détoxification des polluants environnementaux (AhR), l'hypoxie (HIF, Hypoxia Inducible Factor), le développement neuronal (SIM, Single-Minded) et le rythme circadien (Per, Period). Bien qu'impliquant différents cofacteurs, leur mode d'activation est similaire : une protéine bHLH-PAS de type I exprimée de façon spécifique ou activée et régulée par des signaux (comme AhR), s'hétérodimérise avec une protéine bHLH-PAS de classe II, plus ubiquitaire et non régulée, comme le co-facteur nucléaire Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) (Bersten et al., 2013).

Malgré de grandes similitudes structurales et fonctionnelles entre les différents membres de cette famille de facteurs de transcription, AhR est le seul nécessitant la fixation d'un ligand pour son activation. Activé par un large spectre de xénobiotiques (toxiques environnementaux) mais aussi par d'autres molécules tels les flavonoïdes naturels végétaux et autres molécules endogènes, AhR a été impliqué dans divers processus biologiques. Ainsi, si AhR est indispensable à la détoxification des xénobiotiques, fonction historique la mieux caractérisée, il est également un acteur important l'homéostasie de la peau et participe au bon fonctionnement de l'immunité adaptative, fonctions qui seront détaillées ultérieurement.

## 1. Structure

Le facteur de transcription AhR, tout comme les autres facteurs de la famille bHLH-PAS, est caractérisé par un domaine HLH, deux domaines PAS (PAS-A et PAS-B), ainsi qu'un domaine de transactivation (Figure 22).

### a. Domaine bHLH

Le domaine bHLH, situé dans la partie N-terminale de la protéine, permet d'une part la liaison à l'ADN, grâce à la présence de résidus basiques chargés positivement, mais aussi l'hétérodimérisation avec les co-facteurs d'AhR comme ARNT. L'interaction d'AhR avec la protéine chaperonne Heat Shock Protein 90 (Hsp90) se fait également *via* le domaine bHLH. Enfin, le domaine HLH contient une séquence d'importation nucléaire ou NLS (Nuclear Localization Signal), permettant la translocation nucléaire d'AhR après activation par un ligand, ainsi qu'un signal d'exportation nucléaire ou NES (Nuclear Export Signal) permettant le retour cytoplasmique suivant la signalisation nucléaire.

## b. Domaine PAS

Le domaine PAS, très conservé au cours de l'évolution, est situé en partie centrale de la protéine. Initialement identifié sur les protéines Period (Per), ARNT et Single-Minded (Sim), le domaine PAS est défini par deux séquences similaires mais non identiques d'environ 70 acides aminés : PAS-A et PAS-B (Gu et al., 2000). Le domaine PAS-A permet, tout comme le domaine bHLH, la dimérisation avec le partenaire nucléaire d'AhR : ARNT. Le domaine PAS-B, intervient dans l'interaction avec Hsp90, mais il est surtout nécessaire pour la liaison des ligands (Fukunaga et al., 1995). Un NES est présent au niveau du PAS-B, permettant une régulation de l'export d'AhR dans le cytoplasme.

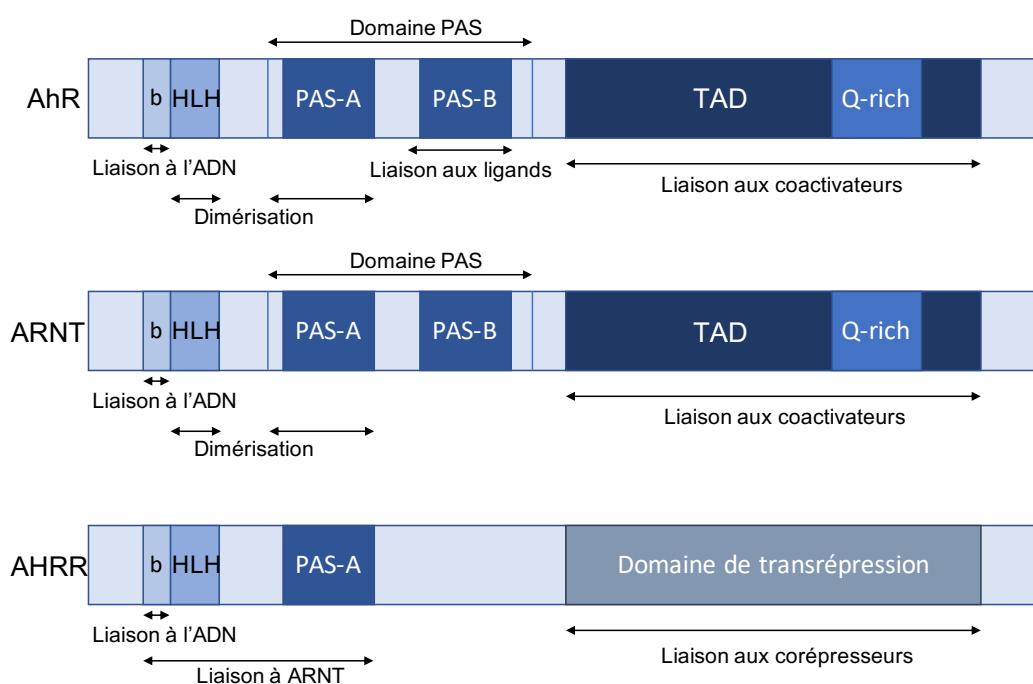


Figure 22 : Structures des protéines de la famille bHLH-PAS

## c. Domaine de transactivation

Le domaine de transactivation ou TAD (TransActivation Domain), en partie C-terminale de la protéine, est quant à lui moins conservé. Sa fonction principale est la transactivation du facteur de transcription, par le recrutement de co-activateurs. En effet le domaine TAD contient une région riche en glutamine, nécessaire à la liaison des co-activateurs et permettant ainsi la régulation de la transcription des gènes cibles d'AhR (Zhou, 2016).

## 2. Modes d'activation d'AhR

### a. Activation canonique

Dans sa forme inactive, AhR est maintenu dans le cytoplasme par un complexe de protéines chaperonnes comprenant les protéines Hsp90 (Perdew, 1988), p23 (Kazlauskas et al., 1999), XAP2 (Meyer et al., 1998) et la kinase c-SRC plus récemment identifiée (Dong et al., 2011). Cette association entre AhR et Hsp90 permet non seulement la stabilisation cytoplasmique d'AhR en absence de ligands activateurs (Erlejman et al., 2014) mais également le maintien d'une conformation permettant la fixation d'un potentiel ligand activateur. La fixation d'un ligand au domaine PAS-B va induire le relargage d'une des deux protéines Hsp90 entraînant un changement de conformation, permettant l'exposition du NLS et la translocation nucléaire du complexe AhR-chaperonnes. En plus d'induire une modification de conformation, la fixation d'AhR à un ligand expose le domaine PAS-A. Cela permettra, une fois AhR dans le noyau, le recrutement facilité d'ARNT, indispensable à la fonction canonique d'AhR. L'hétérodimère formé par le couple AhR-ARNT dans le noyau est alors actif et reconnaîtra des séquences d'ADN spécifiques, appelées Xenobiotic Responsive Elements (XRE) de séquence 5'-GCGTG-3' sur les promoteurs des gènes cibles. Il a été montré que bien que ce court motif soit essentiel à la fixation du complexe, les nucléotides présents de part et d'autre influencent également la liaison au promoteur des gènes cibles (Lusska et al., 1993). La fixation de l'hétérodimère AhR-ARNT sur les éléments de réponse de ces gènes entraînera leur régulation transcriptionnelle. C'est en 1996 que Bacsı et al. identifient les 35 acides aminés (Tyr<sup>9</sup> à Asn<sup>43</sup>) critiques pour l'interaction d'AhR avec l'ADN (Bacsı and Hankinson, 1996). Parmi les gènes régulés par AhR, les mieux caractérisés sont les gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, et notamment les enzymes de phase I à savoir les cytochromes P450 comme *CYP1A1* (Kawajiri and Fujii-Kuriyama, 2007) (Figure 23).

### b. Activation non-canonique

Bien que la voie de signalisation d'AhR et ses mécanismes d'activation aient été intensément étudiés et caractérisés, des études transcriptomiques ont révélé la régulation de l'expression par le récepteur de gènes ne présentant pas de séquence XRE au niveau de leur promoteur, suggérant l'existence d'une voie parallèle non canonique (Tijet et al., 2006). En effet, plusieurs travaux ont démontré un rôle transcriptomique direct d'AhR *via* des sites de

liaison à l'ADN non consensus (Ohtake et al., 2003; Sogawa et al., 2004; Vogel et al., 2007). Plus récemment, Huang et Elferink ont déterminé, par l'étude de la régulation du gène Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), une séquence de liaison à l'ADN XRE non consensus (NC-XRE) (Huang and Elferink, 2012). Ce motif, constitué de quatre répétitions des nucléotides 5'-GGGA-3', promeut la liaison à l'ADN et la fonction du facteur de transcription AhR. Des études fonctionnelles ont montré que la régulation de gènes ne présentant pas de XRE au niveau de leur promoteur était dépendante d'AhR et nécessitait la fixation du récepteur au niveau d'un NC-XRE (Huang and Elferink, 2012). Indépendante du cofacteur ARNT, la signalisation non canonique nécessite le recrutement du facteur Krüppel-like Factor 6 (KLF6), identifié récemment comme un nouveau partenaire protéique d'AhR (Wilson et al., 2013). KLF6 appartient à la famille de facteurs de transcription à doigt de zinc KLF, hautement conservée au cours de l'évolution et régulant notamment la prolifération cellulaire, le développement et la différenciation (Dang et al., 2000) et a précédemment été identifié comme suppresseur de tumeur et régulateur du cycle cellulaire via p21<sup>Cip1</sup>. La délétion du domaine basique d'AhR, nécessaire pour fixer les XRE, n'empêche pas le recrutement de KLF6 et la fixation aux motifs NC-XRE, suggérant des mécanismes d'action foncièrement éloignés (Wright et al., 2017). Ainsi, la signalisation non-canonique d'AhR est différente en tout point de vue de la signalisation canonique, de par le recrutement de cofacteurs différents et la fixation à des motifs différents, permettant ainsi la régulation d'un tout autre panel de gènes (Figure 23). Il a également été démontré qu'AhR pouvait interagir avec les motifs E-Box, sur lesquels se fixent normalement les facteurs de transcription bHLH leucine-zipper comme Upstream Stimulating Factor 1 (USF1). AhR peut en effet entrer en compétition avec USF1 pour la liaison d'une E-box sur le promoteur de follicle-stimulating hormone receptor (*FSHR*) et ainsi réguler son expression (Teino et al., 2012).

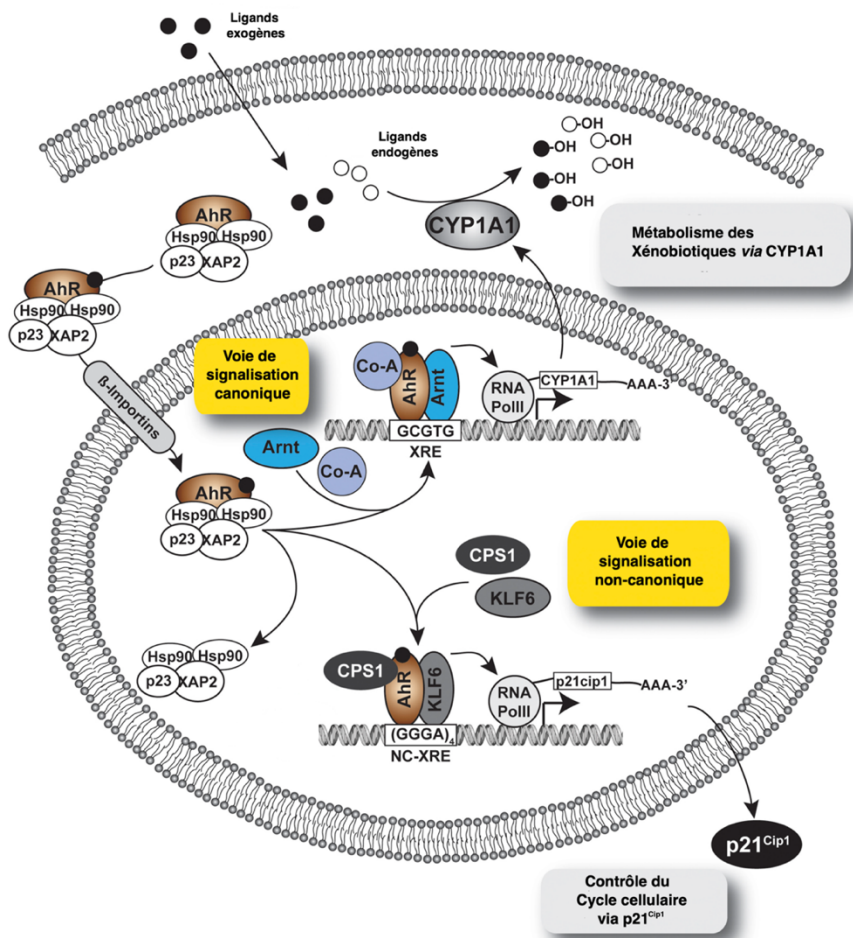


Figure 23 : Voies de signalisation canonique et non canonique d'AhR. Adapté de Wright et al. 2017

### c. Régulation du niveau protéique d'AhR

L'expression protéique d'AhR est régulée par deux processus distincts. Premièrement par son adressage au protéasome. En effet après sa translocation nucléaire et son activation, AhR est exporté dans le cytoplasme grâce à la séquence NES, exposée par la dissociation de la protéine chaperonne Hsp90. Il y est alors ubiquitiné pour être adressé au protéasome et ainsi recyclé (Davarinos and Pollenz, 1999).

AhR peut également être régulé par l'installation d'une boucle d'autorégulation négative. En effet, l'activation d'AhR va induire l'expression d'une autre protéine bHLH/PAS, Aryl hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR) (Figure 22). Partageant une grande homologie avec AhR, AhRR peut se dimériser avec ARNT et se fixer aux séquences XRE des gènes cibles, sans pour autant pouvoir fixer les ligands et recruter les cofacteurs nécessaires à l'activation de la signalisation (Mimura et al., 1999). Par ce mécanisme de compétition, AhRR permet une répression de la voie de signalisation AhR. Un autre mécanisme d'action potentiel d'AhRR



serait la transrépression, due à l'absence du domaine de transactivation, remplacé par un domaine de transrépression permettrait le recrutement de corépresseurs (Larigot et al., 2018).

La fine régulation de l'expression d'AhR permet le contrôle temporel de l'activation de la signalisation et de sa puissance, mais également le contrôle de la disponibilité du cofacteur ARNT, qui pourra une fois AhR dégradé agir sur d'autres voies de signalisation comme l'hypoxie.

### 3. Diversité des ligands d'AhR

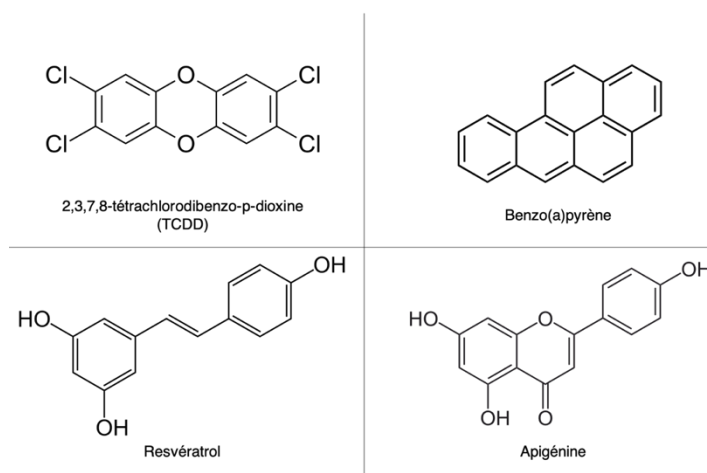
Depuis la découverte d'AhR et de son mécanisme d'action, une grande variété de molécules pouvant se lier au récepteur a été identifiée. Ces ligands varient non seulement par leur origine, qui peut être naturelle ou synthétique, mais également par leur structure. Hydrophobes et de faible poids moléculaire, les ligands d'AhR pénètrent dans la cellule par diffusion. Ils peuvent être divisés en deux grandes catégories en fonction de leur origine, endogène ou exogène à l'organisme.

#### a. Ligands exogènes

Les ligands exogènes peuvent eux-mêmes être classés en deux groupes distincts, selon s'ils proviennent d'une source naturelle ou bien synthétique, c'est-à-dire issus de l'activité humaine. Les polluants environnementaux, comme les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques non halogénés (HAP) et les Hydrocarbures Aromatiques Halogénés (HAH), ont été les premiers à être identifiés et sont en conséquence les mieux caractérisés (Denison and Heath-Pagliuso, 1998). Majoritairement synthétiques, ces molécules sont pour la plupart planes et aromatiques (Figure 24) avec une affinité importante pour le récepteur. Les HAH (dioxines, dibenzofuranes, biphényles) métaboliquement stables, sont ceux présentant l'affinité la plus importante pour AhR alors que les HAP (benzo(a)pyrènes, benzoflavones), moins stables, présentent une affinité moindre (Denison and Nagy, 2003). La 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) ou dioxine (HAH), est le ligand de référence d'AhR. Présentant une toxicité importante pour l'organisme, la TCDD fait partie des molécules cancérigènes (groupe 1) selon la classification du CIRC (Tableau 2). Certains HAP, comme le benzo(a)pyrène (BaP), présentent également des effets toxiques et ont été classés par l'OMS du fait de leur génotoxicité.

**Tableau 2 : Classification du CIRC des substances chimiques**

<b>Groupe 1</b>	<b>Cancérogène</b>
<b>Groupe 2A</b>	Probablement cancérogène
<b>Groupe 2B</b>	Peut-être cancérogène
<b>Groupe 3</b>	Inclassable
<b>Groupe 4</b>	Probablement pas cancérogène



**Figure 24 : Exemples de structures de ligands exogènes d'AhR, d'origine naturelle ou synthétique**

Des molécules naturelles ont également été identifiées comme ligands agonistes ou antagonistes du récepteur AhR, comme le resvératrol ou l'apigénine (Figure 24). Apportées en grande partie par l'alimentation, ces molécules sont synthétisées par les organismes végétaux et regroupent notamment les flavonoïdes, les glucosinolates et les indoles (Esser et al., 2013). Les flavonoïdes, plans et polyaromatiques, sont pour la plupart des antagonistes d'AhR et peuvent ainsi prévenir son activation. Ils possèdent des propriétés antioxydantes et il a été montré qu'une prise quotidienne de flavonoïdes, apportés notamment par les fruits et légumes, réduisait le risque de développement de plusieurs cancers (Neuhouser, 2004), bien que ces effets n'aient pas été reliés au récepteur AhR. Le rôle des flavonoïdes sur le contrôle de l'activité d'AhR et leur utilisation thérapeutique seront développés plus en détail dans la partie résultats (Résultat III).

### b. Ligands endogènes

Les ligands physiologiques endogènes d'AhR ont été identifiés bien après les polluants environnementaux. On retrouve des molécules produites par le métabolisme de tryptophane comme la kynurénine (Kyn), générée *via* l'enzyme tryptophan-2,3-dioxygénase (TDO1/2)

(Opitz et al., 2011). L'activation d'AhR par la Kyn a non seulement été associée au développement tumoral (D'Amato et al., 2015; Opitz et al., 2011) mais elle participe également à l'échappement immunitaire des cellules cancéreuses (Cheong and Sun, 2018). L'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase 1 (IDO1), impliquée elle aussi dans la dégradation du tryptophane, induit la production de Kyn et joue notamment sur les capacités de défense d'un hôte face à un pathogène (Bessede et al., 2014). Le 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), photo-produit du tryptophane synthétisé dans la peau après irradiation aux UV, est également un activateur endogène du AhR (Denison and Nagy, 2003). Malgré une affinité importante pour le récepteur, de l'ordre de celle de la TCDD, le FICZ est très rapidement métabolisé par les enzymes du métabolisme comme CYP1A1. Enfin, la 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE), issue de la réaction de condensation d'un tryptophane et d'une cystéine et identifiée comme ligand physiologique d'AhR, aurait un rôle immunosuppresseur (Quintana et al., 2010). De nombreuses autres molécules (métabolites des indoles, du tryptophane, de l'acide arachidonique et dérivés d'hèmes) font parties de la longue liste des ligands d'AhR, activateurs ou répresseur de son activité (Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018).

#### 4. Fonctions d'AhR

De la grande diversité de ligands pouvant fixer le AhR va découler une diversité de fonctions biologiques régulées par ce facteur de transcription. Il est en effet aujourd'hui connu que le rôle du récepteur AhR ne s'arrête pas à sa première fonction identifiée, à savoir la régulation du métabolisme des xénobiotiques. Ses principales fonctions biologiques sont détaillées ci-dessous.

##### a. Le métabolisme des xénobiotiques

Les Hommes sont exposés quotidiennement à de nombreuses molécules pouvant provenir de l'alimentation, de l'eau ou encore de l'air qui nous entoure (xénobiotiques). Afin de favoriser la transformation et l'élimination de ces molécules par l'organisme, et donc de réduire les effets toxiques induits par exemple par les HAH et HAP, des mécanismes enzymatiques se sont développés au cours de l'évolution. Ils permettent le métabolisme des xénobiotiques et donc la détoxification de l'organisme par un processus comprenant trois phases, qui se déroulent en grande majorité dans le foie (Figure 25). Brièvement la dégradation

des xénobiotiques commence par l'activation des enzymes de phase I, phase de fonctionnalisation, comme les cytochromes P450. Ces enzymes vont catalyser des réactions d'hydrolyse des molécules et ainsi les activer. Les xénobiotiques sont ensuite conjugués par les enzymes de phase II comme la Glucathion S-Transférase (GST). Via l'ajout d'un groupement hydrophile, cette étape de conjugaison augmente la solubilité des molécules initialement hydrophobes, facilitant ainsi leur élimination. Enfin, des transporteurs actifs de phase III comme les P-glycoprotéines (P-gp) ou le Multidrug Resistance-associated Proteins (MRP) assurent l'éjection des composés hors de la cellule et leur élimination par les urines, la bile ou la sudation.

L'activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont principalement régulés par des récepteurs nucléaires comme AhR mais aussi le Pregnane X Receptor (PXR) et le Constitutive Androstane Receptor (CAR). Pour sa part, AhR régule les gènes codant pour les enzymes de phase I comme *CYP1A1*, *CYP1A2* et *CYP1B1*.

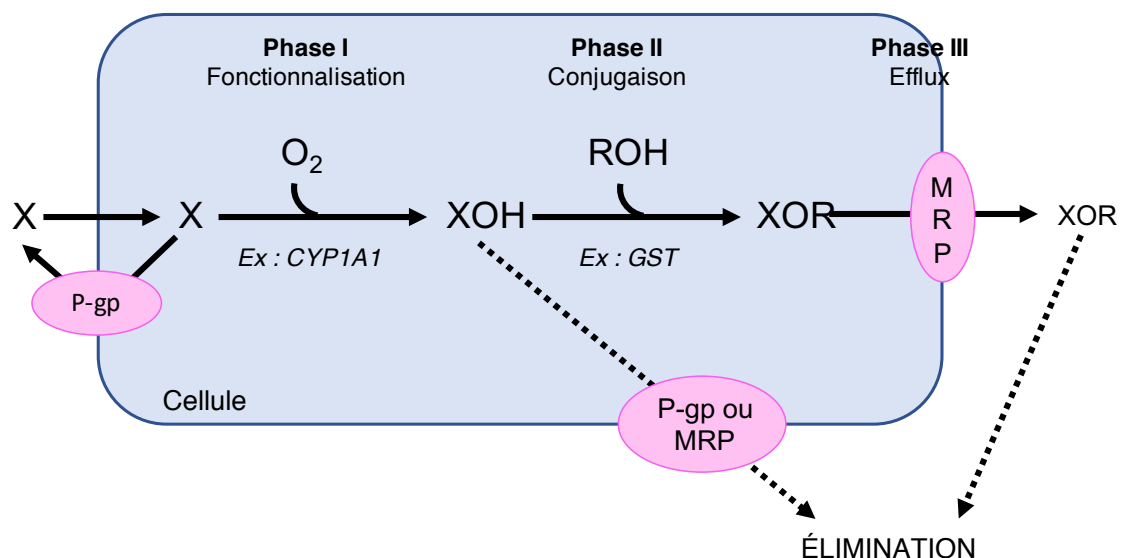


Figure 25 : Métabolisme des xénobiotiques

## b. Immunité

Ces dernières années, le rôle d'AhR dans le fonctionnement et la régulation de l'immunité a été largement étudié. Comme décrit en partie II.3.b, l'enzyme IDO1, en induisant la production de Kyn et l'activation d'AhR, permet la tolérance aux maladies. En effet Bessedé et al. ont décrit qu'une première exposition au lipopolysaccharide bactérien (LPS) induisait la production de l'enzyme TDO et l'activation d'AhR, réduisant l'expression précoce des gènes de l'inflammation. A l'inverse, après un deuxième challenge au LPS, AhR participe à la régulation de l'inflammation sur le long terme lorsque l'enzyme IDO1 est présente et catalyse

la synthèse de Kyn (Bessede et al., 2014). AhR joue également un rôle important dans le contrôle de l'immunité acquise par la modulation de la différenciation des lymphocytes T (LT) ; il a par exemple été montré que l'activation du récepteur par la TCDD inhibait la réponse immunitaire (Funatake et al., 2005). L'activation d'AhR a en effet été associée à la différenciation des LT en Treg FoxP3<sup>+</sup>, impliqués dans la tolérance aux antigènes du soi et aux antigènes non dangereux (Quintana et al., 2008). AhR est également fortement exprimé dans les LT Th17, impliqués dans l'inflammation (en réponse à un pathogène) et dans plusieurs maladies auto-immunes. De nombreux ligands agonistes d'AhR influencent la différenciation en Th17. L'activation d'AhR dans ces cellules immunitaires régule les premières étapes de leur différenciation (Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018). Ainsi, AhR régule la balance de différenciation entre les Treg et les Th17, en faisant un acteur important de la modulation immunitaire. AhR intervient dans de nombreux autres acteurs de l'immunité comme les cellules dendritiques et les lymphocytes Th22, influençant les réponses T. Enfin, il a récemment été démontré qu'AhR participe à la régulation de l'immunité tumorale, rôle qui sera détaillé par la suite.

### c. AhR dans la peau

AhR est un senseur environnemental majeur. La peau étant la première barrière physique contre les agressions de l'environnement, il était logique d'investiguer le rôle d'AhR au niveau cutané. Dans les années 1990, des études précoces d'AhR ont montré son niveau d'expression élevé dans la peau, et ce aussi bien dans les kératinocytes, les mélanocytes ou les cellules immunitaires (Esser et al., 2013). De plus, les ligands exogènes d'AhR peuvent atteindre l'organisme par l'alimentation mais aussi par application topique, et sont donc retrouvés au sein de la peau, rassemblant ainsi toutes les conditions nécessaires à l'activation du récepteur. Le FICZ, ligand endogène dont la synthèse est induite par les UV, est également retrouvé au niveau de la peau où il active AhR (Denison and Faber, 2017).

Comme décrit précédemment, la pigmentation est le principal mécanisme de défense de la peau contre les dommages induits par les UV. Il est depuis longtemps connu que l'activation d'AhR par certains ligands exogènes induit une hyperpigmentation comme pour les patients atteints de la maladie de Yusho ou encore la pigmentation induite par la fumée de cigarette (Nakamura et al., 2013). Luecke et al. ont récemment montré l'implication directe d'AhR dans la régulation de la pigmentation. En effet, une activation du facteur de transcription par la TCDD ou le FICZ induit la synthèse de la mélanine via l'augmentation de l'expression des

gènes *TYR* et *TYRP2* (*DCT*) (Luecke et al., 2010). De plus, des expériences *in vivo* utilisant des souris transgéniques ont démontré que la pigmentation en réponse aux UVB nécessitait l'expression d'AhR par les mélanocytes (Esser et al., 2013). L'implication d'AhR dans le phénomène de pigmentation permet de l'envisager comme cible thérapeutique, par exemple dans le traitement du vitiligo. En plus de son rôle physiologique, AhR est impliqué dans diverses pathologies cutanées comme la chloracnée, développée après intoxication à la TCDD.

D'autres fonctions moins caractérisées sont également attribuées à AhR, notamment dans le développement (Fernandez-Salguero et al., 1996), la régulation du microbiote (Zhang et al., 2017) ou encore le contrôle du cycle cellulaire. Il a également été démontré qu'AhR, par une voie de signalisation non génomique, participe au recyclage de protéines via une activité d'E3-ubiquitine ligase (Ohtake et al., 2007; Wormke et al., 2003). Ainsi, il ne fait aujourd'hui plus aucun doute qu'AhR, de par son implication dans divers processus biologiques, peut être associé à de nombreuses pathologies. Ces dernières années les études se sont particulièrement intéressées à son rôle dans la carcinogenèse.

## 5. AhR, acteur du cancer

Les études à grande échelle de génomes d'échantillons tumoraux n'ont pas permis l'identification d'altérations récurrentes d'AhR pouvant expliquer son rôle dans la cancérogenèse (Figure 26), qui n'est pourtant plus à démontrer. Cela suggère que cette fonction met en jeu d'autres facteurs influant sur son activation. De nombreuses études démontrent ainsi le rôle pro-tumoral mais aussi le rôle protecteur anti-tumoral d'AhR, et ce dans divers modèles de cancers, mais la question est de savoir si les ligands d'AhR peuvent activer la signalisation de façon suffisante pour l'induction de la carcinogenèse. Afin de répondre à cette interrogation, il est nécessaire de quantifier les ligands au sein du microenvironnement tumoral et de déterminer la variabilité de la réponse engendrée en fonction du type de ligand.

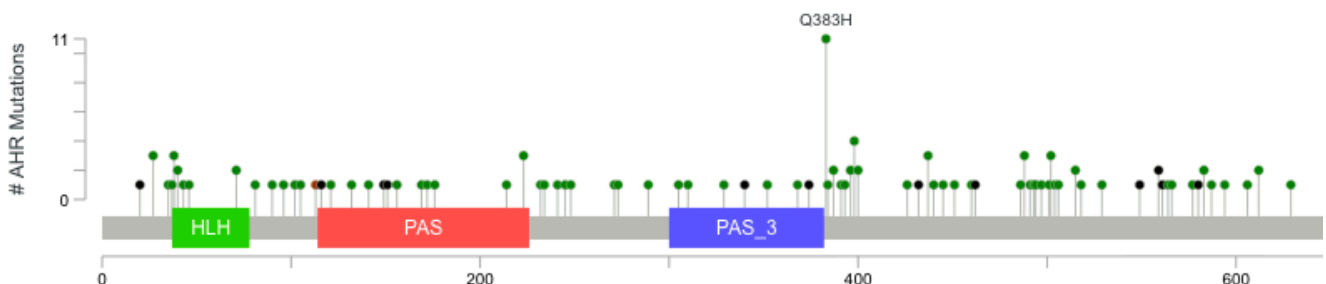


Figure 26 : Mutations d'AhR identifiées dans les tumeurs (cBioPortal, 10967 échantillons provenant de 32 études différentes pan cancer)

### a. Fonctions anti-tumorales protectrices d'AhR

Les premières preuves du rôle protecteur et anti-tumoral d'AhR sont arrivées avec l'établissement des souris génétiquement modifiées et invalidées pour AhR. Ainsi, les souris AhR<sup>-/-</sup> présentent un développement favorisé de tumeurs hépatiques, accompagnées de l'expression de marqueurs prolifératifs et inflammatoires (Fan et al., 2010), ainsi que des tumeurs caecales (Ikuta et al., 2013). D'autres études ont montré le rôle protecteur d'AhR. Par exemple, la délétion de l'expression d'AhR chez les souris transgéniques C57BL/6J TRAMP (TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate) développant des cancers de la prostate, retarde le développement tumoral (Fritz et al., 2006). Jin et al. ont également mis en évidence le rôle anti-tumoral d'AhR : l'omeprazole, agoniste d'AhR, inhibe non seulement le potentiel invasif de lignées cellulaires de cancer du sein et de la prostate *in vitro* mais également le potentiel métastatique *in vivo* (Jin et al., 2014, 2015). Le traitement par l'omeprazole, bien qu'il soit dépendant d'AhR, n'induit pas l'expression de *CYP1A1* ni le recrutement d'ARNT, suggérant un mécanisme d'action non canonique.

Dans le contexte du mélanome, bien qu'AhR ait été largement décrit comme acteur du développement tumoral, certains groupes lui démontrent également un rôle anti-tumoral protecteur. Contador-Troca et al. montrent ainsi dans un modèle murin que l'expression d'AhR inhibe la croissance tumorale et le potentiel métastatique dans des souris de fond génétique WT ou invalidées pour AhR (Contador-Troca et al., 2013). Cette même équipe démontre deux ans plus tard et dans le même modèle de mélanome murin que ce mécanisme anti-tumoral implique la régulation par AhR de l'aldéhyde déshydrogénase 1 de type H1 (*ALDH1A1*), associée à l'initiation tumorale. Ainsi, l'invalidation de l'*Aldh1a1* chez la souris compense l'effet pro-tumoral de la perte d'expression d'AhR (Contador-Troca et al., 2015). Le leflunomide, utilisé comme immunosuppresseur dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde (Fox et al., 1999), est également un activateur d'AhR permettant d'inhiber (partiellement *via* AhR) *in vitro* la prolifération de la lignée cellulaire de mélanome humain A375 (O'Donnell et al., 2010, 2012).

### b. Rôle pro-tumoral d'AhR

Bien que certaines études utilisant des souris génétiquement modifiées et invalidées pour AhR semblent prouver son rôle protecteur et anti-tumoral, AhR est également largement décrit pour l'effet inverse, à savoir pro-tumoral, et ce dans de nombreux modèles. En effet, dans plusieurs modèles comme le cancer du sein, du foie, de la prostate ou du poumon, des analyses par immunohistochimie ont montré une expression accrue du récepteur dans les tumeurs en

comparaison au tissu sain environnant (Murray et al., 2014). Néanmoins, la présence potentielle d'un ligand activateur endogène ou exogène apparaît comme l'hypothèse la plus prometteuse, car si l'impact du niveau d'expression d'AhR sur la carcinogenèse reste controversé, son activation par un ligand agoniste semble elle délétère et pro-tumorale.

Il est en effet établi depuis longtemps que de nombreux ligands d'AhR comme les dioxines, HAH et HAP, sont carcinogènes pour l'homme (IARC). Par exemple, une intoxication à la TCDD, agoniste d'AhR, promeut l'initiation tumorale hépatique en créant un contexte inflammatoire. Afin de déterminer les conséquences de l'activation d'AhR, des souris génétiquement modifiées ont été générées, exprimant une forme tronquée et constitutivement active de la protéine. Cette protéine est délétée entre les acides aminés 288 et 421, soit la région du domaine PAS-B nécessaire pour l'interaction avec la protéine chaperonne Hsp90 et pour la fixation des ligands. Il a été observé chez ces souris que l'activation constitutive d'AhR (ligand-indépendante) facilitait le développement de tumeurs hépatiques et gastriques (Andersson et al., 2002; McGuire et al., 2001). De nombreuses études démontrent l'effet pro-tumoral de l'activation « constitutive » d'AhR, sûrement induite par des ligands endogènes présents au sein du microenvironnement tumoral, notamment dans le cancer du poumon (Duan et al., 2018), dans le cancer du sein Her2+ (Novikov et al., 2016) ou encore du glioblastome (Gramatzki et al., 2009).

Afin d'influencer le développement tumoral, AhR peut moduler les processus invasifs. Par exemple, la répression transcriptionnelle d'AhR dans des lignées cellulaires de cancer du sein induit l'expression du gène *CDHI*, codant pour l'E-cadhérine. *In vivo*, cette répression de l'expression d'AhR réduit le potentiel métastatique dans un modèle de zebrafish. A l'inverse, l'expression d'AhR corrèle avec une signature génétique d'invasion (Narasimhan et al., 2018). Plusieurs autres études démontrent également l'implication d'AhR dans le processus d'EMT (Duan et al., 2018). AhR est donc un acteur de la progression tumorale par la régulation de plusieurs mécanismes comme la prolifération cellulaire, et donc la croissance tumorale, mais aussi la transition épithélio-mésenchymateuse et la régulation des gènes impliqués dans l'invasion, et donc le potentiel invasif et métastatique des cellules cancéreuses. Cependant, il reste à expliquer comment AhR est activé et par quel ligand.

Une des hypothèses pouvant expliquer l'activation constitutive d'AhR dans certains cancers est que les cellules immunitaires, notamment les cellules présentatrices d'antigènes, produisent des ligands d'AhR *via* l'expression d'IDO1 et TDO1, facilitée dans un contexte inflammatoire. Ces enzymes, pouvant également être exprimées dans les cellules tumorales, entraînent la production de Kyn (Figure 27). Opitz et al. ont démontré que la production de Kyn



induisait l'activation d'AhR dans les cellules de glioblastome, associée à un mauvais pronostic (Opitz et al., 2011). Dans le mélanome, l'activation d'AhR par IDO *via* la Kyn participe à l'échappement immunitaire des cellules tumorales : l'IFN- $\gamma$  sécrété par le système immunitaire induit dans les cellules souches cancéreuses (CSC) un état de dormance cellulaire immunologique (arrêt du cycle cellulaire), contrôlé par une voie de signalisation IDO-Kyn-AhR (Liu et al., 2017). Ces cellules tumorales dormantes vont échapper à la surveillance du système immunitaire et seront donc en partie responsables des rechutes, d'où l'intérêt de considérer la modulation d'AhR comme cible thérapeutique. Cependant, les inhibiteurs d'IDO testés en essai clinique n'entraînant pas d'amélioration de la survie des patients (Yentz and Smith, 2018), le ciblage direct du récepteur par une molécule antagoniste semble donc plus prometteur.

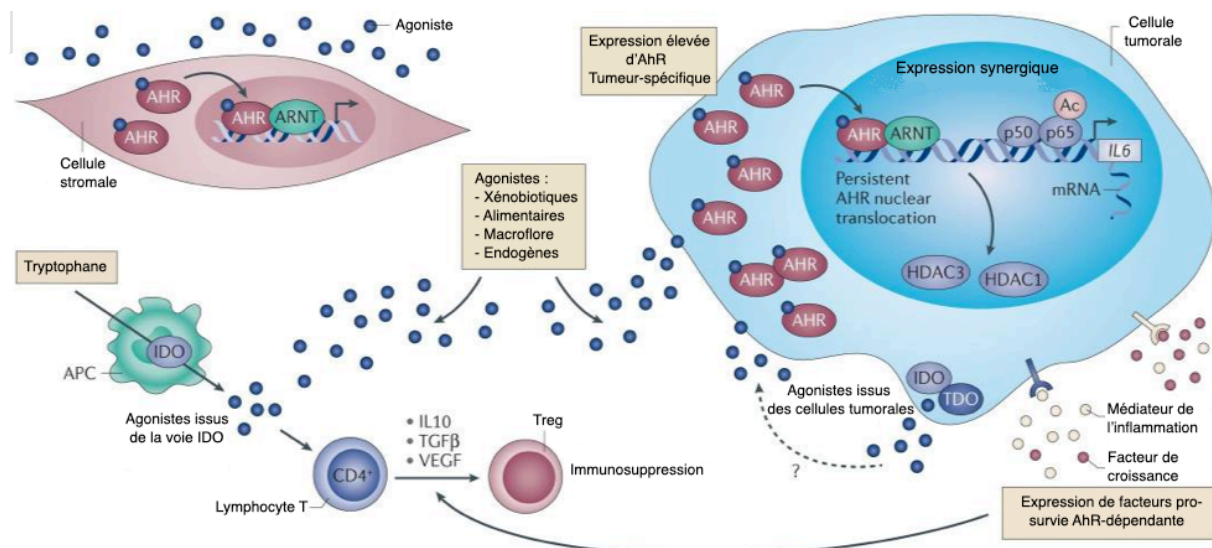


Figure 27 : Rôle pro-tumoral d'AhR et origine des ligands activateurs

D'autres travaux montrent le rôle pro-tumoral d'AhR dans le mélanome : dans une lignée cellulaire de mélanome humain (A2058), l'exposition à la TCDD induit l'expression de plusieurs métalloprotéinases matricielles (MMPs) de façon dépendante d'AhR (Villano et al., 2006). L'activation de ces MMPs, impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, facilite l'invasion des cellules tumorales. L'activation d'AhR par des molécules environnementales pourrait donc influencer la progression et la dissémination des cellules de mélanome.

Ainsi, si AhR est aujourd'hui considéré comme une cible thérapeutique hautement intéressante, son activité doit être modulée avec précaution. En effet, comme décrit précédemment, les effets induits par l'activation ou l'inhibition d'AhR sont extrêmement dépendant du contexte (type de cancer, modèle d'étude, concentrations des ligands agonistes ou antagonistes) et la modulation de cette activité pourra donc agir sur le développement tumoral dans les deux sens.

### c. Développement et utilisation thérapeutique des antagonistes d'AhR

L'implication d'AhR dans les processus de développement tumoraux est dorénavant bien établie, et ce dans divers modèles de cancers. L'activation d'AhR semble dans la majeure partie des études pro-tumorale, et bien que les acteurs de l'activation d'AhR ne soient pas toujours identifiés, l'utilisation thérapeutique d'antagonistes d'AhR pouvant moduler cette activation constitutive s'est donc développée. Peu de molécules ciblant AhR ont été testées en clinique parmi lesquelles le laquinimod, un immunomodulateur prescrit pour le traitement de la sclérose en plaques. Le laquinimod est un agoniste d'AhR, induisant l'expression de *CYP1A1*, *CYP1B1* et *AhRR* dans les tissus cérébraux murins (Birnberg et al., 2017). L'aminoflavone, flavonoïde antagoniste d'AhR, a en premier lieu été validée *in vitro* et *in vivo* pour ses effets dans le cancer du sein, où comme décrit précédemment AhR contribue au développement tumoral (Loaiza-Pérez et al., 2004), avant d'être approuvé pour un essai clinique

Bien que peu de molécules modulatrices d'AhR soient de nos jours arrivées en phase clinique, de nombreuses études exposent leurs bénéfices. Les flavonoïdes, antagonistes naturels d'AhR, ont également été testés pour leurs effets sur la cancérogenèse, et notamment dans le mélanome, comme le resvératrol ou l'apigénine qui réduisent la progression tumorale *in vivo* (Niedzwiecki et al., 2016; Pal et al., 2016).

Plus récemment, AhR a été impliqué dans les résistances aux thérapies ciblées. Dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC), une forte expression d'AhR corrèle à un mauvais pronostic. De plus dans les lignées avec un niveau endogène d'AhR élevé, l'inhibition d'AhR sensibilise les cellules aux inhibiteurs de tyrosine kinase spécifiques d'EGFR (EGFR TKi) (Ye et al., 2018). En 2012, Barretina et al. créent la « Cancer Cell Line Encyclopedia » (CCLE), qui regroupe les données d'expression de 947 lignées cellulaires cancéreuses humaines (parmi lesquelles 57 sont des lignées de mélanome) ainsi que leur sensibilité

respective à 24 thérapies anticancéreuses (Barretina et al., 2012). Dans les lignées cellulaires de mélanome mutées *NRAS*, l'expression d'AhR est corrélée à la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de MEK. Dans les lignées exprimant fortement AhR, une répression de son expression réduit la prolifération, suggérant une dépendance de ces lignées pour le récepteur. De plus, ce travail met en évidence les propriétés antagonistes d'AhR de plusieurs inhibiteurs de MEK dans ces mêmes lignées cellulaires, capables de diminuer l'expression de *CYP1A1*. Les auteurs concluent donc que dans un contexte de mélanome muté *NRAS*, l'activation de la voie des MAPK pourrait agir en parallèle d'une dépendance des cellules à AhR, processus ciblés par les MEKi. Ainsi, le niveau d'expression d'AhR dans ces lignées pourrait être un marqueur de sensibilité aux MEKi.

# OBJECTIFS DE THÈSE

Malgré l'essor thérapeutique ayant révolutionné la prise en charge des patients atteints de mélanome métastatique, le développement des mécanismes de résistance limite l'efficacité thérapeutique de ces nouvelles molécules. C'est notamment le cas des inhibiteurs de la voie des MAPK : les inhibiteurs de BRAF (BRAFi) associés aux inhibiteurs de MEK (MEKi). La plasticité importante des cellules de mélanome, capable de passer d'un phénotype prolifératif/sensible à un phénotype invasif/résistant, contribue fortement à l'établissement des résistances. L'identification de facteurs de transcriptions capables de contrôler le passage d'un phénotype à l'autre représente donc un enjeu majeur pour diminuer dans un premier temps l'agressivité du mélanome mais également prévenir l'émergence des cellules résistantes.

Le projet de l'équipe de recherche s'intéresse à l'identification et à la caractérisation des mécanismes moléculaires ainsi qu'à la régulation de l'expression transcriptomique intervenant lors du développement des mécanismes de résistances aux thérapies ciblées du mélanome, associés au passage d'un phénotype tumoral prolifératif sensible à un phénotype invasif et résistant. C'est dans cette perspective qu'au cours de ma thèse, je me suis intéressée au facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) dans le mélanome et plus particulièrement à son rôle dans le contrôle de l'expression transcriptomique et du switch phénotypique intervenant lors l'acquisition de la résistance aux BRAFi. Les résultats obtenus au niveau moléculaire nous ont permis d'identifier AhR comme une nouvelle cible thérapeutique en complément des thérapies ciblées existantes pour augmenter la sensibilité, empêcher les mécanismes de résistances (invasion, dédifférenciation) et donc potentiellement prolonger la survie des patients. Les différents résultats obtenus m'ont ainsi permis de répondre aux questions suivantes :

## AhR est-il impliqué dans la sensibilité ou la résistance aux inhibiteurs de BRAF ?

Le premier objectif de ma thèse était d'évaluer le rôle du facteur de transcription AhR dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de BRAF. L'objectif était dans un premier temps de déterminer si les inhibiteurs de BRAF couramment utilisés en clinique pouvait se lier à notre facteur de transcription d'intérêt. Après avoir déterminé que les BRAFi représentaient en effet une nouvelle classe de ligands d'AhR, et n'étaient donc pas uniquement spécifiques de

la kinase BRAF<sup>V600E</sup>, la suite de mon projet consistait à déterminer si l'activité d'AhR pouvait être associée à la sensibilité ou la résistance aux inhibiteurs de BRAF. Ce travail, qui a fait l'objet d'une publication dans la revue Nature Communication, est présenté en **Résultats I**.

### AhR participe-t-il au switch phénotypique observé lors de l'acquisition de la résistance ?

Après avoir impliqué AhR dans la régulation de gènes associés à la résistance aux BRAFi, nous avons voulu impliquer ce facteur de transcription plus précisément dans la dédifférenciation cellulaire et le phénotype invasif des cellules de mélanome, caractéristiques de l'état de résistance aux BRAFi. En plus du rôle d'AhR pour favoriser un phénotype indifférencié et invasif, nous avons pu déterminer qu'une balance d'expression existait entre AhR et le facteur de transcription MITF, facteur majeur du mélanome associé à la sensibilité des cellules tumorales aux BRAFi. Les deux facteurs MITF et AhR, en balance, participent ainsi respectivement à l'acquisition d'un phénotype sensible/prolifératif ou d'un phénotype résistant/invasif. Ces résultats sont présentés en **Résultats II**.

### AhR constitue-t-il une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du mélanome ?

Les travaux précédents nous ont naturellement conduits à évaluer le potentiel thérapeutique des antagonistes d'AhR en combinaison avec les BRAFi. Nous avons donc sélectionné un panel de flavonoïdes, antagonistes naturels d'AhR, afin de déterminer leurs capacités à retarder le développement des mécanismes de résistance. Certains de ces flavonoïdes, comme l'apigénine, sont ainsi capables de prévenir l'activation d'AhR associée à la dédifférenciation cellulaire et la résistance aux BRAFi et potentialisent ainsi l'effet thérapeutique des inhibiteurs de la voie des MAPK. Ces résultats sont présentés en **Résultats III**.

# RÉSULTATS



# RÉSULTATS

## I – L'activation chronique du facteur de transcription AhR participe à l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome

**Nina Tardif\***, Sébastien Corre\*, Nicolas Mouchet, Héloïse M. Leclair, Lise Boussemart, Arthur Gautron, Laura Bachelot, Anthony Perrot, Anatoly Soshilov, Aljosja Rogiers, Florian Rambow, Erwan Dumontet, Karin Tarte, Alban Bessede, Gilles J. Guillemin, Jean-Christophe Marine, Michael S. Denison, David Gilot & Marie-Dominique Galibert

Article publié dans la revue *Nature Communication* (Novembre 2018)

La kinase BRAF, acteur de la voie des MAPK impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire, est retrouvée mutée au niveau de la Valine 600 (BRAF<sup>V600E</sup>) chez plus de 50% des patients atteints de mélanome métastatique. L'identification de cette mutation a permis le développement de thérapies ciblées : les inhibiteurs de BRAF (BRAFi), ciblant spécifiquement la kinase mutée BRAF<sup>V600E</sup>. Si les BRAFi ont révolutionné la médecine personnalisée, leur utilisation est associée à un problème de taille : le développement de mécanismes de résistance acquise aux traitements, limitant leur efficacité thérapeutique.

Il est aujourd'hui établi que l'hétérogénéité intra-tumorale et la plasticité des cellules de mélanome, capable de reprogrammer leur transcriptome afin de s'adapter au traitement, participe grandement à l'apparition de ces résistances *via* l'émergence d'une petite proportion de cellules résistantes. Cependant, aucune molécule ne permet aujourd'hui d'empêcher l'apparition des résistances et l'identification de facteurs de transcriptions clés, potentielles cibles thérapeutiques, reste un enjeu majeur. Nous nous sommes ici intéressés au rôle du facteur de transcription AhR dans l'établissement de la résistance pendant le traitement par les BRAFi.

Dans un premier temps, nous avons grâce à des expériences de compétition ainsi que de modélisation d'interaction entre le domaine PAS-B d'AhR (domaine d'interaction avec les ligands) et les BRAFi ou des ligands déjà identifié d'AhR, pu identifier les BRAFi comme une nouvelle classe de ligands du facteur de transcription AhR. Ainsi, contrairement aux ligands canoniques se fixant au niveau d'une poche appelée poche  $\alpha$ , les BRAFi se fixe à une position



différente, au niveau d'une poche  $\beta$ . Les BRAFi ne sont donc pas exclusivement spécifiques de la kinase mutée BRAF<sup>V600E</sup> mais se fixent également à AhR.

Nous avons ensuite pu déterminer que si la liaison des BRAFi sur la poche  $\beta$  d'AhR favorisait un programme transcriptionnel associé à l'activité de MITF et donc à la sensibilité, l'activation canonique d'AhR par ses ligands agonistes se fixant au niveau de la poche  $\alpha$  entraînait l'expression d'un programme transcriptomique associé à la résistance. Cette activation canonique d'AhR, retrouvée dans une faible proportion de cellules tumorale avant traitement, favorise la dédifférenciation cellulaire et l'acquisition d'un phénotype invasif, conduisant à la résistance au traitement et à la rechute des patients.

Enfin, nous avons évalué le potentiel thérapeutique de ce facteur de transcription et sa capacité à retarder l'apparition des mécanismes de résistance lors du traitement par les BRAFi. Nous avons réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr. Jean-Christophe Marine une expérience *in vivo* de Patient Derived Xenograft (PDX) où les souris ont été traitées par les BRAFi+MEKi en combinaison ou non avec le resveratrol (Res), antagoniste naturel d'AhR. L'utilisation thérapeutique du Res permet de diminuer significativement le volume tumoral et retarde donc le développement des mécanismes de résistance et les rechutes.

Ainsi, l'activation chronique d'AhR dans une petite proportion des cellules tumorales induit dans ces cellules l'expression de gènes participant à la dédifférenciation cellulaire et à l'acquisition d'un phénotype invasif, entraînant la survie de ces cellules et leur émergence progressive au cours du traitement. Ces cellules permettent donc l'installation de la résistance et la rechute des patients.

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-018-06951-2

OPEN

# Sustained activation of the Aryl hydrocarbon Receptor transcription factor promotes resistance to BRAF-inhibitors in melanoma

Sébastien Corre<sup>1</sup>, Nina Tardif<sup>1</sup>, Nicolas Mouchet<sup>1</sup>, Héloïse M. Leclair<sup>1</sup>, Lise Boussemart<sup>1,2</sup>, Arthur Gautron<sup>1</sup>, Laura Bachelot<sup>1</sup>, Anthony Perrot<sup>1</sup>, Anatoly Soshilov<sup>3</sup>, Aljosja Rogiers<sup>4,5</sup>, Florian Rambow<sup>4,5</sup>, Erwan Dumontet<sup>6</sup>, Karin Tarte<sup>6</sup>, Alban Bessede<sup>7</sup>, Gilles J. Guillemin<sup>8</sup>, Jean-Christophe Marine<sup>4,5</sup>, Michael S. Denison<sup>3</sup>, David Gilot<sup>1</sup> & Marie-Dominique Galibert<sup>1,9</sup>

BRAF inhibitors target the BRAF-V600E/K mutated kinase, the driver mutation found in 50% of cutaneous melanoma. They give unprecedented anti-tumor responses but acquisition of resistance ultimately limits their clinical benefit. The master regulators driving the expression of resistance-genes remain poorly understood. Here, we demonstrate that the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) transcription factor is constitutively activated in a subset of melanoma cells, promoting the dedifferentiation of melanoma cells and the expression of BRAFi-resistance genes. Typically, under BRAFi pressure, death of BRAFi-sensitive cells leads to an enrichment of a small subpopulation of AhR-activated and BRAFi-persister cells, responsible for relapse. Also, differentiated and BRAFi-sensitive cells can be redirected towards an AhR-dependent resistant program using AhR agonists. We thus identify Resveratrol, a clinically compatible AhR-antagonist that abrogates deleterious AhR sustained-activation. Combined with BRAFi, Resveratrol reduces the number of BRAFi-resistant cells and delays tumor growth. We thus propose AhR-impairment as a strategy to overcome melanoma resistance.

<sup>1</sup>IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes)—UMR6290, CNRS, Univ Rennes, F-35000 Rennes, France. <sup>2</sup>Department of Dermatology, Hospital University of Rennes (CHU Rennes), F-35000 Rennes, France. <sup>3</sup>Department of Environmental Toxicology, University of California, Meyer Hall, Davis, CA 95616, USA. <sup>4</sup>Laboratory for Molecular Cancer Biology, VIB Center for Cancer Biology, VIB, Leuven 3000, Belgium. <sup>5</sup>Laboratory for Molecular Cancer Biology, Department of Oncology, KU Leuven, Leuven 3000, Belgium. <sup>6</sup>MICMAC (Microenvironment, Cell differentiation, Immunology And Cancer)—UMR\_S 1236, Inserm, Univ Rennes, F-35000 Rennes, France. <sup>7</sup>ImmuSmol, Pessac F-33600, France. <sup>8</sup>Neuroinflammation Group, MND and Neurodegenerative Diseases Research Center, Macquarie University, Sydney, NSW 2109, Australia. <sup>9</sup>Department of Molecular Genetics and Genomics, Hospital University of Rennes (CHU Rennes), F-35000 Rennes, France. These authors contributed equally: Sébastien Corre, Nina Tardif. These authors jointly supervised this work: Sébastien Corre, David Gilot, Marie-Dominique Galibert. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.C. (email: [sebastien.corre@univ-rennes1.fr](mailto:sebastien.corre@univ-rennes1.fr)) or to D.G. (email: [david.gilot@univ-rennes1.fr](mailto:david.gilot@univ-rennes1.fr)) or to M.-D.G. (email: [mgaliber@univ-rennes1.fr](mailto:mgaliber@univ-rennes1.fr))

**B**RAF inhibitors (BRAFi) target selectively the BRAF V600E/K genetic alteration found in several cancers. Cutaneous melanoma, the most aggressive form of skin cancer, harbor the highest incidence of this mutation (50%)<sup>1,2</sup>. Development of BRAFi in melanoma has thus served as a model for their implementation, revolutionizing personalized medicine. They give an impressive but transient response since resistance ultimately limits their clinical benefit<sup>3–6</sup>. The efficacy of BRAFi is indeed limited by intrinsic/primary mechanisms and/or acquired/secondary resistances<sup>7</sup>. Besides these well describe genomic alterations that mainly promote the reactivation of the MAPK and/or the PI3K-signaling, activation of BRAFi-resistant gene (AXL, EGFR...) constitutes an additional hallmark of resistance<sup>8,9</sup>. Importantly, it has recently been shown that acquisition of these BRAFi resistance programs arise in a subset of melanoma cells and is associated with a dedifferentiated status of the melanoma cells<sup>10,11</sup>. Together, this increases the complexity and fosters the identification of the master regulators driving the expression of these resistance-genes that remain still unknown<sup>12–17</sup>. Here, we mainly focus on the potential role of AhR transcription factor in resistance mechanisms occurring during melanoma treatment by BRAFi.

The Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) is a ligand-dependent transcription factor of the basic-helix-loop-helix (bHLH) Per-Arnt-Sim (PAS) family. Exogenous and endogenous binding-ligands, such as TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) and FICZ (5,11-dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6-carboxaldehyde), respectively<sup>18</sup>, promote AhR translocation into the nucleus. In the nucleus, AhR dimerizes with the AhR nuclear translocator (ARNT), forming a DNA binding complex that binds and activates the transcription of target genes that harbor xenobiotic responsive elements (XREs). AhR agonists thereby induce the expression of, among others, the drug-metabolizing cytochrome P-450 (CYP) enzymes *CYP1A1*, *CYP1B1*, and *TIPARP*<sup>19</sup>. *CYP1A1* is commonly considered a prototypical AhR target<sup>20</sup>. Increasing evidence indicates that besides its roles in detoxification, AhR is involved in many physiological processes<sup>21,22</sup>, diseases, and cancers<sup>23</sup>.

In this study, we established an important role of AhR transcription factor in controlling sensitivity or resistance to BRAFi in melanoma. In tumor cells, BRAFi constitute new AhR ligands promoting melanoma sensitivity while a small subpopulation of cells has a high canonical AhR activity that is responsible for resistance acquiring and relapse. We also demonstrated that AhR constitutes a therapeutic target to delay relapse during the treatment of melanoma by BRAFi and thus merits to be tested in human. Together, this study contributes to the understanding of the molecular mechanisms driving BRAFi resistance and relapse, and proposes a therapeutic combination to overcome these deleterious effects.

## Results

**BRAFi as new AhR ligands controlling its transcriptional activity.** We observed that the BRAFi Vemurafenib (Vem) binds directly to AhR and stimulates its nuclear translocation (Fig. 1a, b). However, surprisingly, in contrast to TCDD (Fig. 1d), Vem failed to stimulate the canonical AhR/ARNT-XRE pathway after dimerization with ARNT (Fig. 1c). Consequently, Vem failed to induce endogenous *CYP1A1* expression (Fig. 1e) and CYP1A enzymatic activity (EROD) as observed with TCDD (Fig. 1f). These results indicated that Vem binds to AhR differently than canonical AhR ligands. Consistently, docking experiments have demonstrated that Vem and the canonical AhR ligand/agonist TCDD interact with AhR at different positions (Fig. 1g). The Vem and canonical AhR

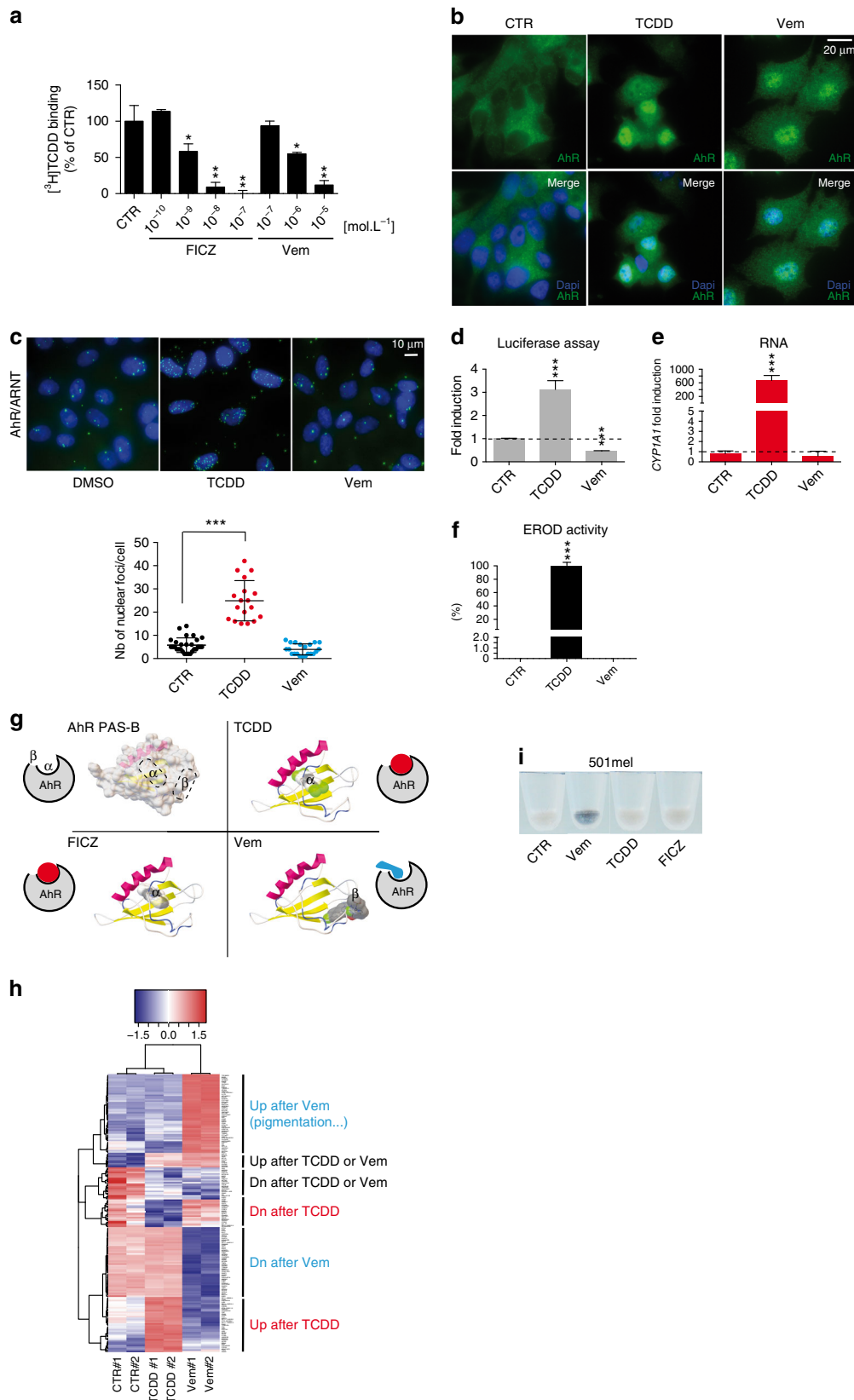
ligand binding positions will be hereafter referred as the  $\beta$ - and  $\alpha$ -pockets, respectively.

Importantly, non-canonical binding to AhR was observed with other BRAFi, including Dabrafenib (Dab) (Supplementary Figure 1), indicating that this is not a specific property of Vem only but rather of this chemically related family of molecules<sup>24</sup>. To investigate the molecular consequences of BRAFi-recruitment on AhR, we established the transcriptomes of BRAF-V600E melanoma cells (501Mel) exposed to Vem and to TCDD. Interestingly, specific and mutually exclusive signatures were identified (Fig. 1h). Consistent with the ability of Vem to increase pigmentation in cultured melanoma cells (Fig. 1i) and, in some patients' nevi (Supplementary Figure 2a), the Vem-induced signature was enriched in MITF-targets and in pigmentation genes (Fig. 1h)<sup>25,26</sup>. This signature, which significantly overlaps with the classical melanoma proliferative signature<sup>14,15</sup>, was only observed with  $\beta$ -pocket ligands (Vem, Dab) and not with  $\alpha$ -pocket ligands such as TCDD and Benzo(a)pyrene.

The pigmentation gene *Oculocutaneous Albinism Type II* (*OCA2*)<sup>27</sup> was particularly induced in Vem-exposed cells, and its level of expression was selected as a readout for AhR  $\beta$ -activation (Supplementary Figure 2a)<sup>28</sup>. Critically, genetic and chemical inhibition of AhR abrogated Vem-induced *OCA2* expression and subsequent induction of pigmentation (Supplementary Figure 2c–e). As anticipated from data reported in Fig. 1, ARNT was not required for Vem-induced *OCA2* expression, while ARNT depletion impaired TCDD-induced *CYP1A1* expression (Supplementary Figure 2h). Since off-target effects of Vem have been so far attributed to the paradoxical activation of the MAP Kinase pathway<sup>24</sup>, we investigated the role of the MAPK pathway in the Vem-induced  $\beta$ -signature. We showed that the Vem-induced  $\beta$ -signature is independent of the phosphorylated status of ERK (Supplementary Figure 3) and is maintained in the presence of MEKi (Supplementary Figure 4a–c). Thus, the Vem-induced  $\beta$ -signature cannot be ascribed to BRAFi-induced paradoxical MAPK activation.

Due to the relative proximity between the  $\alpha$ - and  $\beta$ -pockets, we hypothesized that ligands targeting the  $\alpha$ -pocket could prevent the effect of molecules binding the  $\beta$ -pockets such as Vem. To illustrate this point, cells were exposed to an AhR-agonist or -antagonist (TCDD and CH-223191, respectively) that targeted the  $\alpha$ -pocket, prior to Vem treatment. As envisaged, the occupancy of the  $\alpha$ -pocket by either an AhR agonist or antagonist prevented Vem-associated effects (Supplementary Figure 4d–g). Reciprocally, Vem prevented the binding of TCDD in the  $\alpha$ -pocket, demonstrating that Vem acts as an AhR antagonist (Supplementary Figure 4f). We further illustrated this latter capability by quantifying the AhR-ARNT/XRE complex formation that was reduced in the presence of Vem (Supplementary Figure 4g).

**AhR directs dedifferentiation and resistance to BRAFi.** The sensitivity of melanoma cells to BRAFi is associated with cellular differentiation state (i.e., MITF<sup>high</sup> or pigmentation signature)<sup>11,25,26</sup>. Considering AhR-activation modulates the pigmentation program in melanoma cells, we investigated whether the AhR gene expression program is connected to BRAFi resistance<sup>3–6</sup>. We measured the transcriptional activity of both AhR canonical and non-canonical in melanoma cell lines from the “Cancer Cell Line Encyclopedia” (CCLE)<sup>29</sup>, using representative 14 and 19 genes of the  $\beta$ - and  $\alpha$ -signatures, respectively, and 16 genes from the BRAFi-resistance signature<sup>13–16,25,30</sup>. Whereas the  $\beta$ -signature was highly represented in the proliferative and BRAFi-sensitive cell lines, the  $\alpha$ -signature was most prominent in BRAFi-resistant lines (Fig. 2a) and co-occurred with the resistance signature



(Fig. 2b)<sup>15,29</sup>. In accordance with the recent classification of melanoma cells based on their differentiation states (melanocytic, M; transitory, T; neural crest-like, N; and undifferentiated cells, U), we confirmed that BRAFi-resistant cells are mostly dedifferentiated<sup>10</sup>. Moreover, the resistance-signature significantly

overlapped with the invasive gene expression signature<sup>15</sup> and dedifferentiated cell state (Fig. 2c)<sup>10,15,16,30,31</sup>.

To challenge these observations, we first re-analyzed the recently published Graeber's melanoma data sets<sup>10</sup> using their online webtool characterizing melanoma subtypes (M, T, N, or U)

**Fig. 1** BRAF-V600E inhibitor Vemurafenib binds to AhR and antagonizes the canonical AhR signaling pathway. **a** Competitive binding of FICZ or Vemurafenib (Vem) to AhR. Hepatic cytosol containing AhR was incubated with [<sup>3</sup>H]TCDD in the presence of DMSO (1%) or increasing concentrations of FICZ ( $10^{-10}$ – $10^{-7}$  mol/L<sup>-1</sup>) and Vem (PLX4032,  $10^{-7}$ – $10^{-5}$  mol/L<sup>-1</sup>). **b** AhR nuclear translocation in response to Vem (1 μM) or TCDD (10 nM) in MCF-7 cells. AhR in green (IHC) and nucleus staining in blue. **c** AhR does not dimerize with ARNT in response to Vem (1 μM), in contrast to TCDD (10 nM), in MCF-7 cells. AhR-ARNT interaction was quantified by Proximity Ligation Assay. Hoechst-stained nucleus in blue ( $n = 4$ ). **d–f** Vem does not activate the canonical transcriptional AhR response, in contrast to TCDD. **d** Evaluation of AhR transcriptional activity related to AhR/ARNT binding sites (XRE) using p3XRE-luciferase constructs. MCF-7 cells were exposed to 10 nM TCDD or 1 μM Vem or vehicle (DMSO) for 6 h. **e** Vem does not induce *CYP1A1* mRNA, in contrast to TCDD. MCF-7 cells were incubated in the absence or presence of 10 nM TCDD or 1 μM Vem for 15 h. **f** Vem does not induce EROD activity in contrast to TCDD. MCF-7 cells were either untreated or treated with 10 nM TCDD or 1 μM Vem for 6 h. **g** Proposed binding mode of TCDD, FICZ, and Vemurafenib (Vem) into the AhR PAS-B ligand binding domain homology model. Free binding energy is reported in Supplementary Table 1. The two predictive ligand binding pockets are indicated by (α) or (β). **h** Gene expression profile of the 501Mel cells exposed to vehicle, Vem (1 μM) or TCDD (10 nM) ( $n = 2$ ) for 48 h. Heatmap focused on differentially expressed genes in function of treatment (fold change). **i** Vem induces pigmentation in vitro. Picture of 501Mel cell pellets treated with Vem (1 μM) or canonical AhR agonists TCDD (10 nM) or FICZ (1 μM) for 48 h. Data correspond to the mean ± s.d. of three independent experiments. Statistical analysis was performed using an unpaired *t*-test (PRISM6.0<sup>®</sup>) \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

(Fig. 2d) and showed that the β-signature decorates differentiated melanoma (M or T) cells (Fig. 2e) while the α- (Fig. 2f) and resistance signatures (Fig. 2g) are associated with dedifferentiated cell states (N and U). Second, using an additional set of melanoma cells lines that include three pairs of BRAFi sensitive/resistant cells (S and R), we demonstrated that acquisition of BRAFi resistance correlates with an increase in the α- and resistance signatures as well as a concomitant decrease in the β-signature (Fig. 2h). Together these results, suggest that AhR endorses this β- to α-signature shift. Interestingly, BRAFi/MEKi double blockade led to similar β- to α-reprogramming (Supplementary Figure 5)<sup>32</sup>.

**AhR signatures classify patients' tumors.** Having established that AhR-signatures discriminate cell differentiation states and sensitivity/resistance to BRAFi, we explored these AhR signatures in melanoma samples. We first examined melanoma samples from the TCGA cohort<sup>29</sup>. Interestingly, we found that melanoma samples, naive of BRAFi treatment, segregated according to the α- and β- signatures (Fig. 3a). Almost 9% of these clinical biopsies showed a marked expression of the β-signature and 8% the α- and resistance-signatures in bulk analyses, thereby supporting the notion that the nature of the patient's response to BRAFi and time before relapse may be in part predefined (Fig. 3b). Again, we found that in these melanoma samples, the β-signature decorated differentiated melanoma samples (M and T) and the α- and resistance-signature undifferentiated ones (N and U) (Fig. 3d–f).

Second, we investigated the β- to α-signature shift in patients exposed to single or double drug-blockade (BRAFi or BRAFi + MEKi) by classifying their melanoma biopsies during the medication course (before, during, and at relapse) according to differentiated states (U, N, T, M) (Fig. 3g) and AhR-associated signatures (β-, α-, and resistance) (Fig. 3h). As anticipated from former TCGA results and recent studies, melanoma samples naive of any treatment (CTR) are characterized by an elevated intra- and inter-tumoral heterogeneity in terms of differentiation states and AhR signatures (Fig. 3g, h). For example, tumor no. 17 illustrates a melanocytic subtype (about 26% in the TCGA cohort) whereas tumor no. 9 a transitory subtype (about 63% in the TCGA cohort). Now, when exposed to drugs (BRAFi alone or BRAFi/MEKi) and according to the initial differentiation state, we observe either a strong β-signature (P1: Pt –17 –19 –2) followed by a switch to the α-signature (P2) or an immediate α-switch (P1: Pt –15 –9 122 –8). This immediate α-switch occurs for marked β-signature tumors (Fig. 3h). Again, the appearance of the α-signature co-occurred with the resistance signature and dedifferentiation process (Fig. 3i), as observed in melanoma cell lines

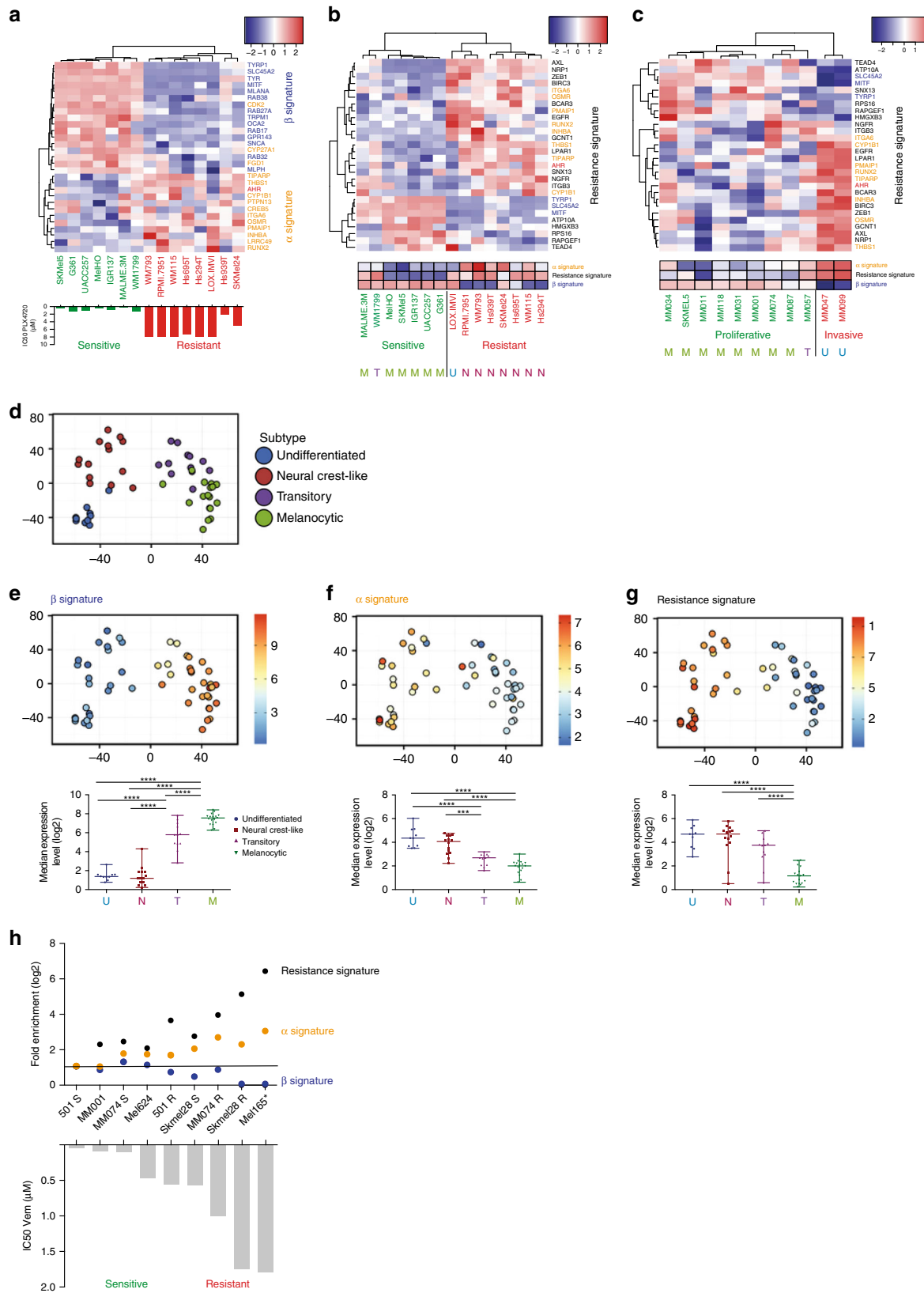
(Fig. 2e–h), supporting these AhR-dependent activation programs.

**AhR controls BRAFi resistance in melanoma persister cells.** It is noteworthy that the T, N, and U emerging subtypes arise within tumors in the presence of BRAFi (dotted line in Fig. 3i), suggesting that either the protective capacity of BRAFi in maintaining cells in a melanocytic state is overcome or that small and almost undetectable, but initially present, T, N, and U subpopulations emerge while melanocytic and BRAFi-sensitive populations diminish<sup>10,11</sup>. To characterize these subpopulations further, we investigated publicly available single-cell analyses that were more informative than bulk analyses<sup>33</sup> (Fig. 4a). As anticipated, only a small subpopulation of melanoma cells expressed a combination of BRAFi-resistance markers (EGFR, ZEB1...) and an α-signature. These cells (10%) are representative of N or U states (Fig. 4b, c). Now examining, cell-sorted EGFR-positive cells that are able to form colonies in the presence of a BRAFi<sup>16</sup> (Fig. 4d), we found that this minor subpopulation corresponds to dedifferentiated states of melanoma (N or U) expressing α- and resistant signatures (Fig. 4c–e). In contrast, the EGFR-negative cells exhibited a β-signature (M or T).

Together, these data suggest that BRAFi-resistant cells represent an innate/intrinsic small subpopulation of α-cells, generally undetectable through bulk analyses. These resistant cells become predominant in drug-resistant lesions/cultures upon drug-exposure probably due to cell death of sensitive β-cells (Fig. 5a)<sup>16</sup>.

Our results also indicate that AhR signaling is maintained in a constitutively activated α-state in resistant cells. Since we did not find any recurrent mutation that may support constitutive activation of AhR in the TCGA melanoma cohort (cBioPortal: <http://www.cbioportal.org/index.do>), we hypothesized that endogenous α-ligands produced in drug-resistant cells may result in sustained activation of the AhR/ARNT pathway (Fig. 5b) and thereby promote the α-signature. Consistent with this possibility, we observed that the fate of β-cells could be redirected into α-cells upon exposure to α-ligands (TCDD), increasing the BRAFi-resistance gene signature (Fig. 5c), and that AhR drives the expression of BRAFi-resistance genes (*AXL* and *NRP1* among others) via the binding of promoter containing XRE motifs (Supplementary Figure 6). Finally, loss-of-function experiments confirmed that α- and resistance signatures were both AhR- and ARNT-dependent (Fig. 5e, f).

**AhR as a therapeutic target to delay resistance to BRAFi.** To exploit the potential therapeutic implications of these findings, we



screened for molecules that impair deleterious  $\alpha$ -activation of AhR (Fig. 6a). To this end, we performed in silico modeling combined with in vitro biochemical assays using a wide range of well-characterized AhR ligands, including exogenous and endogenous agonists (i.e., TCDD & B(a)P and FICZ & L-kynurenine,

respectively) and antagonists (i.e., CH-223191 or Resveratrol, RSV) (Fig. 6 and Supplementary Figure 7a). These analyses identified the well-tolerated molecule RSV, which selectively binds the  $\alpha$ -pocket of AhR<sup>34</sup> (Fig. 6b). Critically, RSV-TCDD co-treatment failed to induce *CYP1A1* (Fig. 6c) and several other

**Fig. 2** AhR signature correlates with dedifferentiation states of melanoma cell lines and resistance to BRAFi. **a** Expression heatmap for  $\beta$ - and  $\alpha$ -signature genes in different Vem-sensitive or -resistant melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia RNAseq dataset (GEO, GSE36134<sup>29</sup>). IC50 values for PLX4720 were obtained from Supplementary Table 7 of ref. <sup>29</sup>. Genes and clusters with similar expression profiles across the cohort are placed close to each other in the grid. **b** Expression heatmap for BRAFi resistance genes in different Vem-sensitive or -resistant melanoma cell lines from Cancer Cell Line Encyclopedia RNAseq dataset (GEO, GSE36134<sup>29</sup>) (top) and average signatures for the  $\alpha$ - (established by the median of expression of AhR target genes: *INHBA*, *THBS1*, *RUNX2*, *REEP2*, *PMAIP1*, *OSMR*, *LRRC49*, and *CYP1B1*), for the  $\beta$ - (established by the median of expression of pigmentation genes: *GPR143*, *TYR*, *SLC45A2*, *RAB38*, *SNCA*, *MLPH*, *MLANA*, and *MITF*), and for the resistance genes (*AXL*, *GCNT1*, *NRP1*, *ZEB1*, *ITGA1*, and *LPAR1*) (mid). Differentiation status for melanoma cell lines consistent with the four-stage differentiation model (melanocytic: M, transitory: T, neural crest-like: N, and undifferentiated: U)<sup>10</sup> has been established for the different melanoma cell lines considering average signature from subtype genes described in supplemented files from Tsoi et al.<sup>10</sup> (bottom). **c** Expression heatmap for  $\beta$ -,  $\alpha$ -, and resistance genes signatures in the melanoma cultures dataset from the GEO dataset (GSE60664<sup>15</sup>) depending on their proliferative or invasive states. Average signatures and differentiation status for melanoma cell lines have been indicated at the bottom. **d** PCA of melanoma cell line datasets obtained by the cluster prediction assignment (from melanoma dedifferentiation signature resource from Graeber's lab: <http://systems.crump.ucla.edu/dediff/>)<sup>10</sup>. **e-g** *MLANA*, *PMAIP1*, and *AXL* expression PCA color maps illustrating, respectively,  $\beta$ - (**e**),  $\alpha$ - (**f**), and resistance signatures (**g**) from different subtypes of melanoma cell lines dataset from Graeber's lab (top). Boxplots of selected  $\beta$ -genes (as described above) in different subtypes of melanoma cell lines (U, undifferentiated; N, neural crest-like; T, transitory; M, melanocytic) (bottom). Number in each group: U = 10, N = 14, T = 12, M = 17. Whiskers reflect median of expression with range. One-way ANOVA and Tukey's test: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . **h** Fold expression level (log<sub>2</sub>) for average  $\beta$ -,  $\alpha$ -, and resistance genes signatures in different melanoma cell lines from the lab compared to the 501Mel cell line (top). Vem sensitivity has been established by cell density measurement and calculation of the IC50 (bottom) using GraphPad (PRISM6.0<sup>®</sup>) 4 days after every 2 days of treatment with an increasing concentration of Vem. Asterisk: NRAS mutant

genes (Fig. 6d, Supplementary Figure 7b) of the  $\alpha$ -signature, illustrating the effectiveness of RSV to counteract  $\alpha$ -ligands<sup>35</sup>. RSV also inhibited BRAFi-induced pigmentation and induction of the  $\beta$ -signature, confirming the ability of  $\alpha$ -ligands to compete with  $\beta$ -ligands for AhR binding (Fig. 6 and Supplementary Figures 3 and 8). Importantly, the sensitivity to BRAFi was fully maintained in RSV-exposed cells, indicating that this molecule does not alter BRAFi efficacy (Fig. 6e–h and Supplementary Figure 8). Together, these data indicate that an RSV-Vem combination treatment may result in a significant benefit over Vem alone. To test this possibility, we exposed pairs of BRAFi-sensitive (S) and resistant (R) melanoma cells (501Mel and SKMel28) to both Vem and RSV. RSV increased the sensitivity of sensitive and resistant cells to Vem (IC50, Fig. 6i, j) and decreased the number of BRAFi-persister cells (Fig. 6i–k). We evaluated the potential of this BRAFi/RSV combination in a patient-derived xenograft (PDX) model of melanoma<sup>11,36</sup>. Mice were exposed to BRAFi alone or in combination with RSV once tumors reached 200 mm<sup>3</sup>. In this model, BRAFi alone stabilized the tumor growth for about 10 days before relapse (Supplementary Figure 8d). BRAFi/RSV treatment reduced, moderately but significantly, tumor growth compared to BRAFi alone (14 days) (Fig. 6l). In agreement with these results, tumors exposed to BRAFi/RSV combination reached endpoints significantly later than BRAFi alone (24 and 16 days, respectively) (Fig. 6m). Together, these results support the use of AhR inhibitors to increase BRAFi efficacy over-time.

## Discussion

In conclusion, we uncovered a central role for AhR in BRAFi resistance and relapse. Unexpectedly, we revealed that in drug-sensitive melanoma cells, BRAFi, in addition to inactivated oncogenic BRAF activity, functions as a non-canonical ligand of AhR. Consequently, BRAFi promotes an AhR-transcriptional pathway that maintains cells into a “proliferative” and drug-sensitive state. In contrast, AhR activated by  $\alpha$ -ligands (canonical ligands) promote a dedifferentiation state and a BRAFi resistance program. These latter cells are probably involved in the relapse. Our results are consistent with recent studies indicating that constitutive and chronic activation of AhR promotes aggressive tumor behavior<sup>37,38</sup> and tumorigenesis in vivo<sup>39,40</sup>. Indeed, AhR is now reported to have pro- or anti-tumor activity according to cell state<sup>41–45</sup>. Activation of AhR has also been associated with

the alteration of many cell differentiation processes<sup>46</sup> and melanoma cell dormancy<sup>47,48</sup>. Since the chronic exposure to  $\alpha$ -ligands can switch BRAFi sensitive cells into persister/resistant cells, it is important to keep in mind that chronic activation of AhR occurs in response to many environmental factors, such as UV exposure<sup>49</sup> and pollutants<sup>50</sup>, all known to promote cancer. Our data also highlight the potential of AhR antagonists as sensitizers of melanoma-targeted therapy. Together, these data underscore the importance of further studying the role of AhR-signaling in the context of cancer biology as a putative therapeutic target<sup>41,51,52</sup>.

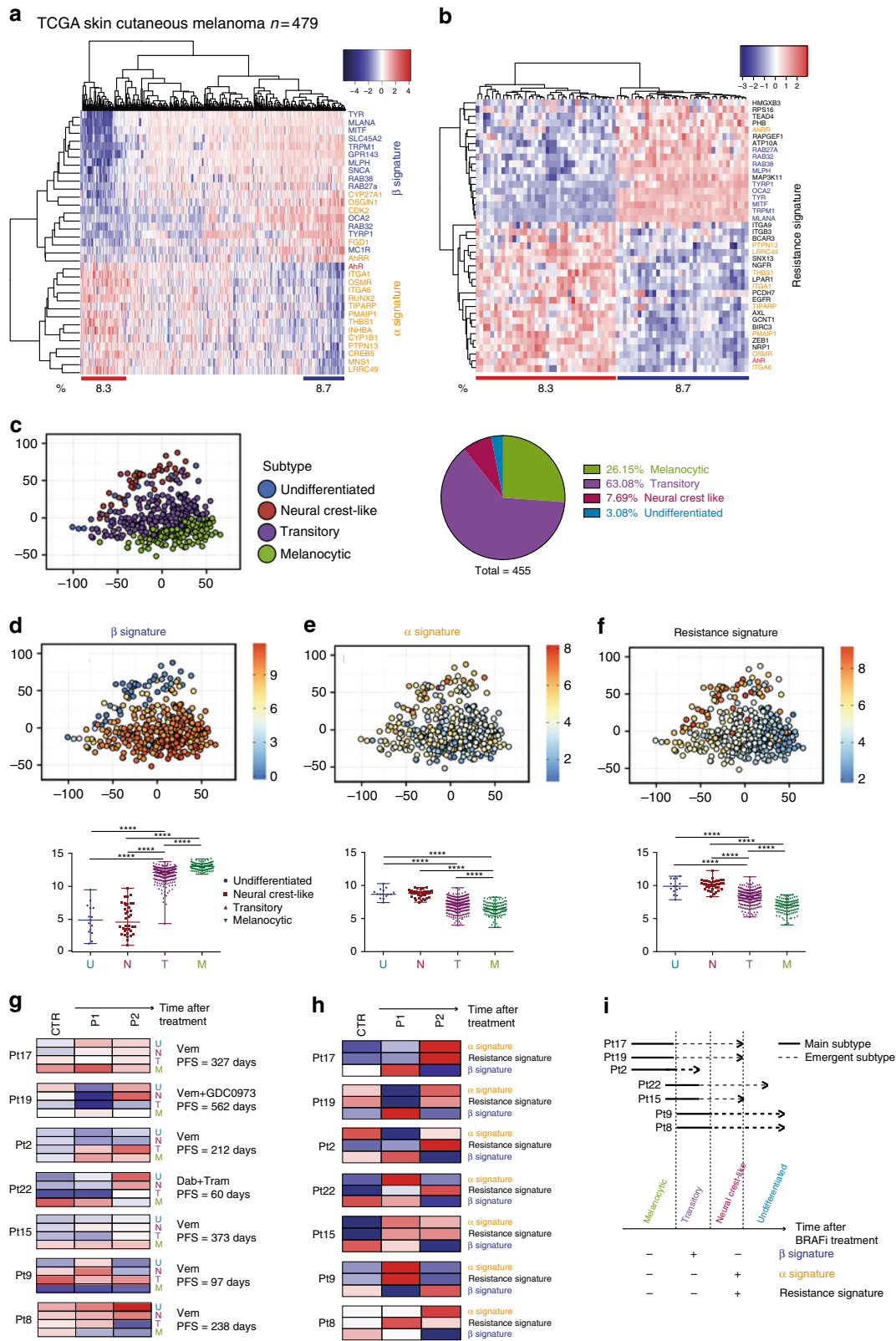
## Methods

**Reagents.** The AhR ligands were obtained from: 2,3,7,8-TCDD (TCDD) (Sigma Aldrich, 48599), FICZ (Sigma Aldrich, SML1489), Vemurafenib (Vem, PLX4032) (Selleckchem, RG7204), Dabrafenib (Dab) (Santa Cruz Biotechnology, SC364477), PLX7904 (MedChem Express, HY-18997), PLX8394 (MedChem Express, HY-18972), CH-223191 (Selleckchem, S7711), L-Kynurenine (Sigma Aldrich, K8625), Resveratrol (RSV) (Selleckchem, S1396), StemRegenin 1 (SR1) (Selleckchem, S2858), and Benzo(a)pyrene (B(a)P) (Sigma Aldrich, B1760).

**Plasmids.** The pGL3-XRE3-FL construct containing three XRE sequences from *CYP1A1* gene has been described previously<sup>53</sup>. Luciferase reporter plasmids (pOCA2-pGL4 luciferase) containing proximal promoter region –500b (IDT, Leuven, Belgium) was cloned into the pGL4.10 (Promega, USA) using Gibson Assembly<sup>®</sup> Master Mix following manufacturer's recommendations (NEB, UK). Plasmid encoding the MEK1 constitutive kinase form was described by ref. <sup>54</sup>.

**Cell lines and culture conditions.** The mammary MCF7 epithelial cells were cultured in humidified air (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4500 mg/l D-glucose, 110 mg/l sodium pyruvate, supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA cell culture company) and 1% penicillin–streptomycin antibiotics (Gibco, Invitrogen). The melanoma cell lines (501Mel, MM001, SKMel28, MM074, Mel624) were grown in humidified air (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) in RPMI-1640 medium (Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA cell culture company) and 1% penicillin–streptomycin antibiotics (Gibco, Invitrogen). Mel624 cells were obtained from G. Lizee's lab at the University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX. MM001 and MM074 (S+R) cells were obtained from G. Ghanem's lab at the Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium. SKMel28 (S+R) cell was obtained from J.C. Marine's lab at VIB Center for Cancer Biology, VIB, Leuven, Belgium. 501Mel cells (S) were obtained from ATCC and 501Mel BRAFi resistant cells (R) have been obtained after 3 months treatment with Vem (1  $\mu$ M every 2 days). All cell lines have been routinely tested for mycoplasma contamination.

**Molecular modeling.** Docking experiments were performed with AutoDock4.2; free open tool, <http://autodock.scripps.edu><sup>55</sup>. A multiple alignment between the sequences of PAS-B mAhR (residues 278–384) and PAS-B HIF-2 $\alpha$  was generated



according to the sequence alignment suggested by Pandini et al.<sup>56</sup>. The homology model of PAS-B mAHR was constructed using the crystal structures of the heterodimer complex of PAS-B HIF-2 $\alpha$  (pdb code: 3f1p, 3f1o, 3f1n) and Prime v.2.1. Docking experiments were carried out between Ahr PAS-B model and different Ahr ligands and BRAFi chemical structures recovered in ZINC database (zinc.docking.org).

**Cell density evaluation.** Cell density was assessed using a methylene blue colorimetric assay<sup>57</sup>. Briefly, cells were fixed for at least 30 min in 95% ethanol. Following ethanol removal, the fixed cells were dried and stained for 30 min with 1% methylene blue dye in borate buffer. After four washes with tap water, 100  $\mu$ l of 0.1 N HCl were added to each well. Plates were next analyzed with a spectrophotometer at 620 nm.



**Fig. 3** In patients' tumors, AhR signatures correlate with cell-dedifferentiation states and resistance to BRAFi. **a** Expression heatmap depicting mRNA expression of individual genes for pigmentation signature (blue,  $\beta$  signature) and AhR target genes (orange,  $\alpha$  signature) in non-treated melanoma patient dataset from TCGA (SKCM,  $n = 459$ )<sup>29</sup>. **b** Expression heatmap depicting mRNA expression of individual genes for BRAFi resistance genes in non-treated melanoma patients dataset from TCGA (SKCM,  $n = 459$ ) with high level ( $n = 40$ ) or low level of expression ( $n = 34$ ) for *AhR*. **c** PCA of TCGA datasets obtained by the cluster prediction assignment (melanoma dedifferentiation signature resource from the Graber lab: <http://systems.crump.ucla.edu/dediff/>)<sup>10</sup> and pie-chart representation of the melanoma dedifferentiation subtypes. **d–f** *MLANA*, *PMAIP1*, and *AXL* expression PCA color maps illustrating, respectively,  $\beta$ - (**d**),  $\alpha$ - (**e**), and resistance signatures (**f**) from the TCGA dataset (top). Boxplots of selected  $\beta$ -,  $\alpha$ -, and resistance genes (as described above) in different untreated melanoma patients' biopsies from TCGA (U, undifferentiated; N, neural crest-like; T, transitory; M, melanocytic) (bottom). Number in each group: U = 14, N = 35, T = 287, M = 118. Whiskers reflect median of expression with range. One-way ANOVA and Tukey's test: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . **g** Expression heatmap for melanoma differentiated state signatures in BRAFi-treated melanoma. **h** Expression heatmap for average  $\beta$ -,  $\alpha$ -, and resistance signatures in BRAFi-treated single-drug (i.e., BRAFi) or double-drug (i.e., BRAFi + MEKi) melanoma patients during resistance acquiring (RNAseq dataset GEO, GSE65185<sup>13</sup>). Clinical data are available from supplemental table S1 from Hugo et al.<sup>13</sup>. **i** Schematic representation of temporal transcriptional regulation of different signatures in a melanoma patient treated with BRAFi

**Picture from patients.** Picture of Vem treated melanoma patient was obtained from Dr. Lise Boussemart at the Medical Department of Dermatology, CHU Rennes, France after informed consent.

**AhR ligand binding assay.** Ligand binding was measured as the presence/absence of ligand-dependent displacement of [<sup>3</sup>H]TCDD from the hepatic cytosolic guinea pig AhR by the hydroxyapatite assay. The experiments were performed essentially as previously described<sup>58</sup>.

**Gel retardation assay.** Experiments have been done as previously described<sup>59</sup>.

**AhR immunolocalization.** Experiments have been done as previously described<sup>53</sup>.

**Ethoxyresorufin O-deethylase activity assay.** Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity, corresponding to the O-deethylation of ethoxyresorufin, and mainly supported by the CYP1A1 enzyme in living MCF7 cells, was measured as described previously<sup>33</sup>.

**RNA interference.** Plasmids encoding shRNA targeting human AhR (TL320259, 29mer shRNA constructs in lentiviral GFP vector) were purchased from Origene, Rockville, MD. Lentiviral productions have been performed as recommended (<http://tronolab.epfl.ch>), using 293T cells, psPAX2, pVSVG, and shRNA. Infections were performed overnight in the presence of 8  $\mu$ g of polybrene per ml. After infection, cells were maintained under selection in the presence of puromycin (Invivogen, San Diego, CA) and seeded in 96-well plates at 0.5 cells/well for single cell clonal expansion. Clones of interest were validated by Western blot analysis and RT-qPCR.

siRNA were purchased from Sigma-Genosys (St. Louis, MO, USA): siCTR, siOCA2#1 and #2, siARNT. Sequences for all shRNA or siRNA are available in Supplementary Table 2.

**CRISPR/Cas9 experiment.** AhR knock out has been performed using CRISPR/Cas9 methodology. Guide sequence targeting AhR (available in Supplementary Table 3) (Sigma-Genosys, St. Louis, MO, USA) has been cloned into the GeneArt CRISPR Nuclease vector according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Next, vectors were transfected in 501Mel cells, and 2 days later cells were seeded in 96-well plates at 0.5 cells/well for single cell clonal expansion. Clones of interest were validated by DNA-sequencing, Western blot analysis, and RT-qPCR.

**Luciferase activity.** 2.10<sup>5</sup> MCF7 or 501Mel cells were cultured in 12-well plates and transfected with respectively the pGL3-XRE3-FL<sup>53</sup> and the pGL4-pOCA2-Luc constructs carrying the firefly luciferase. Transient transfection of cells was performed by the JetPRIME<sup>®</sup> transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Polyplus transfection<sup>™</sup>, NY, USA). In brief, 50  $\mu$ l of JetPRIME<sup>®</sup> Buffer containing 100 ng of firefly luciferase reporter plasmid was added per well, and 1  $\mu$ l of JetPRIME<sup>®</sup> transfection reagent. After a 24-h period, cells were exposed to TCDD, Vemurafenib for a 6-h period. Luciferase assays were then performed with a Promega kit according to the manufacturer's instructions. Data were expressed in arbitrary units, relative to the value of luciferase activity levels found in DMSO-exposed cells, arbitrarily set at 1 arbitrary unit (a.u.). Firefly luciferase activity was normalized to protein content using Bicinchoninic Acid Kit from Sigma-Aldrich<sup>®</sup> and measured with using a luminometer (Centro XS<sup>3</sup> LB960, Berthold Technologies).

**RNA extraction and RT-qPCR expression.** Experiments have been done as previously described<sup>60</sup>. Primers used for RT-qPCR experiments are available in Supplementary Table 3.

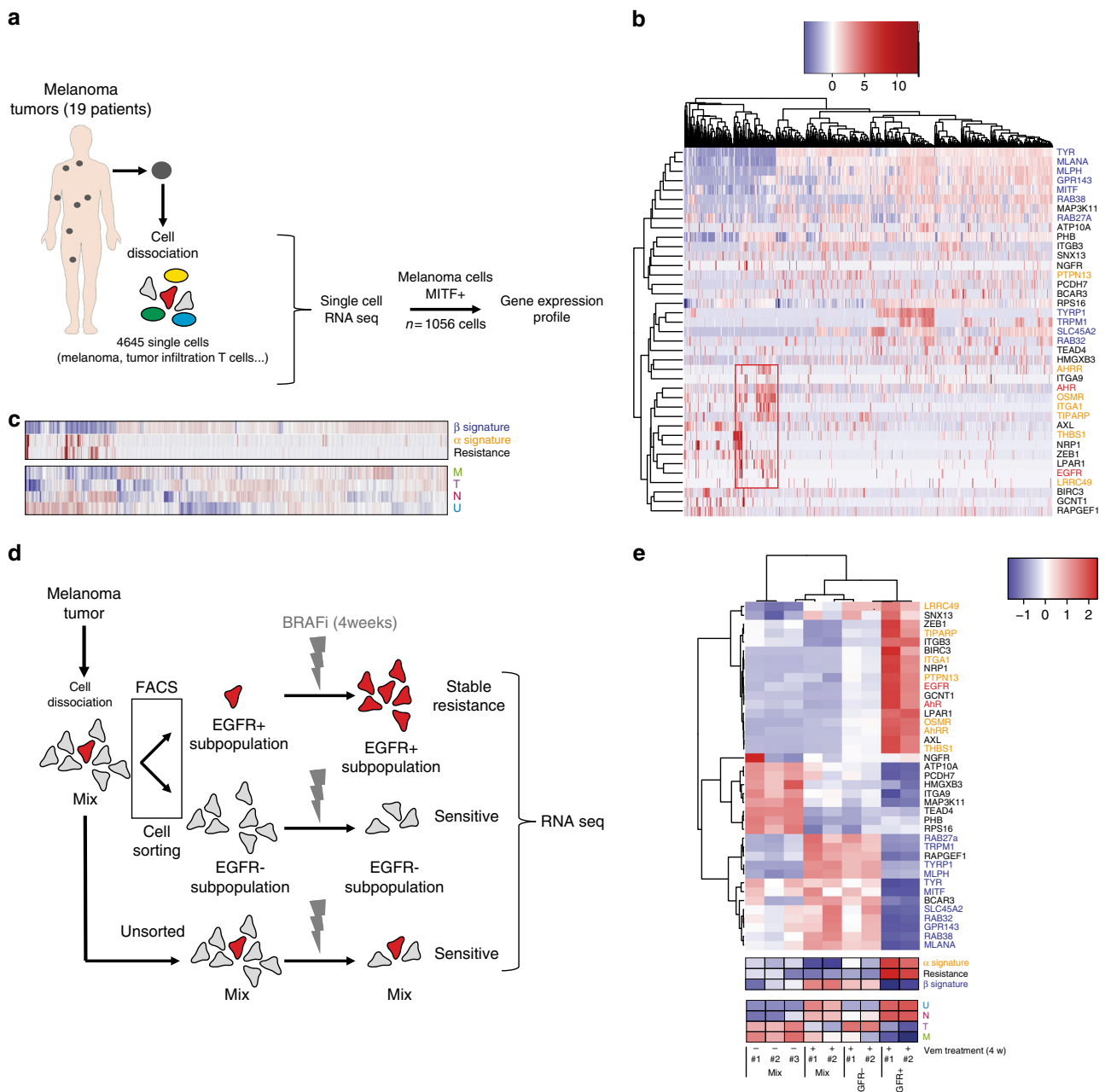
**Chromatin immunoprecipitation assay.** ChIP assays, using 2  $\times$  10<sup>6</sup> 501Mel cells or 501 KD AhR (as negative control), were performed as previously described<sup>61</sup>, with specific adaptations. The cells were cross-linked (1% final concentration formaldehyde for 10 min), washed twice and collected in 1 ml cold PBS. Cells were lysed and the samples were then sonicated for DNA fragmentation (Sonifier Cell Disruptor, Branson) in 1 ml lysis buffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% SDS, 0.5% Empigen BB) and diluted 2.5-fold in IP buffer (2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), 0.1% Triton X-100). This fraction was subjected to immunoprecipitation overnight with 4  $\mu$ g of the appropriate antibody (AhR, H211, Santa Cruz). These samples were then incubated for O/N at 4 °C with 20  $\mu$ l of Protein G Dynabeads<sup>™</sup> (Invitrogen). Precipitates were washed several times, cross-linking reversed and DNA purified using a Nucleospin Extract II kit (Macherey Nagel).

qPCR analyses were carried out with primers spanning target genes proximal promoters (sequences on Supplementary Table 3). For qPCR analysis, fold enrichment was determined using the  $\Delta\Delta C_t$  method: fold enrichment =  $2^{-(\Delta C_t1 - \Delta C_t2)}$ , where  $\Delta C_t1$  is the ChIP of interest and  $\Delta C_t2$  the control ChIP.

**Western blot.** Harvested cells were solubilized as previously described<sup>57</sup>. Protein samples were denatured at 95 °C, resolved by SDS-PAGE and transferred onto Hybond<sup>™</sup>-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Bucks, UK). Membranes were probed with appropriated antibodies and signals were detected using the Fujifilm LAS-3000 Imager (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan). Primary antibodies were: anti-Phospho-ERK-1/2 (9101S), MEK-1/2 (D1A5) (Cell Signalling Technology, Boston, USA), ERK-1/2 (K23), AhR (H211), Hsc70 (B6) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from (Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK) (1:1000).

**Proximity ligation assay.** The proximity ligation assay was applied in order to visualize AhR/ARNT complexes in MCF7 cells. The cells, grown on glass coverslips, were fixed with 4% PFA in 0.1 M phosphate buffer (15735-60S, Electron Microscopy Sciences) for 15 min at RT and PLA was performed using the kit ((DUO92007) Duolink<sup>®</sup> in Situ Detection Reagent Orange, (DUO92001) Duolink<sup>®</sup> in Situ PLA<sup>®</sup> Probe Anti-Mouse PLUS, (DUO92005) Duolink<sup>®</sup> in Situ PLA<sup>®</sup> Probe Anti-Rabbit MINUS, SIGMA) according to the manufacturer's protocol. After blocking, the reaction with primary antibodies, mouse anti-AhR (C20, 1/100) and rabbit anti-ARNT (1C12, 1/100). Following the ligation and amplification steps, the coverslips were immobilized on the microscopic slides with the mounting medium containing DAPI. In control experiment, the ligation step was omitted. Imaging analysis was carried out using a delta vision system (Applied Precision). Number of foci was quantified in at least 30 cells.

**RNA-Seq.** Total RNAs was extracted from 501Mel cells treated for 48 h respectively with DMSO, Vemurafenib (1  $\mu$ M), Resveratrol (5  $\mu$ M), Resveratrol (5  $\mu$ M) + Vemurafenib (1  $\mu$ M), TCDD (10 nM), Resveratrol (5  $\mu$ M) + TCDD (10 nM) using the mirVana kit (Thermo Fisher Scientific). Libraries were generated from 500 ng of total RNAs using Truseq Stranded mRNA kit (Illumina). Libraries were then quantified with KAPA library quantification kit (Kapa Biosystems) and pooled. 0.5 nM of this pool were loaded on a high output flowcell and sequenced on a NextSeq500 platform (Illumina) with 2  $\times$  75 bp paired-end chemistry within two runs. Reads were aligned to the human genome release hg19 using STAR v2.4.0a with default parameters. Quantification of genes was then performed using featureCounts release subread-1.5.0-p3-Linux-x86\_64 with "--primary -g gene\_name -p -s 1" options. Quality control of RNA-Seq count data was assessed using in-house R scripts. Normalization and statistical analysis were performed using the Bioconductor package DESeq2. *p*-Values were adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure, which controls the false discovery rate (FDR). Differentially expressed genes were selected based on an adjusted *p*-value below 0.05. The RNA-Seq data presented in this article have been submitted to the Gene

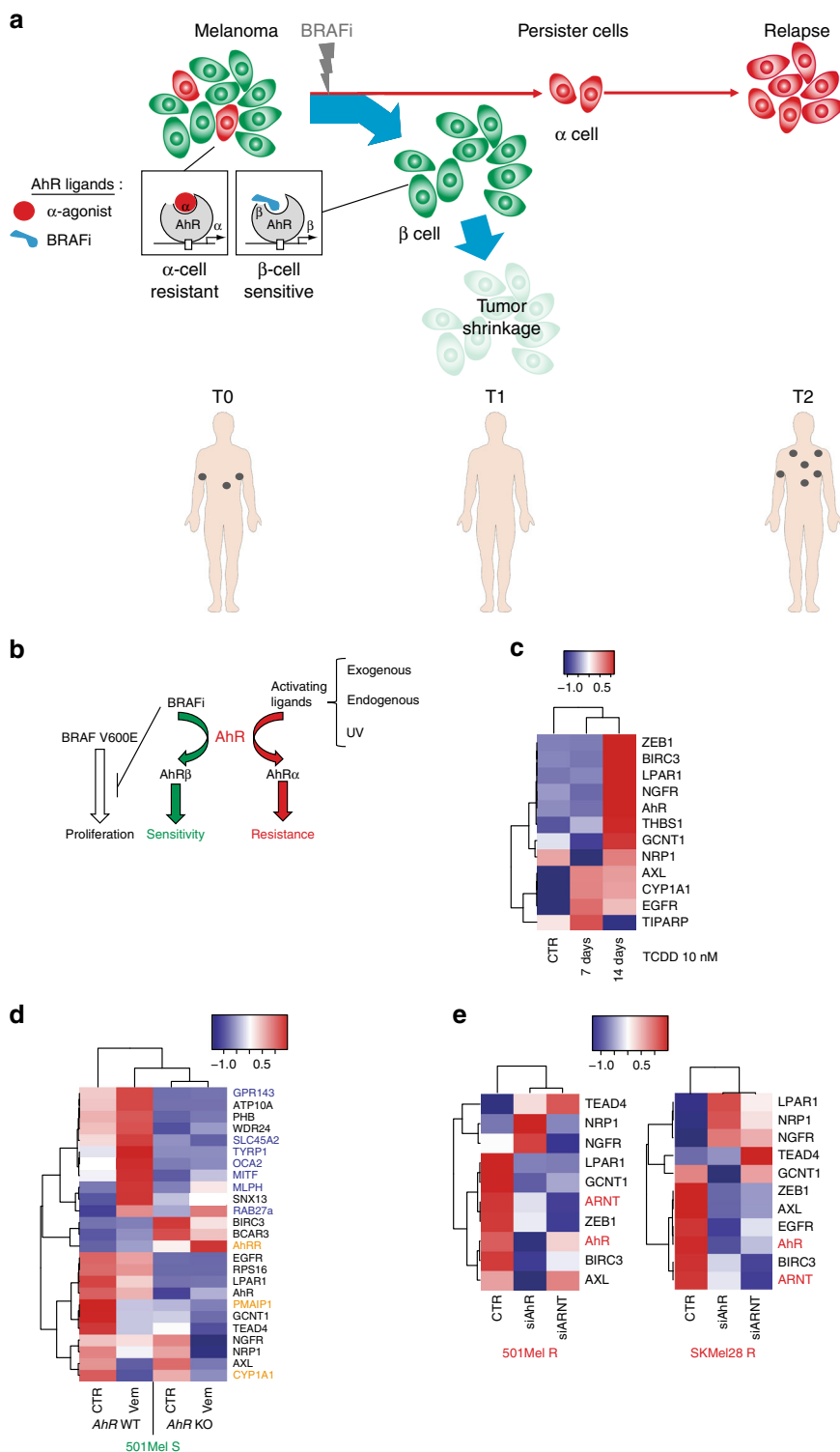


**Fig. 4** Role of AhR in melanoma cell resistance: single cell analyses. **a** Schematic representation of analysis of data from single cell analysis of BRAFi-resistant melanoma (19 patients). Cells from tumors of the different patients have been dissociated and individually sequenced for RNA expression (4650 cells) (RNAseq dataset, GEO, GSE72056<sup>33</sup>). One filter has been included to only focus on melanoma cells expressing the *MITF* gene. **b** Expression Heatmap for genes corresponding to  $\alpha$ - and  $\beta$ -signatures and depicting mRNA expression of individual genes for BRAFi resistance genes using data from single cell analysis of BRAFi-resistant melanoma (19 patients) (1056 cells). **c** Expression heatmap for average  $\beta$ -,  $\alpha$ -, and resistance signatures (top) and melanoma differentiated state signatures using data from single cell analysis of BRAFi-resistant melanoma. **d** Schematic representation of analysis of data using an RNA-Seq dataset obtained from BRAFi-treated melanoma cells (from 2 patients) (from supplemented information<sup>16</sup>). Cell sorting has been performed on dissociated tumors to isolate EGFR-negative or -positive cells that are able to resist BRAFis and to generate colonies after long-term treatment. **e** Expression heatmap for genes corresponding to individual genes (top) of  $\alpha$ - and  $\beta$ -signatures and depicting mRNA expression for BRAFi resistance, average signatures (middle) and differentiated state signatures (bottom) using an RNA-Seq dataset obtained from BRAFi-treated melanoma cells<sup>16</sup>. The human silhouettes have been adapted (change of color background) from Servier Medical Art, licensed under a CC BY 3.0 FR [https://smart.servier.com/smart\_image/shape-29/]

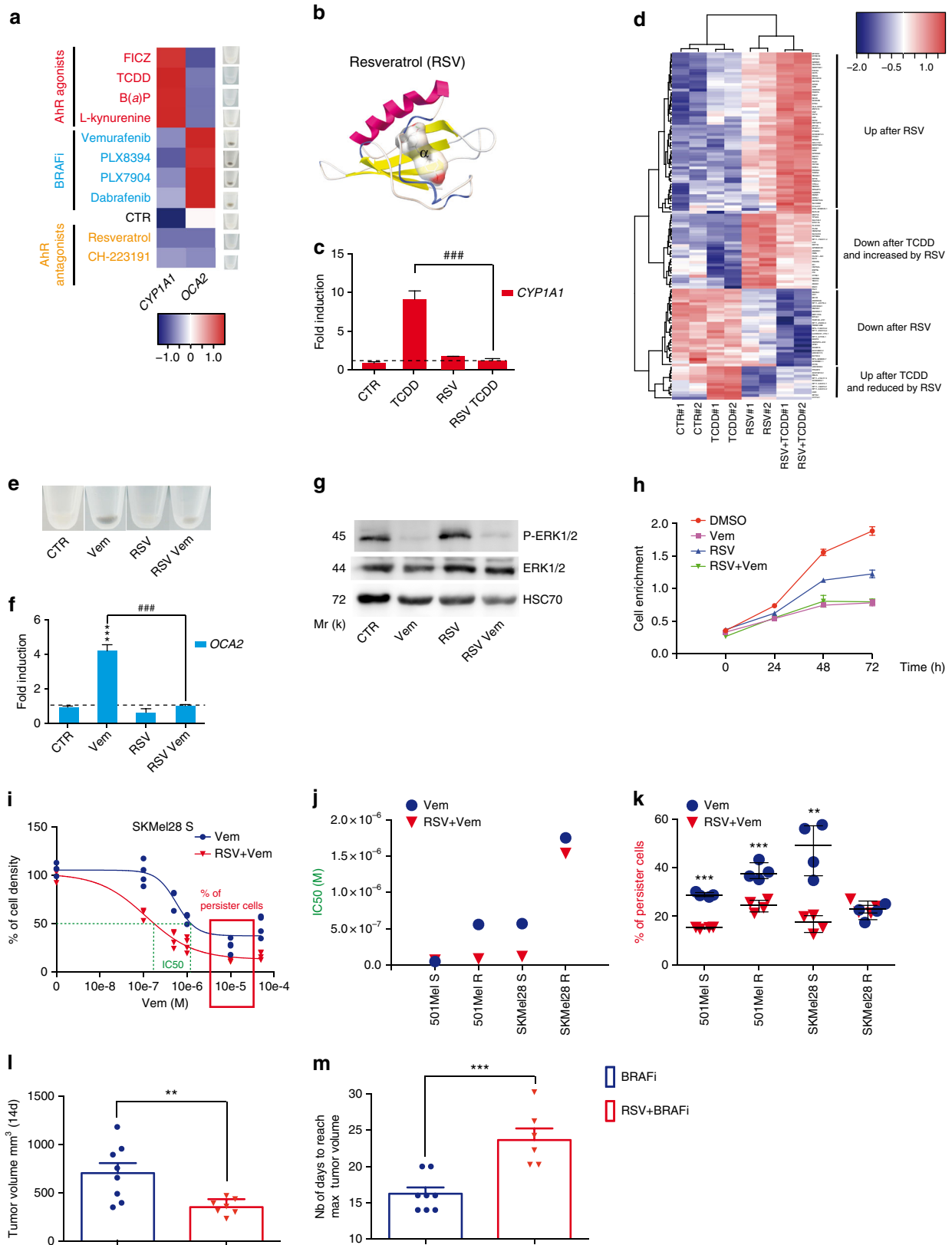
Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under the accession number GSE104869.

**Patient-derived xenografts (PDXs).** After approval by the University Hospital KU Leuven Medical Ethical Committee (S54185) and written informed consent from the patient, PDX model MEL006 was established from an in-transit

metastasis resected as part of standard-of-care melanoma treatment at the University Hospital KU Leuven. The procedures involving mice were performed in accordance with the guidelines of the IACUC and KU Leuven and carried out within the context of approved project applications P147/2012, P038/2015, and P098/2015. Fresh tumor tissue was collected in transport medium (RPMI1640 medium supplemented with penicillin/streptomycin and amphotericin B). Tumor fragments were subsequently rinsed in phosphate-buffered saline



**Fig. 5** Long-term canonical activation of AhR drives melanoma resistance to BRAFi. **a** Graphical representation of AhR function controlling melanoma cell sensitivity or resistance during BRAFi treatment. A high level of heterogeneity is observed among melanomas with a high proportion of highly differentiated and  $\beta$ -cells sensitive to BRAFi (induction of pigmentation by AhR:  $\beta$  signature) and a weak number of undifferentiated and  $\alpha$ -cells resistant to BRAFi (induction of  $\alpha$  signature and resistance genes). These persister cells constitute a cell reservoir leading to melanoma relapse. **b** Graphical model of AhR activation by BRAFi and  $\alpha$ -ligands, with  $\alpha$ -ligands dictating melanoma resistance. **c** Expression heatmap for resistant genes in 501Mel cells treated for 7–14 days with TCDD (10 nM). **d** 501 melanoma cells (501Mel) were pre-treated daily or not for 2 weeks with TCDD (10 nM) and treated 4 days with increasing concentrations of Vem in order to establish cell density measurements and calculate IC50 (sensitivity to Vem). Values, calculated with GraphPad (PRISM6.0<sup>®</sup>), represent the IC50 of Vem for control cells (without TCDD pre-treatment) or after 2 weeks of TCDD. **e** Expression heatmap for  $\beta$ -,  $\alpha$ -, and resistance genes in 501Mel cells invalidated or not for AhR by CRISPR/Cas9 before or 48 h after treatment with Vem (1  $\mu$ M). **f** Expression Heatmap for  $\beta$ -,  $\alpha$ -, and resistance genes in 501Mel and SKMEL28 (R) cells knocked-down for AhR or ARNT using siRNA. The human silhouettes have been adapted (change of color background) from Servier Medical Art, licensed under a CC BY 3.0 FR [[https://smart.servier.com/smart\\_image/shape-29/](https://smart.servier.com/smart_image/shape-29/)]



supplemented with penicillin/streptomycin and amphotericin B and cut into small pieces of approximately 3 × 3 × 3 mm<sup>3</sup>. Tumor pieces were implanted in the interscapular fat pad of female SCID-beige mice (Taconic). After reaching generation 4 (F4), tumor fragments were implanted in the interscapular fat pad of female NMRI nude mice (Taconic). Ketamine, medetomidine, and buprenorphine were used for anesthesia.

**Pharmacologic treatment of mice.** Mice with tumors reaching 200–300 mm<sup>3</sup> were treated via daily oral gavage. Dabrafenib (Biorbyt) and/or Resveratrol (Selleckchem) were dissolved in DMSO at a concentration of 30 and 40 mg/ml respectively, aliquoted and stored at –80 °C. Each day a new aliquot was diluted 1:10 with phosphate-buffered saline and mice were treated with a dose of 30 and 40 mg/kg for Dabrafenib and Resveratrol, respectively. Tumor volume was

**Fig. 6** Therapeutic opportunity to limit BRAFi resistance. **a** Heatmap depicting the effects of different AhR ligands on OCA2 and CYP1A1 mRNA in 501Mel cells and pigmentation (48 h). Three groups: exo- and endo-gene ligands (TCDD, B(a)P and FICZ, L-Kynurenine, respectively), BRAFi and AhR antagonists (Resveratrol and CH-223191). **b** Binding model of the antagonist Resveratrol (RSV) to the PAS B of AHR. RSV is predicted to bind to the  $\alpha$ -pocket. Free binding energy is reported in Supplementary Table 1. **c** RSV prevents CYP1A1 mRNA induction (48 h) by TCDD. 501Mel cells were pre-treated with 5  $\mu$ M RSV 2 h before 10 nM TCDD. **d** Gene expression profile of 501Mel cells exposed to vehicle, TCDD (10 nM), RSV (5  $\mu$ M), or RSV (5  $\mu$ M) + TCDD (10 nM) ( $n = 2$ ) for 48 h. Heatmap focused on differentially expressed genes as a function of treatment. **e–g** 501Mel cells were treated with Vem (1  $\mu$ M) alone or in combination with RSV (5  $\mu$ M) for 48 h for pigmentation analyses (**e**), OCA2 mRNA expression levels (**f**), and phospho-ERK and ERK total detection by Western blotting (**g**). **h** 501Mel cells were pretreated for 2 h with RSV (5  $\mu$ M) before Vem addition (1  $\mu$ M). 501Mel cell density was evaluated by methylene blue staining followed by quantification at 620 nm ( $n = 2$ ). **i–k** Two pairs of BRAFi-sensitive (S) and -resistant (R) melanoma cells (501Mel and SKMel28) were pre-treated or not for 1 week with RSV (1  $\mu$ M, every 2 days) before treatment with Vem in order to establish Vem IC50 3 days after BRAFi treatment. Values, calculated with GraphPad PRISM (**i**), represent IC50 of Vem for control cells (without RSV pre-treatment) or after 1 week of RSV (**j**). % of BRAFi-persister cell values correspond to the percentage of residual cells following 3 days of Vem (5  $\mu$ M) treatment in comparison to melanoma cells without RSV treatment (**k**). **l** PDX tumor volumes 14 days after daily treatment with Dabrafenib (30 mg/kg) ( $n = 8$ ) or in combination with RSV (40 mg/kg) ( $n = 7$ ). **m** Number of days to reach max tumor volume (endpoint: >800 mm<sup>3</sup>). Values correspond to the mean  $\pm$  sem. Two-tailed unpaired *t* test for the different treatments was performed:  $^{**}p < 0.01$

monitored with a caliper and calculated using the following formula:  $V = (\pi/6) \times \text{length} \times \text{width} \times \text{height}$ .

**Data mining.** Analysis of TCGA/SKCM data was performed using OncoLnc portal [<http://www.oncolnc.org>]<sup>162</sup>. The raw data count matrix composed of 479 samples; from SKCM melanoma cohort was downloaded from the OncoLnc for the pigmentation genes ( $n = 14$ )<sup>12</sup>, the AhR target genes ( $n = 19$ )<sup>63</sup>, or the BRAFi resistant genes ( $n = 19$ )<sup>17</sup>. Expression heatmap of differentially expressed genes between samples was obtained on log<sub>2</sub> fold change using heatmap3 package in R/Bioconductor. Cluster-specific gene rankings were obtained by contrasting the samples with the rest of the samples. Cell density curves for the available melanoma cell lines were established using GraphPad PRISM 6.0<sup>®</sup> in order to establish IC50 dependently to the different treatments.

The raw data count matrix from RNA seq data were obtained in GEO database for previous experiments on melanoma cell lines Cancer Cell Line Encyclopedia<sup>29</sup> GSE36134 (sensitive or resistant to PLX470) (IC50 values for PLX4720 were obtained from the Supplementary Table 7 of ref. <sup>29</sup>); on BRAFi or BRAFi + MEKi resistant cell lines GSE75299<sup>32</sup> and GSE80829<sup>10</sup>, on BRAFi treated melanoma patients GSE65185<sup>13</sup>; on primary melanoma cell lines (proliferative or invasive) GSE60664<sup>15</sup>, on single cell analysis of BRAFi resistant melanoma (4650 seq) GSE72056<sup>33</sup>, and on Vem-resistant melanoma (EGFR pos)<sup>16</sup>. Expression heatmap of differentially expressed genes (pigmentation, AhR, or resistant genes) between samples was obtained on log<sub>2</sub> fold change using heatmap3 package in R/Bioconductor. PCA color maps illustrating expression of genes in melanoma cell lines dataset have been obtained by the cluster prediction assignment (from Melanoma dedifferentiation signature resource from Graeber's lab: [<http://systems.crump.ucla.edu/dediff/>]).

**Statistics.** Data are presented as mean  $\pm$  s.d. unless otherwise specified, and differences were considered significant at a *p* value of less than 0.05. Comparisons between groups normalized to a control were carried out by a two-tailed *t*-test with the Holm–Sidak's multiple comparisons test when more than two groups are compared to the same control condition. OS was estimated using the Kaplan–Meier method. Univariate analysis using the Cox regression model was done to estimate hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI). All statistical analyses were performed using Prism 6 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

## Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 24 January 2018 Accepted: 12 September 2018

Published online: 14 November 2018

## References

- Davies, H. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954 (2002).
- Chapman, P. B. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2507–2516 (2011).
- Wagle, N. et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3085–3096 (2011).
- Boussemaert, L. et al. Secondary tumors arising in patients undergoing BRAF inhibitor therapy exhibit increased BRAF–CRAF heterodimerization. *Cancer Res.* **76**, 1476–1485 (2016).
- Corcoran, R. B., Settleman, J. & Engelman, J. A. Potential therapeutic strategies to overcome acquired resistance to BRAF or MEK inhibitors in BRAF mutant cancers. *Oncotarget* **2**, 336–346 (2011).
- Johannessen, C. M. et al. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature* **504**, 138–142 (2013).
- Arozarena, I. & Wellbrock, C. Overcoming resistance to BRAF inhibitors. *Ann. Transl. Med.* **5**, 387 (2017).
- Müller, J. et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat. Commun.* **5**, 5712 (2014).
- Kong, X. et al. Cancer drug addiction is relayed by an ERK2-dependent phenotype switch. *Nature* **550**, 270–274 (2017).
- Tsoi, J. et al. Multi-stage differentiation defines melanoma subtypes with differential vulnerability to drug-induced iron-dependent oxidative stress. *Cancer Cell* **33**, 890–904 (2018).
- Rambow, F. et al. Toward minimal residual disease-directed therapy in melanoma. *Cell* **174**, 843–855 (2018).
- Rose, A. A. N. et al. MAPK pathway inhibitors sensitize BRAF mutant melanoma to an antibody-drug conjugate targeting GPNMB. *Clin. Cancer Res.* **949**, 6088–6098 (2016).
- Hugo, W. et al. Non-genomic and immune evolution of melanoma acquiring MAPKi resistance. *Cell* **162**, 1271–1285 (2015).
- Hoek, K. S. & Goding, C. R. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 746–759 (2010).
- Verfaillie, A. et al. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat. Commun.* **6**, 6683 (2015).
- Shaffer, S. M. et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* **546**, 431 (2017).
- Konermann, S. et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* **517**, 61422–61427 (2015).
- Denison, M. S. & Nagy, S. R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 309–334 (2003).
- Diani-Moore, S., Zhang, S., Ram, P. & Rifkind, A. B. Aryl hydrocarbon receptor activation by dioxin targets phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) for ADP-ribosylation via 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP). *J. Biol. Chem.* **288**, 21514–21525 (2013).
- Fernandez-Salguero, P. M., Hilbert, D. M., Rudikoff, S., Ward, J. M. & Gonzalez, F. J. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **140**, 173–179 (1996).
- Veldhoen, M. & Duarte, J. H. The aryl hydrocarbon receptor: fine-tuning the immune-response. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 747–752 (2010).
- Denison, M. S., Pandini, A., Nagy, S. R., Baldwin, E. P. & Bonati, L. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem. Biol. Interact.* **141**, 3–24 (2002).
- Safe, S., Lee, S.-O. & Jin, U.-H. Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target. *Toxicol. Sci.* **135**, 1–16 (2013).
- Zhang, C. et al. RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature* **526**, 583–586 (2015).
- Rose, A. A. N. et al. MAPK pathway inhibitors sensitize BRAF-mutant melanoma to an antibody-drug conjugate targeting GPNMB. *Clin. Cancer Res.* **22**, 6088–6098 (2016).
- Smith, M. P. P. et al. Inhibiting drivers of non-mutational drug tolerance is a salvage strategy for targeted melanoma therapy. *Cancer Cell* **29**, 270–284 (2016).
- Toyofuku, K. et al. The etiology of oculocutaneous albinism (OCA) type II: the pink protein modulates the processing and transport of tyrosinase. *Pigment Cell Res.* **15**, 217–224 (2002).

28. Park, S. et al. Unrevealing the role of P-protein on melanosome biology and structure, using siRNA-mediated down regulation of OCA2. *Mol. Cell Biochem.* **403**, 61–71 (2015).
29. Barretina, J., Caponigro, G. & Stransky, N. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**, 603–607 (2012).
30. Konermann, S. et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* **517**, 583–588 (2015).
31. Kemper, K. et al. BRAF(V600E) kinase domain duplication identified in therapy-refractory melanoma patient-derived xenografts. *Cell Rep.* **16**, 263–277 (2016).
32. Song, C. et al. Recurrent tumor cell-intrinsic and -extrinsic alterations during MAPKi-induced melanoma regression and early adaptation. *Cancer Discov.* **7**, 1248–1265 (2017).
33. Tirosh, I. et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* **352**, 189–196 (2016).
34. Casper, R. F. et al. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol. Pharmacol.* **56**, 784–790 (1999).
35. Chen, Z. H. et al. Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* **25**, 2005–2013 (2004).
36. Gilot, D. et al. A non-coding function of TYRP1 mRNA promotes melanoma growth. *Nat. Cell Biol.* **19**, 1348 (2017).
37. Stanford, E. A. et al. Role for the aryl hydrocarbon receptor and diverse ligands in oral squamous cell carcinoma migration and tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* **14**, 696–706 (2016).
38. Brooks, J. & Eltom, S. Malignant transformation of mammary epithelial cells by ectopic overexpression of the aryl hydrocarbon receptor. *Curr. Cancer Drug Targets* **11**, 654–669 (2011).
39. Opitz, C. A. et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **478**, 197–203 (2011).
40. Su, J.-M., Lin, P. & Chang, H. Prognostic value of nuclear translocation of aryl hydrocarbon receptor for non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* **33**, 3953–3961 (2013).
41. Roman, Á. C., Carvajal-Gonzalez, J. M., Merino, J. M., Mulero-Navarro, S. & Fernández-Salguero, P. M. The aryl hydrocarbon receptor in the crossroad of signalling networks with therapeutic value. *Pharmacol. Ther.* **185**, 50–63 (2018).
42. Narasimhan, S. et al. Towards resolving the pro- and anti-tumor effects of the aryl hydrocarbon receptor. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, E1388 (2018).
43. O'Donnell, E. F. et al. The aryl hydrocarbon receptor mediates leflunomide-induced growth inhibition of melanoma cells. *PLoS One* **7**, e40926 (2012).
44. Hanson, K. et al. The anti-rheumatic drug, leflunomide, synergizes with MEK inhibition to suppress melanoma growth. *Oncotarget* **9**, 3815–3829 (2018).
45. Contador-Troca, M. et al. Dioxin receptor regulates aldehyde dehydrogenase to block melanoma tumorigenesis and metastasis. *Mol. Cancer* **14**, 148 (2015).
46. Mulero-Navarro, S. & Fernandez-Salguero, P. M. New trends in aryl hydrocarbon receptor biology. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 1–14 (2016).
47. Werner-Klein, M. et al. Genetic alterations driving metastatic colony formation are acquired outside of the primary tumour in melanoma. *Nat. Commun.* **9**, 595 (2018).
48. Liu, Y. et al. STAT3/p53 pathway activation disrupts IFN- $\beta$ -induced dormancy in tumor-repopulating cells. *J. Clin. Invest.* **128**, 1057–1073 (2018).
49. Jux, B. et al. The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 203–210 (2011).
50. Villano, C. M., Murphy, K. A., Akintobi, A. & White, L. A. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **210**, 212–224 (2006).
51. Kolluri, S. K., Jin, U.-H. & Safe, S. Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as an anti-cancer drug target. *Arch. Toxicol.* **91**, 2497–2513 (2017).
52. Gutiérrez-Vázquez, C. & Quintana, F. J. Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor. *Immunity* **48**, 19–33 (2018).
53. Monteiro, P., Gilot, D., Langouet, S. & Fardel, O. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by the calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase inhibitor 7-oxo-7H-benzimidazo[2,1-a]benz[de]isoquinoline-3-carboxylic acid (STO-609). *Drug Metab. Dispos.* **36**, 2556–2563 (2008).
54. Greulich, H. & Erikson, R. L. An analysis of Mek1 signaling in cell proliferation and transformation. *J. Biol. Chem.* **273**, 13280–13288 (1998).
55. Morris, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
56. Pandini, A., Denison, M. S., Song, Y., Soshilov, A. A. & Bonati, L. Structural and functional characterization of the aryl hydrocarbon receptor ligand binding domain by homology modeling and mutational analysis. *Biochemistry* **46**, 696–708 (2007).
57. Gilot, D. et al. RNAi-based screening identifies kinases interfering with dioxin-mediated up-regulation of CYP1A1 activity. *PLoS One* **6**, e18261 (2011).
58. Tjong, C. T. et al. A novel prenylflavone restricts breast cancer cell growth through AhR-mediated destabilization of ER $\alpha$  protein. *Carcinogenesis* **33**, 1089–1097 (2012).
59. Soshilov, A. A. & Denison, M. S. Ligand promiscuity of aryl hydrocarbon receptor agonists and antagonists revealed by site-directed mutagenesis. *Mol. Cell Biol.* **34**, 1707–1719 (2014).
60. Bouafia, A. et al. p53 requires the stress sensor USF1 to direct appropriate cell fate decision. *PLoS Genet.* **10**, e1004309 (2014).
61. Métivier, R. et al. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452**, 45 (2008).
62. Anaya, J. OncoLnc: linking TCGA survival data to mRNAs, miRNAs, and lncRNAs. *PeerJ Comput. Sci.* **2**, e67 (2016).
63. Kovalova, N., Nault, R., Crawford, R., Zacharewski, T. R. & Kaminski, N. E. Comparative analysis of TCDD-induced AhR-mediated gene expression in human, mouse and rat primary B cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **316**, 95–106 (2017).

### Acknowledgements

The authors thank the Gene Expression and Oncogenesis team for helpful discussions; the CNRS UMR6290; the Rennes FHU CAMIn team. The authors thank Odessa Van Goethem from VIB Center for Cancer Biology, VIB, Leuven, Belgium for PDX experiment in mice. The authors also thank Robyn Tolhurst from MND and Neurodegenerative Diseases Research Center, Sydney and Nicolas Nottet and Bernard Mari from Institute of Molecular and Cellular Pharmacology UMR7275 CNRS, Nice. The authors acknowledge the SFR Biosit core facilities of Rennes University with the cell imaging ImPACcell (Rémy Le Guevel), Microscopy Rennes Imaging Center (MRIC) platforms. This study received financial support from the following: AVIESAN plan Cancer (ENV201308 and ENV201603), Fondation ARC (No. PGA1\*20160203868), Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) Départements du Grand-Ouest; Association “Vaincre le Cancer”, FHU CAMIn-CHU Rennes, Région Bretagne; University of Rennes 1; CNRS, Inserm. N.T. is a recipient of a doctoral fellowship from ministère de la Recherche. A.G. is a recipient of Ligue Contre le Cancer (Grand-Ouest).

### Author contributions

Conceptualization: S.C., D.G., and M.-D.G. Methodology: S.C., N.T., N.M., H.M.L., A.G., L.Ba., A.P., A.S., A.R., E.D., K.T. and D.G. Investigation: S.C., D.G., N.T., N.M., H.M.L., A.G., A.P., L.Ba., A.S., and A.B. Formal analysis: S.C., N.T., N.M., H.M.L., and D.G. Writing—original draft: S.C., D.G., and M.-D.G. Funding acquisition: S.C., D.G., and M.-D.G. Resources: L.Bo., F.R., G.J.G., J.-C.M. and M.S.D. Supervision: S.C., D.G., and M.-D.G.

### Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06951-2>.

**Competing interests:** The authors declare no competing interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

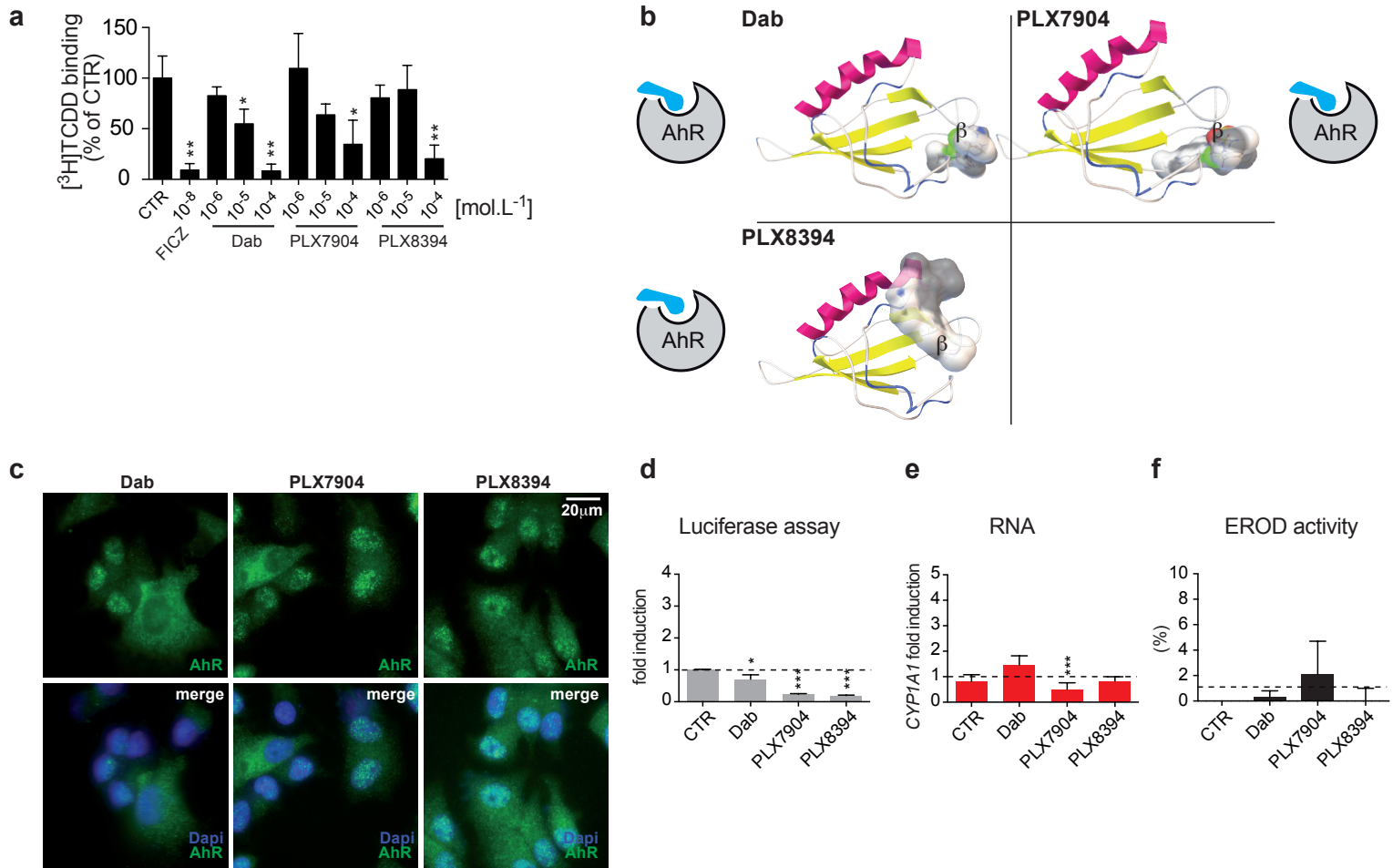
**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

# Supplementary Figure 1



**Supplementary Figure 1: BRAF-V600E inhibitors bind to AhR and antagonizes canonical AhR pathway.**

**a**, Competitive binding of FICZ, dabrafenib (Dab), PLX7904 or PLX8394 to AhR. Hepatic cytosol containing AhR was incubated with [<sup>3</sup>H]TCDD in the presence of DMSO (1%), or FICZ or increasing concentrations of BRAFi ( $10^{-6}$  to  $10^{-4}$  mol/L<sup>-1</sup>).

**b**, Proposed binding mode of Dab, PLX7904 and PLX8394 into the homology model of PAS-B of AhR. Free binding energy is reported in Table 1.

**c**, AhR nuclear translocation in response to Dab (100 nM), PLX7904 (1  $\mu$ M) or PLX8394 (1  $\mu$ M) in MCF7 cells 1 h after treatment. AhR in green (IHC) and nucleus staining in blue.

**d-f**, BRAFi do not activate canonical AhR transcriptional activity. **d**, Evaluation of AhR transcriptional activity related to AhR/ARNT binding sites (XRE) using p3XRE-luciferase constructs. MCF7 cells were exposed to Dab (100 nM), PLX7904 (1  $\mu$ M) or PLX8394 (1  $\mu$ M) or vehicle (DMSO) for 6 h.

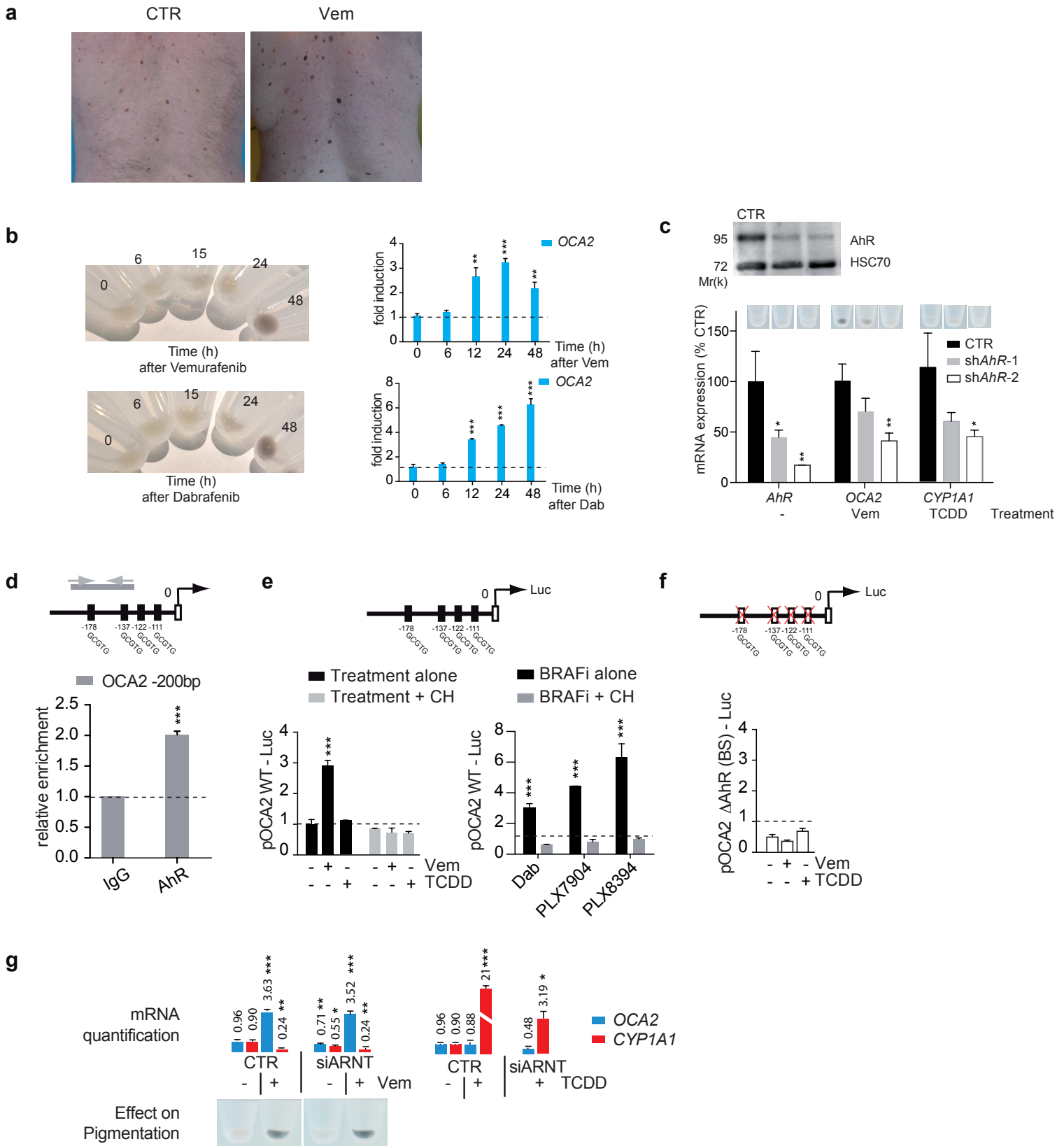
**e**, BRAFi do not induce *CYP1A1* mRNA. MCF7 cells were either untreated or treated with Dab (100 nM), PLX7904 (1  $\mu$ M) or PLX8394 (1  $\mu$ M) for 15 h.

**f**, BRAFi do not induce EROD activity. EROD enzymatic activity is associated with members of the cytochrome P450 1 family. MCF7 cells were either untreated or treated with Dab (100 nM), PLX7904 (10  $\mu$ M) or PLX8394 (10  $\mu$ M) or vehicle (DMSO) for 6 h.

For the different experiments, data are expressed in arbitrary units, comparatively with the value found in DMSO-treated cells, arbitrarily set to 1 and correspond to the means +/- s.d. of three independent experiments. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (PRISM6.0<sup>®</sup>)  
\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.



# Supplementary Figure 2



**Supplementary Figure 2: AhR-OCA2 axis is associated to pigmentation.**

**a**, Vem induces pigmentation *in vivo* Picture of nevi from patient treated with Vem.

**b**, Kinetic of 501Mel cells pigmentation and *OCA2* mRNA induction in response to Vemurafenib (1  $\mu$ M) or Dabrafenib (100 nM) exposure (in hour).

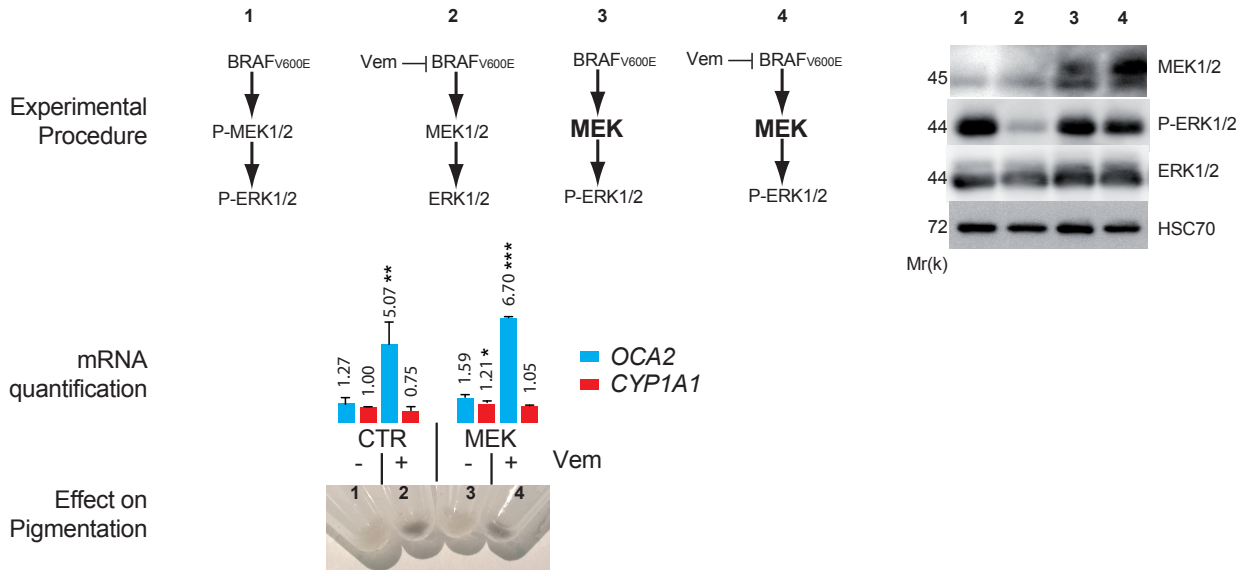
**c**, *AhR* knock down reduces *OCA2* mRNA and *CYP1A1* mRNA expression levels in 501Mel melanoma knock-downed for AhR by two shRNA in response respectively to Vem (1  $\mu$ M) and TCDD (10 nM) (48 h).

**d-f**, Vem-activated AhR induces pigmentation by transactivating *OCA2* promoter *via* AhR binding sites. **e**, For ChiP experiment, histograms represent the mean  $\pm$  s.d. relative occupancy of AhR onto *OCA2* promoter referred to non-specific IgG antibody for three independent experiments in 501Mel cell line. Promoter activity has been evaluated using pOCA2-Luc wild-type (**e**) or mutated AhR Binding sites constructs ( $\Delta$ AhR BS) (**f**) after Vem (1  $\mu$ M) or TCDD (10 nM), or vehicle (DMSO) for 6 h in the presence or absence of the specific AhR antagonist CH-223191 (10  $\mu$ M).

**g**, Pigmentation and *OCA2* induction in response to Vem depend of AhR expression level but not to ARNT. Data are representative of knock-down 501Mel cells for ARNT using siRNA targeting ARNT. Control or depleted 501Mel cells for ARNT were treated (+) with Vem (1  $\mu$ M) or TCDD (10 nM) or vehicle (-). *OCA2* and *CYP1A1* mRNA levels have been analysed using RT-qPCR. Data are expressed in arbitrary units, comparatively with the value of expression level found in vehicle-treated cells (CTR). Western blot or RT-qPCR analyses have been performed to confirm AhR depletion in cells for ARNT (data not shown).

For the different experiments, data are expressed in arbitrary units, comparatively with the value found in DMSO-treated cells (CTR), arbitrarily set to 1 and correspond to the means  $\pm$  s.d. of three independent experiments. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (PRISM6.0<sup>®</sup>) \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

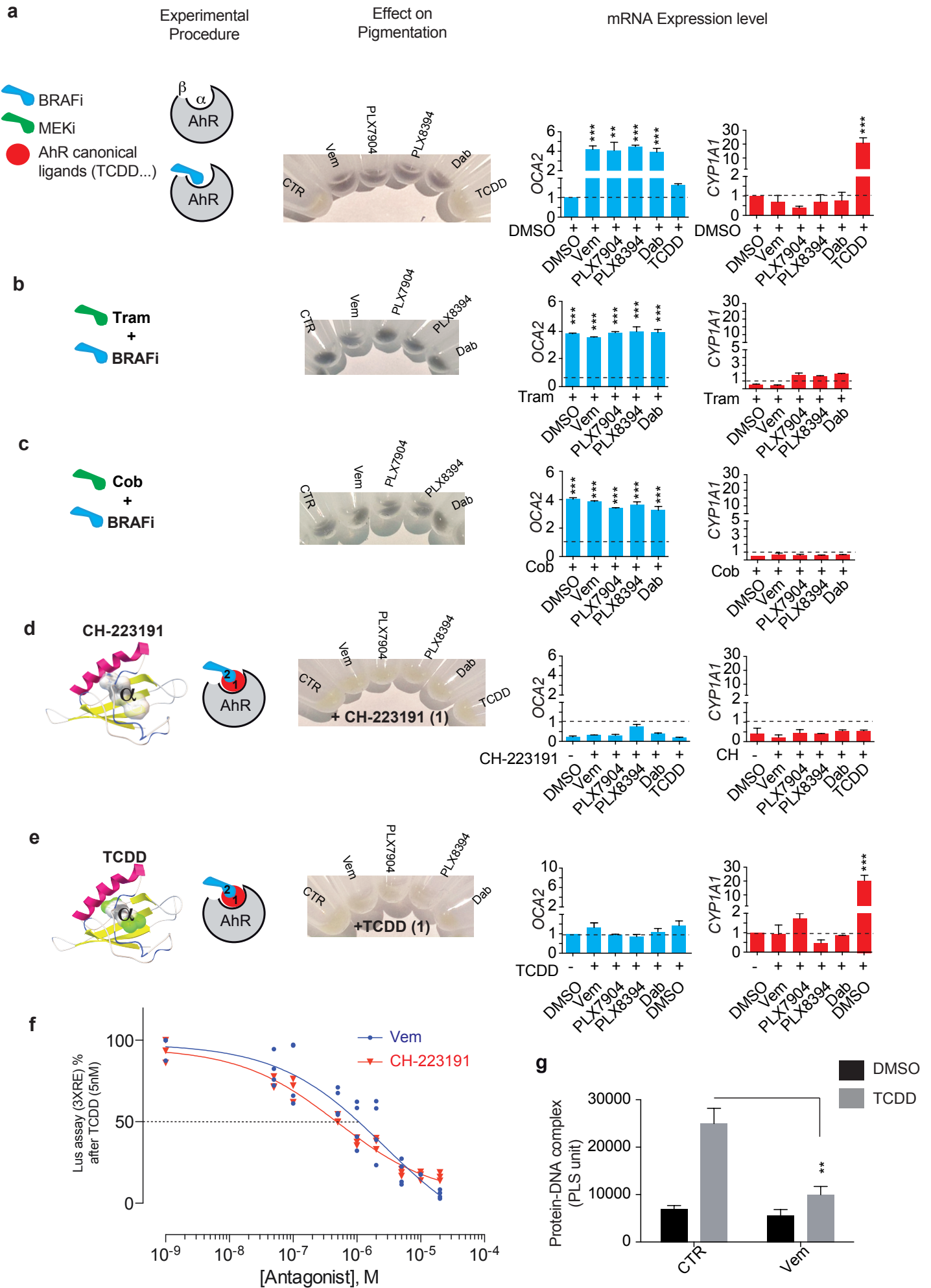
# Supplementary Figure 3



**Supplementary Figure 3: AhR reprogramming by Vem is ERK-independent.**

501Mel cells were or not transfected with dominant form of MEK kinase to prevent the effect of Vemurafenib on inhibition of MEK/ERK pathway. 24 h after transfection, 501Mel cells were untreated or treated with 1  $\mu$ M Vemurafenib (Vem) for 48 h. *OCA2* and *CYP1A1* mRNA levels were analyzed using RT-qPCR (middle). Activation or inhibition of MEK/ERK pathway was confirmed by Western blot analysis of MEK1/2, P-ERK1/2, ERK1/2, and HSC70 (as loading control) in protein extracts from treated 501Mel cells.

# Supplementary Figure 4



**Supplementary Figure 4: AhR reprogramming by BRAFi is druggable by targeting the  $\alpha$ -pocket of AhR.**

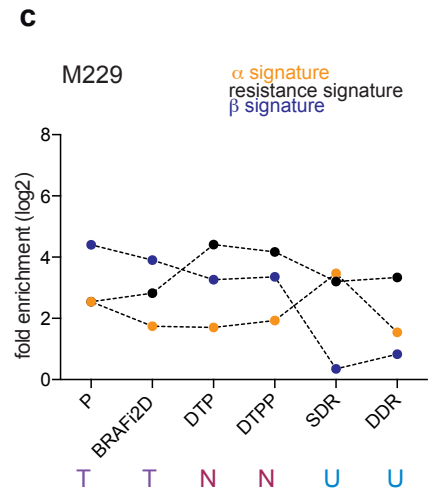
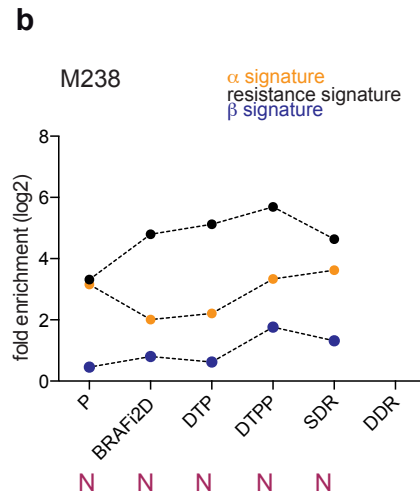
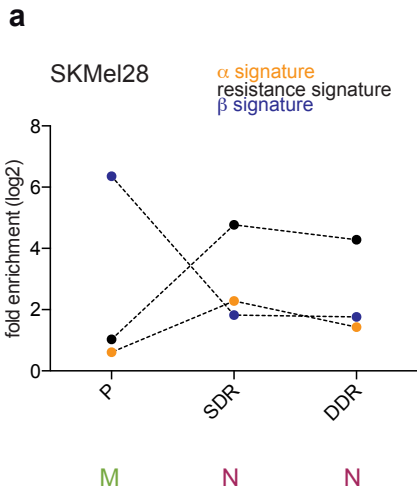
Pigmentation and *OCA2* inductions in cells exposed for 48 h to BRAFi Vemurafenib (Vem) (1  $\mu$ M), PLX7904 (1  $\mu$ M), PLX8394 (1  $\mu$ M), Dabrafenib (Dab) (100 nM) alone **(a)** or in competition with MEK inhibitors Trametinib (1  $\mu$ M) **(b)**, Cobimetinib (1  $\mu$ M) **(c)**, AhR ligands CH-223191 (10  $\mu$ M) **(d)** or TCDD (10 nM) **(e)**. BRAFi and/or MEKi alone induced *OCA2* expression and pigmentation in contrast to combination with CH-223191 or TCDD. *CYP1A1* was only induced by TCDD, a potent AhR agonist ( $\alpha$ -pocket). Pretreatment (2 h) with AhR antagonist CH-223191 ( $\alpha$ -pocket) prevented both BRAFi and TCDD effects **(d)**. Similar results have been obtained when 501Mel cells have been pre-treated with TCDD instead of AhR antagonist **(e)**. It is important to note that *CYP1A1* was not induced in this condition by TCDD (TCDD followed by BRAFi exposure). Vem could be considered as AhR antagonist considering competition assay with TCDD using p3XRE-luciferase assays.

**(f)** 501Mel cells have been transfected with p3XRE-luciferase construct and induced simultaneously with TCDD (5 nM) and increasing doses of Vem or CH-223191 to compete with AhR agonist.

**(g)** Vem prevents AhR binding on XRE motifs onto DNA induced by TCDD. *In vitro* synthesized wild-type mAhR and ARNT were incubated in the presence of solvent control (DMSO, 1%, vol/vol) or TCDD (20 nM) in the presence or not of Vemurafenib (1  $\mu$ M) for 2 to 2.5h and analysed by gel retardation assay. Gels were visualized and specific band were quantified (n=3).

For the different experiments, data are expressed in arbitrary units, comparatively with the value found in DMSO-treated cells (CTR), arbitrarily set to 1 and correspond to the means  $\pm$  s.d. of three independent experiments. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (PRISM6.0<sup>®</sup>) \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

# Supplementary Figure 5



**Supplementary Figure 5: AhR-signature correlates with resistance acquiring during after long-term treatment with single-drug (i.e. BRAFi) or double-drug (i.e. BRAFi+MEKi)**

**a-c**, Fold expression level (log<sub>2</sub>) for average  $\beta$ -,  $\alpha$ -, resistance and differentiated state signatures in parental (P) cell lines (SKMel28, M234 and M229) treated with DMSO/vehicle, temporal sub-populations (2 d, DTP, DTPP) (days to weeks on BRAFi : PLX4032), and long-term sub-lines (months to years on BRAFi or BRAFi+MEKi : PLX4032+Selumetinib) resulting in single-drug resistant (SDR) or double-drug resistant (DDR) lines. (GEO, GSE75299<sup>1</sup>). To derive DTPP clones, parental melanoma cells seeded at low density were treated with drugs as described<sup>1</sup> every 2-3 days for 3-6 weeks, SDR and DDR sub-lines were derived as described<sup>2-4</sup>.



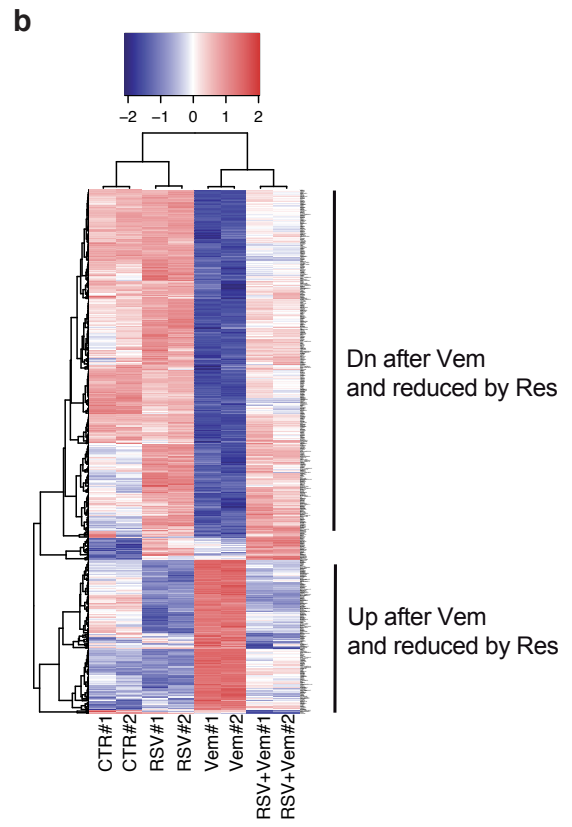
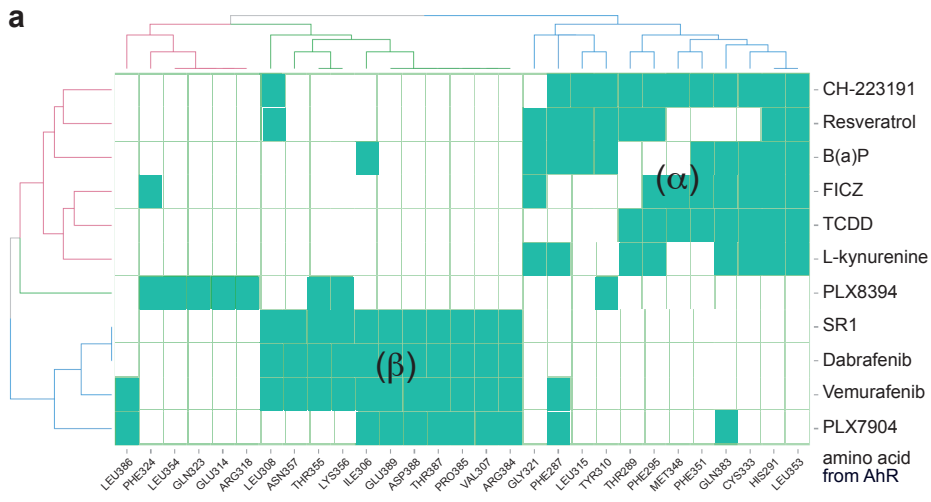


**Supplementary Figure 6: AhR binds to resistance genes promoter in response to  $\alpha$ -ligand**

**a**, Venn diagram representing the overlapping between  $\alpha$ - and  $\beta$ - or resistance genes with dataset for ChIPseq experiments performed by Mathews'lab for AhR transcription factor 45 min to 24h after induction by TCDD (10 nM) of MCF7 cells (GSE90550<sup>5</sup>).

**b**, ChiP experiment has been performed using specific AhR antibody in 501Mel cells and in knocked-down cells (as negative control) treated for 1h with TCDD (10nM) or 6h with Vem (1  $\mu$ M) (n=1). Values represent the percentage of enrichment of the transcription factor onto proximal promoter of target genes, containing XRE motifs, compared to Input.

# Supplementary Figure 7

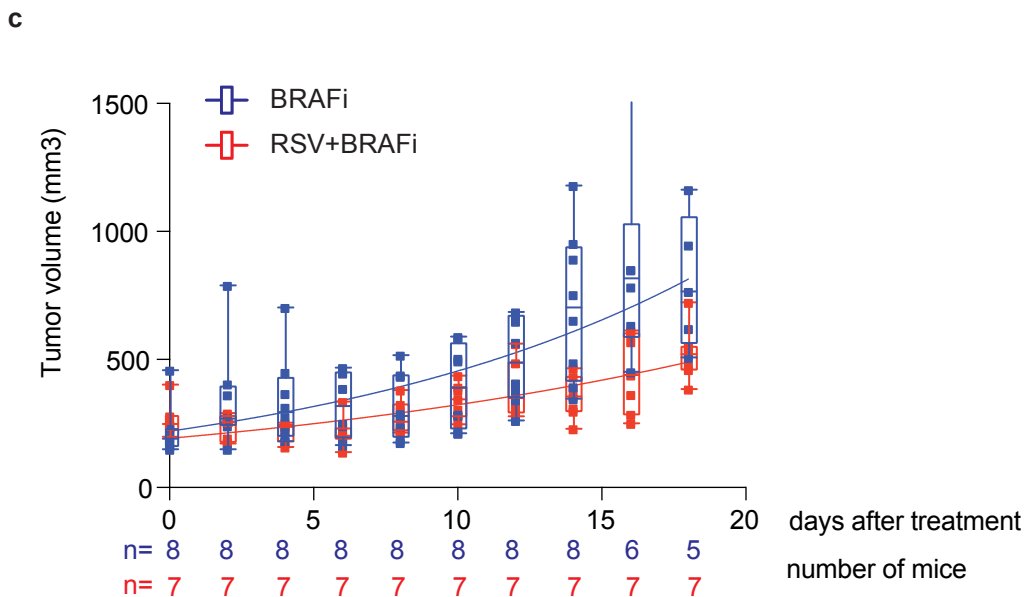
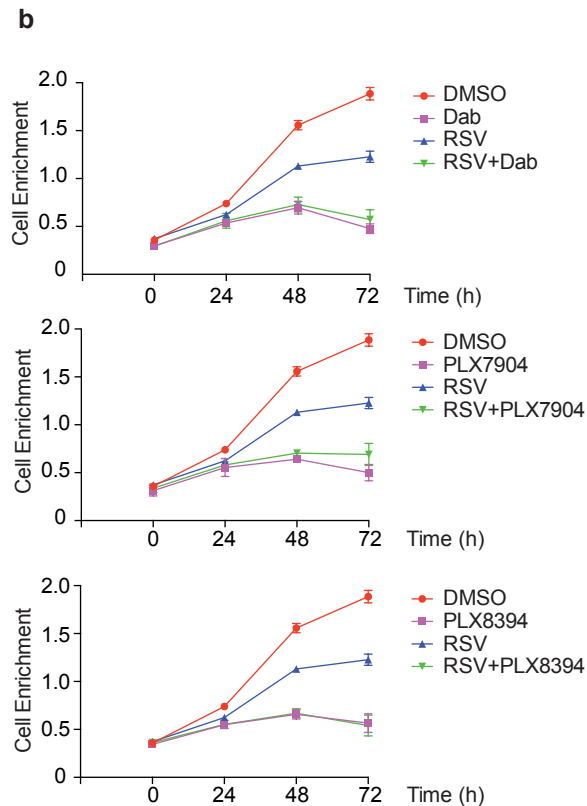
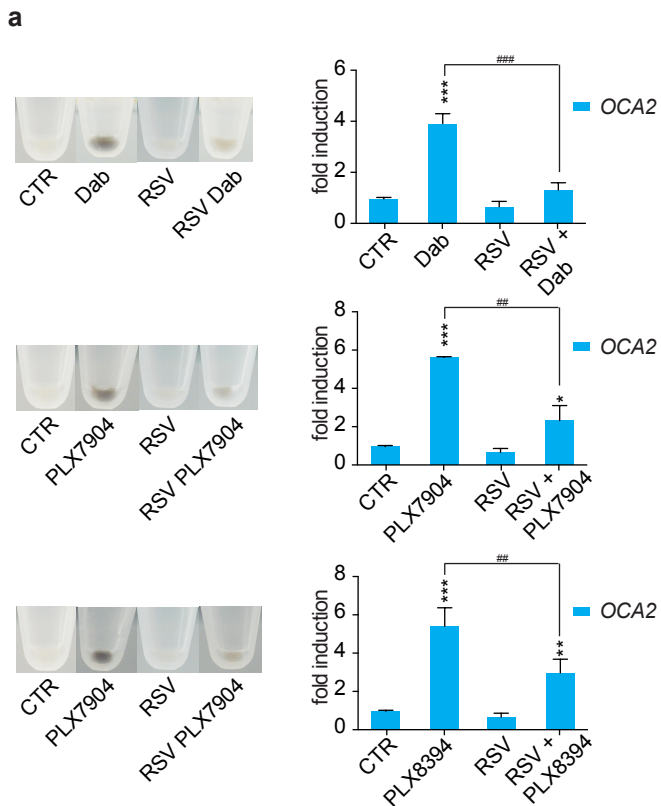


**Supplementary Figure 7: The AhR antagonist Resveratrol blocks Vem induced AhR reprogramming ( $\beta$ -signature).**

**a**, Heat map representing hierarchical clustering of AhR ligands and their putative interactions with amino-acids of PAS B domain of AhR. BRAFi clustered together.

**b**, Gene expression profile of the 501Mel cells exposed to vehicle, Vem (1  $\mu$ M), RSV (5  $\mu$ M) or RSV (5  $\mu$ M) + Vem (1  $\mu$ M) (n=2) for 48 h. Heatmap focused on differentially expressed genes in function of treatment.

# Supplementary Figure 8



**Supplementary Figure 8: Resveratrol prevents AhR reprogramming and maintains antiproliferative effects of BRAFi.**

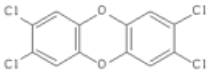
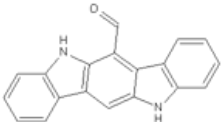

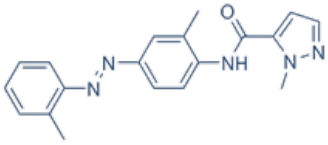
**a**, Pigmentation analyses and *OCA2* mRNA expression levels (n=3) in 501Mel cells exposed 48 h to BRAFi Dabrafenib (Dab) (100 nM), PLX7904 (1  $\mu$ M), PLX8394 (1  $\mu$ M) alone or pretreated for 2 h with RSV (5  $\mu$ M).

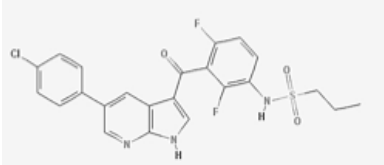
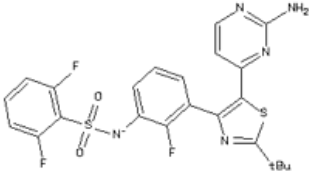
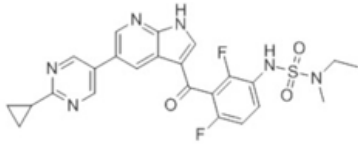
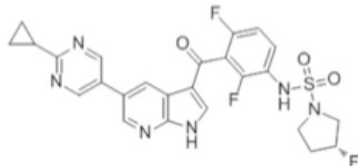
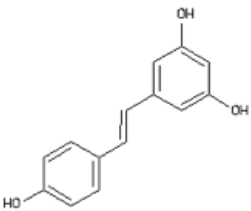
**b**, RSV preserved antiproliferative effect of BRAFi in 501Mel cells. After different days after treatment, 501Mel cell density was evaluated by methylene blue staining followed by quantification at 620 nm (n=2).

**c**, PDX tumor volumes for individual mice after daily treatment with Dabrafenib (30 mg/Kg) (n=8) or in combination with RSV (40 mg/Kg) (n=7).

## Supplementary Tables

**Supplementary Table 1** : Binding Energy of different ligands for PAS-B domain of AhR and AA close contact evaluated by docking experiments.

Chemicals		Binding Energy	H-Bond	Pi-Cation interaction	Close Contact
TCDD		-7.68			THR289 HIS291 PHE295 CYS333 HIS337 MET348 PHE351 LEU353 GLN383
FICZ		-9.38	HIS291 GLN383		HIS291 PHE295 GLY321 PHE324 CYS333 SER336 HIS337 MET348 PHE351 LEU353 GLN383
BaP		-9.22			PHE287 HIS291 LEU306 TYR310 LEU315 GLY321 CYS333 PHE351 LEU353 VAL363 GLN383
CH-223191		-8.05			PHE287 THR289 HIS291 PHE295 LEU308 TYR310 LEU315 TYR332 CYS333 SER336 HIS337 MET348 PHE351 LEU353 GLN383

Chemicals		Binding Energy	H-Bond	Pi-Cation interaction	Close Contact
Vemurafenib		-8.01	ILE306 THR387 LEU386		PHE287 ILE306 VAL307 LEU308 THR355 LYS356 ASN357 ARG384 PRO385 LEU386 THR387 ASP388 GLU389
Dabrafenib		-8.07	ILE306 THR387		ILE306 VAL307 LEU308 THR355 LYS356 ASN357 ARG384 PRO385 THR387 ASP388 GLU389
PLX7904		-6.79	ILE306 THR387 LEU386		PHE287 ILE306 VAL307 GLY309 GLN383 ARG384 PRO385 LEU386 THR387 ASP388 GLU389
PLX8394		-7.96	GLN323 THR355 His326 ILE325	ARG316	TYR310 GLU314 ARG318 GLN323 PHE324 ILE325 HIS326 ALA327 MET330 LEU354 THR355 LYS356 TRP360
Resveratrol		-6.39	CYS300 GLY321		PHE287 THR289 HIS291 PHE295 CYS300 LEU308 TYR310 LEU315 GLY321 ILE325 LEU353

common AA inside the pocket

common AA outside the pocket

common AA between AhR ligand and BRAF1



**Supplementary Table 2 : siRNA, shRNA and CRISPR Cas9 sequences.**

IDT DNA siRNA		
siCTR-siNC1	Sens 5'- 3'	CGUUAUCGCGUAUACGCGUA
mOCA2 mm.Ri.OCA2.13.1	Sens 5'- 3'	GCCCUACUAAUAAAGAUGCUGGAACCAUCUUUUUUA
hARNT hs.Ri.ARNT.13.1	Sens 5'- 3'	UACGCAUGGCAGUUUCACACAUGAA
hARNT hs.Ri.ARNT.13.3	Sens 5'- 3'	GACCUGAAAUUGUAUAGUGUUGATT

Origene shRNA human AhR		
shAhR #1	Sens 5'- 3'	CACTAGTGGAAAAGACTCTGCTACCATCCA
shAhR #2	Sens 5'- 3'	CAGCAACAGTCCTTGGCTCTGAACTCAAG
shAhR #3	Sens 5'- 3'	GTAATCAGCCTGTATTACCACAACATCCA

Sigma shRNA murin AhR		
shCTR	Sens 5'- 3'	SHC002V
shAhR TCRN0000055410	Sens 5'- 3'	CCGGGCTGGATAATTCATCTGGTTTCTCGAGAAACCAGATGAATTATCCAGCTTTTTG
shAhR TCRN0000218025	Sens 5'- 3'	GTACCGGGTCAAGCCTGTTAGCTATATTCTCGAGAATATAGCTAACAGGCTTGACTTTTTTG

CRISPR CAS9 sg sequence		
hAhR #1	Sens 5'- 3'	GGATAACTGTAGAGCAGCAA
hAhR #2	Sens 5'- 3'	CCCCTACTGAAAGAAACGGA

**Supplementary Table 3 : Primer sequences for RT-qPCR and for ChIP-qPCR.**

RT-qPCR primers						
	Genes					
Pigmentation signature	TYR	Forward	cctctagtcctcacaggtctgca	Reverse	gtgggatacgagccaattcga	
	MLANA	Forward	gagaaaaactgtgaacctgtggt	Reverse	aagggtgggtgactgttctg	
	MITF	Forward	atgctggaatgctagaatataatcactatc	Reverse	gggctgctgtatgtgtacatg	
	SLC45A2	Forward	tcactaccatgacctctc	Reverse	cccagctctagcacccaaaa	
	TRPM1	Forward	ggacatctttggtgcaacaagt	Reverse	ccacaaagtacagcatgctgat	
	MLPH	Forward	cacagttgtgacctctg	Reverse	ggcctcctcctclacatcg	
	SNCA	Forward	gagtgccattcgacgac	Reverse	ccctgtttggtttctcagc	
	Rab27a	Forward	gctgccaatgggacaaacata	Reverse	caccgttccatctgcttcat	
	GPR143	Forward	cactgatgcccatgaaaa	Reverse	tgctctggcatcagaacc	
	TYRP1	Forward	ccagaggggtctcatcatagtcaggag	Reverse	atatccagggcccgagca	
	MC1R	Forward	gctcaaggaggtgctgacat	Reverse	ctcacatcccagctgacg	
	OCA2	Forward	ggagttgaaactgaccagga	Reverse	agttcccgagcctgaagt	
	AhR signature	AhR	Forward	accagcctcaggatgtgaac	Reverse	tcattatgctgtacaagtcactgtt
CDK2		Forward	gggctcgaaatatttccaca	Reverse	cagaatctccagggaacagg	
AhRR		Forward	agagggcaccttctgcaaac	Reverse	ctcagctctgctgtatctt	
TIPARP		Forward	tctcaggctcccgtcag	Reverse	tggttccattccaataatgtg	
INHBA		Forward	agctcagacagctctaccaca	Reverse	tttctctcctctcagca	
PMAIP1		Forward	uagcgauaaacacacauca	Reverse	cuauccagcaagcucuaa	
THBS1		Forward	caatgccacagttctgatg	Reverse	tgagaccagccatcgtc	
REEP2		Forward	acgctcacggatagtgctc	Reverse	gctggagccctgggtga	
CYP1B1		Forward	acgtaccggccactatcact	Reverse	ctcagctctgcacatcagga	
OSMR		Forward	tgagttttcatcactcattca	Reverse	gatatgaatcagcatcgaggat	
CYP1A1		Forward	acctccctgatccttctgga	Reverse	gatctggagggtggctgt	
Resistant genes		BIRC3	Forward	gatgaaatgcagagctcatcaatta	Reverse	catgattgcatctctgatgg
		GCNT1	Forward	cctgacagcatgtgaagtgc	Reverse	ctgaaatgaagcagcagca
	LPAR5	Forward	aaagtgtggaagccagggta	Reverse	cactgccacccctaaagaa	
	EGFR	Forward	ttctcccagtgctgaa	Reverse	ggttcagaggctgattgtgat	
	ZEB1	Forward	ttagacacaagcgagaggatca	Reverse	tgaaatcgaattgttctaccaca	
	NRP1	Forward	aataaccacattcacaagaagattg	Reverse	tcatcaatttaattctgggtct	
	LPAR1	Forward	ccatctcactctccatccctgtaa	Reverse	actcgtgtgagaagcactgtg	
	ITGB3	Forward	cgtaaaattgaggaagaacg	Reverse	gaaggtagacgtggcctctt	
	AXL	Forward	cgtaaccctcacctgtctc	Reverse	tccatcgtctgacagca	
	NGFR	Forward	tcacccctgtctattgctcca	Reverse	gttctgctgacgctgtc	
	ITGA9	Forward	ttgtgggtgggaatcctcat	Reverse	acctcggcgaagaagc	
	SNX13	Forward	tgtaaaagatcctagttcagaggat	Reverse	gcttctgtaggagaccatt	
	PCDH7	Forward	ctaccaccagccaacacatt	Reverse	tgaaatcagccaacacag	
	BCAR3	Forward	agaaaggaggaagaggcaaga	Reverse	tctggaaggctgcaaat	
	BRI3	Forward	accgagatcctgctgacg	Reverse	cccctcttgatgatgtt	
	TEAD4	Forward	gctccggacagggagagac	Reverse	caaagctcctgccaact	
	WDR24	Forward	aaggacatcgacgagcagac	Reverse	gttgacacgttccagagg	
	MAP3K11	Forward	tgggatgactacactgcac	Reverse	tgctcctatgctcactctc	
	HMGXB3	Forward	aggggacaagtacctccagtc	Reverse	ggggtaagcaggtcaactcc	
	rRNA 18S	Forward	ccggggaggtagtgacga	Reverse	aaggattaaagtgactattcca	
	MARK3	Forward	aaaagtaaaatggcaagacatattc	Reverse	ttttgcaatttttatgcaacc	

ChIP-qPCR primers					
	Genes				
	pTIPARP	Forward	tggggagtaggcaataaaca	Reverse	ttccgagaagaccagacac
	pNRP1	Forward	aactggcgactgggaatc	Reverse	cgactcgcactctctt
	pGCNT1	Forward	ctggagtcgactgggtgat	Reverse	ggagggatcactgaacctg
	pAXL	Forward	cctgagctgagaggggag	Reverse	gtccctctgggctctgtgt
	pTEAD4	Forward	aagcgtctccaacaaggag	Reverse	acacatgccaggagctct
	pEGFR	Forward	acctggcacagatttg	Reverse	tgaggagtaattccgagagg
	pZEB1	Forward	ggcgtggactgatggta	Reverse	attctcctgtaccctgtgc
	pOCA2	Forward	gcaaggctctctgttttcca	Reverse	ccccctcttgagaatgctc

Supplementary Table 4 : Statistic data sources.

Figure 1

Figure 1a				
%	Mean	SD	n	P value
CTR	100	21,821	3	
FICZ 0,1nM	113,417	2,731	3	0,350237
FICZ 1nM	58,174	10,643	3	0,040578
FICZ 10nM	9,124	6,480	3	0,002295
FICZ 100nM	-1,157	5,525	3	0,001469
Vem 0,1mM	93,537	6,750	3	0,649736
Vem 1µM	54,926	2,209	3	0,023593
Vem 10µM	11,847	6,165	3	0,002534
Values represent % of remaining [3H]TCDD radioactivity to CTR condition				
Figure 1c				
	Median	SD	n	P value
CTR (DMSO)	5	3,158	28	
TCDD 10nM	23,5	8,656	18	<0,0001
Vem 1µM	4	2,376	21	0,0491
non-parametric two-tailed Mann Whitney test CTR vs TCDD or Vem				
Figure 1d				
	Mean	SD	n	P value
CTR (DMSO)	1	0	3	
TCDD 10nM	3,125	0,38	3	0,000634
Vem 1µM	0,458	0,024	3	<0,0001
Values represent Luciferase enrichment relative to CTR condition				
Figure 1e				
	Mean	SD	n	P value
CTR (DMSO)	1	0	6	
TCDD 10nM	20,708	3,847	6	<0,0001
Vem 1µM	0,693	0,333	6	0,047639
Relative quantitative RNA was normalized to 18S rRNA				
Values represent fold change relative to CTR condition				
Figure 1f				
	Mean	SD	n	P value
CTR (DMSO)	1	0	3	
TCDD 10nM	100	12	3	0,000139
Vem 1µM	-2,2	2,5	3	0,090913
Values % of EROD activity to TCDD induced MCF7 condition				

**Figure 2**

Figure 2h				
Cell lines	IC50	log2 fold change ( $\alpha$ signature)	log2 fold change ( $\beta$ signature)	fold change (resistance signature)
501 S	4,679E-08	1	1	1
MM001	9,143E-08	1,059203	0,9751523	2,219208
MM074 S	0,0000001	1,712855	1,252197	2,377848
Mel624	4,679E-07	1,560535	1,07601	1,67031
501 R	5,579E-07	1,611878	0,669492	3,568108
Skmel28 S	5,697E-07	1,986582	0,4181132	2,678657
MM074 R	0,000001	2,625797	0,8070144	3,875775
Skmel28 R	1,75E-06	2,227963	0,0017973	5,052008
Mel165	1,795E-06	2,985939	0,00043556	6,353109

n=1

**Figure 5**

Figure 5c			
fold enrichment vs DMSO	Mean TCDD 10nM 7J	Mean TCDD 10nM 14J	n
AhR	0,8608	2,9031	2
GCNT1	0,7411	1,3902	2
BIRC3	0,9165	2,9503	2
THBS1	2,4238	6,9312	2
AXL	7,9785	7,5228	2
ZEB1	0,8286	12,2491	2
LPAR1	1,1260	4,0799	2
TIPARP	1,4299	0,3483	2
NRP1	0,7759	1,0277	2
CYP1A1	5,8179	5,4463	2
NGFR	0,4516	5,1084	2
EGFR	2,3586	2,0499	2

Figure 5e 501Mel S					
Gene	CR-CTR		CR-AhR		n
	CTR	Vem 1 $\mu$ M	CTR	Vem 1 $\mu$ M	
AhR	1	0,828	0,311	0,529	2
BCAR3	1	1,490	4,073	2,973	2
AXL	1	0,276	1,120	0,351	2
EGFR	1	0,797	0,062	0,053	2
NRP1	1	0,783	0,949	0,464	2
TEAD4	1	0,552	0,649	0,357	2
LPAR1	1	0,554	0,005	0,015	2
GCNT1	1	0,272	0,292	0,057	2
NGFR	1	0,949	1,105	0,513	2
WDR24	1	1,185	0,627	0,745	2
RPS16	1	0,840	0,004	0,004	2
SNX13	1	1,493	1,136	1,207	2
BIRC3	1	1,138	5,512	3,103	2
ATP10A	1	1,699	0,002	0,001	2
PHB	1	1,276	0,348	0,407	2
OCA2	1	2,727	0,057	0,173	2
Mitf	1	2,054	0,357	0,806	2
TYRP1	1	3,612	0,173	0,192	2
SLC45A2	1	1,788	0,336	0,111	2
GPR143	1	1,719	0,036	0,060	2
Rab27a	1	2,226	1,428	2,313	2
MLPH	1	1,959	1,017	1,416	2
CYP1A1	1	0,192	0,796	0,337	2
AhRR	1	1,713	3,036	5,569	2
PMAIP1	1	0,324	0,294	0,172	2

Relative quantitative RNA was normalized to 18S rRNA  
 Values represent fold change relative to CTR condition

Figure 5f					
Gene	501MeI R		SKMeI28 R		n
	siAhR	siARNT	siAhR	siARNT	
AhR	0,175	0,739	0,191	0,413	2
ARNT	0,577	0,297	0,630	0,369	2
ZEB1	0,502	0,125	0,673	0,713	2
GCNT1	0,454	0,556	0,929	0,994	2
BRI3	1,086	1,224	0,739	0,790	2
BIRC3	0,178	0,539	0,656	0,469	2
PHB	0,854	0,654	0,941	0,744	2
SNX13	0,568	0,553	0,727	0,663	2
ATP10A	0,501	0,637	1,981	5,141	2
PCDH7	0,998	1,309	1,263	1,333	2
TEAD4	6,589	9,673	1,030	1,297	2
LPAR1	0,550	0,544	1,831	1,473	2
HMGXB3	0,532	0,590	0,675	0,787	2
EGFR			0,660	0,796	2
NGFR	1,361	0,652	2,806	2,535	2
AXL	0,438	1,045	0,605	0,656	2
NRP1	5,065	1,157	1,418	1,261	2
AhRR	0,867	0,985	0,781	1,325	2

Relative quantitative RNA was normalized to 18S rRNA  
Values represent fold change relative to siCTR condition (siINT1)

Figure 6

Figure 6a								
fold enrichment vs DMSO	OCA2	SD	n	P value vs CTR (DMSO)	CYP1A1	SD	n	P value vs CTR (DMSO)
Vem	4,194	0,356	3	9,961E-05	0,693	0,333	3	0,18579
PLX7904	4,079	0,842	3	3,174E-03	0,387	0,087	3	0,00026
PLX8394	4,483	0,145	3	1,990E-06	0,685	0,377	3	0,22180
Dab	3,909	0,391	3	2,080E-04	0,771	0,419	3	0,39668
TCDD	1,633	0,081	3	1,696E-04	20,708	3,847	3	0,00089
BaP	1,579	0,109	3	7,636E-04	13,392	5,022	3	0,01291
Lkyn	0,861	0,165	3	2,178E-01	0,982	0,251	3	0,90657
FICZ	1,846	0,046	3	5,891E-06	5,276	0,507	3	0,00013
CH-223191	0,226	0,054	3	1,550E-05	0,402	0,291	3	0,02362
RSV	0,960	0,057	3	2,879E-01	0,910	0,128	3	0,28786

Relative quantitative RNA was normalized to 18S rRNA

Figure 6c					
CYP1A1	Mean	SD	n	P value vs CTR	P value vs TCDD
CTR (DMSO)	0,873	0,180	3		
TCDD 10nM	9,139	1,077	3	0,0001951	
RSV 5mM	1,763	0,008	3	0,0010143	
RSV 5mM + TCDD 10nM	1,209	0,256	3	0,1365030	0,0002422

Relative quantitative RNA was normalized to 18S rRNA  
Values represent fold change relative to CTR condition

Figure 6f					
OCA2	Mean	SD	n	P value vs CTR	P value vs TCDD
CTR (DMSO)	0,960	0,057	3		
Vem 1µM	4,194	0,356	3	9,967048E-05	
RSV 5mM	0,654	0,207	3	6,898830E-02	
RSV 5mM + Vem 1mM	1,040	0,061	3	1,717660E-01	1,109420E-04

Relative quantitative RNA was normalized to 18S rRNA  
Values represent fold change relative to CTR condition



Figure 6l							
Dabrafenib (30mg/Kg daily) + RSV (40mg/kg daily)							
Days after treatment/ tumor volume (mm3)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
14	427,9034	462,071	307,4376	294,9526	384,9775	225,8256	352,0565

Figure 6m							
Dabrafenib (30mg/Kg daily) + RSV (40mg/kg daily)							
Max tumor volume/ days to reach	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
800 mm3	20	20	24	22	26	30	

### Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 1a				
%	Mean	SD	n	P value
CTR	100	21,821	3	1
FICZ 10nM	9,124	6,480	3	0,002295
Dab 1µM	82,590	8,665	3	0,268346
Dab 10µM	54,800	14,480	3	0,040358
Dab 100µM	8,257	6,845	3	0,002254
PLX7904 1µM	109,550	34,563	3	0,706421
PLX7904 10µM	63,662	10,763	3	0,060888
PLX7904 100µM	34,577	23,865	3	0,024801
PLX8394 1µM	80,469	12,622	3	0,250708
PLX8394 10µM	88,520	24,097	3	0,573809
PLX8394 100µM	20,291	13,543	3	0,005785

Values represent % of remaining [3H]TCDD radioactivity to CTR condition

Supplementary Figure 1d				
	Mean	SD	n	P value
CTR (DMSO)	1		3	
Dab 100nM	0,705	0,141	3	0,022082
PLX7904 1µM	0,232	0,022	3	<0,0001
PLX8394 1µM	0,192	0,017	3	<0,0001

Values represent Luciferase enrichment relative to CTR condition

Supplementary Figure 1e				
	Mean	SD	n	P value
CTR (DMSO)	1		6	
Dab 100nM	0,771	0,419	6	0,209559
PLX7904 1µM	0,387	0,087	6	<0,0001
PLX8394 1µM	0,685	0,377	6	<0,0001

Relative quantitative RNA was normalized to 18S rRNA  
Values represent fold change relative to CTR condition

Supplementary Figure 1f				
	Mean	SD	n	P value
CTR (DMSO)	1	0	3	
Dab 100nM	0,3	0,5	3	0,158302
PLX7904 1µM	2,1	2,6	3	0,504314
PLX8394 1µM	-1,8	2,8	3	0,158302

Values % of EROD activity to TCDD induced MCF7 condition

## Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 2b				
	Mean	SD	n	P value
0	1	0	3	
6	1,226	0,060	3	0,053706
12	2,666	0,356	3	0,001621
24	3,249	0,149	3	<0,0001
48	2,197	0,236	3	0,00143
0	1	0	3	
6	1,416	0,097	3	0,167731
12	3,430	0,060	3	<0,0001
24	4,545	0,074	3	<0,0001
48	6,275	0,476	3	<0,0001

Relative quantitative RNA was normalized to 18S rRNA  
Values represent fold change relative to CTR condition

Supplementary Figure 2c				
%	Mean	SD	n*	P value
CTR DMSO	100	29,772	2	
shAhR-1 DMSO	44,78	7,09	3	0,04457
shAhR-2 DMSO	17,18	0,84	4	0,003032
CTR Vem 1µM	100	6,71	2	
shAhR-1 Vem 1µM	69,69	13,05	3	0,104152
shAhR-2 Vem 1µM	40,69	7,76	4	0,010056
CTR TCDD 10nM	100	30,06	2	
shAhR-1 TCDD 10nM	52,82	7,76	3	0,067992
shAhR-2 TCDD 10nM	39,47	5,73	4	0,011546

n\* number of cellular clones by shRNA  
Relative quantitative RNA was normalized to 18S rRNA  
Values represent % of enrichment to CTR condition

Supplementary Figure 2d				
	Mean	SD	n	P value
IgG	1	0	3	
Ac anti-AhR	2,01	0,059	3	0,0011

Values represent relative occupancy onto OCA2 promoter to CTR condition

Supplementary Figure 2e				
	Mean	SD	n	P value
CTR	1	0	3	
Vem 1µM	2,89	0,17	3	<0,0001
TCDD 10nM	1,171	0,19	3	0,212
CH-223191 10µM	0,833	0,14	3	
CH-223191 10µM + Vem 1µM	0,724	0,141	3	0,254
CH-223191 10µM + TCDD 10nM	0,68	0,061	3	0,013
Dab 100nM	3,032	0,263	3	0,000181
PLX7904 1µM	4,422	0,020	3	<0,0001
PLX8394 1µM	6,323	0,874	3	0,000456
CH-223191 10µM + Dab 100nM	0,623	0,017	3	<0,0001
CH-223191 10µM + PLX7904 1µM	0,804	0,159	3	0,769766
CH-223191 10µM + PLX8394 1µM	0,995	0,068	3	0,015179

Values represent Luciferase enrichment relative to CTR condition



Supplementary Figure 2f				
	Mean	SD	n	P value
CTR	0,477	0,087	3	
Vem 1µM	0,339	0,039	3	0,066821
TCDD 10nM	0,69	0,191	3	0,156043

Values represent Luciferase enrichment relative to CTR condition

Supplementary Figure 2g					
	Mean	SD	n	P value	
CTR DMSO	0,961	0,055	3		OCA2
CTR Vem 1µM	3,626	0,166	3	<0,0001	
siARNT DMSO	0,705	0,020	3	0,001555	
siARNT Vem 1µM	3,515	0,358	3	0,000258	
CTR TCDD 10nM	1	0,073	3	0,181298	
siARNT TCDD 10nM	0,488	0,088	3	0,001376	
CTR DMSO	0,901	0,140	3		CYP1A1
CTR Vem 1µM	0,237	0,010	3	0,001197	
siARNT DMSO	0,553	0,092	3	0,022754	
siARNT Vem 1µM	0,238	0,016	3	0,001219	
CTR TCDD 10nM	20,68	2,518	3	0,00017	
siARNT TCDD 10nM	3,19	1,433	3	0,051182	

Relative quantitative RNA was normalized to 18S rRNA

Values represent fold change relative to CTR condition

### Supplementary Figure 4

Supplementary Figure 4 OCA2 expression					
		Mean	SD	n	P value
Fig 4a	CTR (DMSO)	1	0	6	
	Vem 1µM	4,194	0,356	6	<0,0001
	PLX7904 1µM	4,079	0,842	6	<0,0001
	PLX8394 1µM	4,483	0,145	6	<0,0001
	Dab 100nM	3,909	0,391	6	<0,0001
	TCDD 10nM	1,633	0,081	6	<0,0001
Fig 4b	<b>Tram 1µM (co-treatment)</b>				
	CTR (DMSO)	3,882	0,078	3	<0,0001
	Vem 1µM	3,470	0,052	3	<0,0001
	PLX7904 1µM	4,009	0,123	3	<0,0001
	PLX8394 1µM	4,128	0,569	3	<0,0001
	Dab 100nM	4,028	0,350	3	0,00012
Fig 4c	<b>Cob 1µM (co-treatment)</b>				
	CTR (DMSO)	4,025	0,113	3	<0,0001
	Vem 1µM	3,862	0,060	3	<0,0001
	PLX7904 1µM	3,658	0,190	3	<0,0001
	PLX8394 1µM	3,251	0,271	3	<0,0001
	Dab 100nM	3,402	0,036	3	<0,0001
Fig 4d	<b>CH-223191 10µM (2h before)</b>				
	CTR (DMSO)	0,226	0,054	3	<0,0001
	Vem 1µM	0,322	0,008	3	<0,0001
	PLX7904 1µM	0,305	0,053	3	<0,0001
	PLX8394 1µM	0,765	0,103	3	<0,0001
	Dab 100nM	0,381	0,052	3	<0,0001
TCDD 10nM	0,194	0,023	3	<0,0001	
Fig 4e	<b>TCDD 10nM (2h before)</b>				
	CTR (DMSO)	1	0	3	
	Vem 1µM	1,317	0,243	3	0,010665
	PLX7904 1µM	0,965	0,015	3	<0,0001
	PLX8394 1µM	0,849	0,119	3	0,012332
	Dab 100nM	1,102	0,171	3	0,160549
TCDD 10nM	1,633	0,081	6	<0,0001	

Supplementary Figure 4 CYP1A1 expression					
		Mean	SD	n	P value
Fig 4a	DMSO	1	0	6	
	Vem 1µM	0,693	0,333	6	0,047639
	PLX7904 1µM	0,387	0,087	6	<0,0001
	PLX8394 1µM	0,685	0,377	6	0,068138
	Dab 100nM	0,771	0,419	6	0,209559
	TCDD 10nM	20,708	3,847	6	<0,0001
Fig 4a	<b>Tram 1µM (co-treatment)</b>	Mean	SD	n	P value
	DMSO	0,572	0,033	3	<0,0001
	Vem 1µM	0,418	0,092	3	0,000390
	PLX7904 1µM	1,802	0,217	3	0,003044
	PLX8394 1µM	1,636	0,051	3	<0,0001
	Dab 100nM	1,922	0,059	3	<0,0001
Fig 4a	<b>Cob 1µM (co-treatment)</b>	Mean	SD	n	P value
	DMSO	0,547	0,000	3	<0,0001
	Vem 1mM	0,688	0,203	3	0,056414
	PLX7904 1mM	0,605	0,133	3	0,006688
	PLX8394 1mM	0,614	0,025	3	<0,0001
	Dab 100nM	0,659	0,036	3	<0,0001
Fig 4a	<b>CH-223191 10µM (2h before)</b>	Mean	SD	n	P value
	DMSO	0,402	0,291	3	<0,0001
	Vem 1µM	0,216	0,128	3	<0,0001
	PLX7904 1µM	0,452	0,165	3	<0,0001
	PLX8394 1µM	0,415	0,003	3	<0,0001
	Dab 100nM	0,552	0,054	3	<0,0001
	TCDD 10nM	0,556	0,040	3	<0,0001
Fig 4a	<b>TCDD 10nM (2h before)</b>	Mean	SD	n	P value
	DMSO	1	0	3	
	Vem 1mM	0,917	0,482	3	0,663347
	PLX7904 1mM	1,740	0,527	3	0,007485
	PLX8394 1mM	0,475	0,156	3	<0,0001
	Dab 100nM	0,864	0,003	3	<0,0001
	TCDD 10nM	20,708	3,847	6	<0,0001

Supplementary Figure 4f Competition assay using XRE luc after activation by TCDD (5nM)							
% XRE Luc activity compared to control (TCDD 5nM alone)							
Antagonist concentration (M)	Vemurafenib				CH-223191		
0,00E+00	87,4451	100	100,0296	100	100	85,99702	93,45161
5,00E-08	94,48193	72,20885	75,83105	82,40413	71,51735	70,93938	77,71037
1,00E-07	61,27043	96,75644	97,21919	65,9942	72,15801	76,21183	61,91182
5,00E-07	54,39727	67,59219	71,03971	55,21734	49,78279	49,9878	54,46649
1,00E-06	32,22122	62,25197	58,39666	40,73503	37,57643	40,193	35,33511
2,00E-06	23,34847	62,62482	58,2317	38,994	38,0734	32,97725	39,82437
5,00E-06	13,19083	22,54103	27,29546	11,5572	16,66262	20,88602	18,82049
1,00E-05		17,6874	17,58166		13,87465	17,51776	19,2419
2,00E-05	4,012937	6,330139	8,372258	2,850804	13,69989	16,12879	18,89792

Supplementary Figure 4f XRE binding assay (PLS unit)								
	Competition with DMSO				Competition with Vem (1 µM)			
	Mean	SD	n	P value	Mean	SD	n	P value
CTR (DMSO)	6899,94	775,1472	3		5545,36	1294,875	3	
TCDD	24952,97	3224,679	3	0,19500	9952,193	1755,89	3	0,00210

## Supplementary Figure 6

Supplementary Figure 6b				
	CTR	Vem (1 $\mu$ M) for 6h	TCDD (10nM) for 1h	AhR KO
TIPARP	1,04	1,18	9,63	0,53
NRP1	4,61	5,77	52,31	0,02
GCNT1	1,49	1,51	9,79	0,04
TEAD4	7,99	2,57	20,12	0,00
EGFR	0,09	0,09	0,09	0,09
ZEB1	0,12	0,12	0,12	0,12

Values represent relative occupancy of AhR (%) onto different genes promoter compared to Input (10%) (n=1)

## Supplementary Figure 8

Supplementary Figure 8a					
OCA2	Mean	SD	n	P value vs CTR	P value vs BRAFi
CTR (DMSO)	0,910	0,128	3		
Dab 100nM	3,909	0,391	3	0,000205	
RSV 5mM	0,654	0,207	3	0,068988	
RSV 5mM + Dab 100nM	1,306	0,285	3	0,107584	0,000735
CTR (DMSO)	0,910	0,128	3		
PLX7904 1 $\mu$ M	5,626	0,028	3	<0,0001	
RSV 5mM	0,654	0,207	3	0,068988	
RSV 5mM + PLX7904 1mM	2,313	0,793	3	0,041923	0,001938
CTR (DMSO)	0,910	0,128	3		
PLX8394 1 $\mu$ M	5,397	0,972	3	0,001398	
RSV 5mM	0,654	0,207	3	0,068988	
RSV 5mM + PLX8394 1mM	2,963	0,720	3	0,0085964	0,025281

Relative quantitative RNA was normalized to 18S rRNA

Values represent fold change relative to CTR condition

Supplementary Figure 8b				
	Mean	SD	n	
0h	0,357	0,023	4	CTR (DMSO)
24h	0,739	0,034	4	
48h	1,557	0,049	4	
72h	1,886	0,066	4	
0h	0,298	0,032	4	Dab 100nM
24h	0,536	0,034	4	
48h	0,697	0,065	4	
72h	0,478	0,051	4	
0h	0,372	0,028	4	RSV 5mM
24h	0,624	0,027	4	
48h	1,131	0,019	4	
72h	1,228	0,059	4	
0h	0,295	0,031	4	RSV 5mM + Dab 100nM
24h	0,560	0,077	4	
48h	0,729	0,077	4	
72h	0,573	0,102	4	
0h	0,313	0,055	4	PLX7904 1 $\mu$ M
24h	0,555	0,093	4	
48h	0,641	0,020	4	
72h	0,501	0,086	4	
0h	0,337	0,044	4	RSV 5mM + PLX7904 1mM
24h	0,581	0,037	4	
48h	0,704	0,036	4	
72h	0,691	0,116	4	
0h	0,344	0,010	4	PLX8394 1 $\mu$ M
24h	0,549	0,006	4	
48h	0,657	0,049	4	
72h	0,566	0,097	4	
0h	0,362	0,013	4	RSV 5mM + PLX8394 1mM
24h	0,552	0,044	4	
48h	0,670	0,048	4	
72h	0,541	0,109	4	

Supplementary Figure 8c								
Days after treatment/ tumor volume (mm3)	Dabrafenib (30mg/Kg daily)							
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
0	228,5784	145,9038	163,8505	453,9627	155,5811	192,3251	181,9278	212,3261
2	400,5609	236,715	273,5388	785,0981	256,5916	253,1611	358,7481	145,4938
4	445,3407	213,7754	309,2954	699,532	177,139	273,0444	362,9818	193,5539
6	446,8115	161,346	443,423	463,8883	246,3018	383,0661	237,6396	177,0281
8	513,4908	171,8426	284,6789	431,2435	181,2704	267,6297	435,4947	232,2182
10	586,1133	278,1571	500,9821	579,2245	207,8737	210,371	490,1361	281,6341
12	563,4523	376,8195	646,1647	673,1277	338,8754	404,3548	681,4609	258,4264
14	649,7568	748,9422	1175,886	949,5294	482,5809	389,1881	888,3819	342,974
16	847,4342	779,0064		1553,923	447,7659	629,5346		847,3161
18	761,9802	1159,95			616,3477	504,2755		943,5343

Supplementary Figure 8c							
Days after treatment/ tumor volume (mm3)	Dabrafenib (30mg/Kg daily) + RSV (40mg/kg daily)						
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
0	221,4501	194,1715	275,3976	224,8464	398,1097	244,3485	244,1665
2	257,4719	189,4749	168,3477	286,4874	250,3039	174,2905	275,6007
4	237,0102	232,694	177,4051	218,9116	248,9659	154,4211	240,943
6	188,7079	186,8194	198,6457	332,4404	215,6226	134,3872	226,298
8	321,1533	219,9162	297,2921	210,2907	221,5042	377,3848	253,0369
10	375,9003	388,4406	301,4202	433,4024	340,393	274,9919	243,5691
12	274,3714	399,4749	321,6159	557,6225	483,5854	289,065	345,9168
14	427,9034	462,071	307,4376	294,9526	384,9775	225,8256	352,0565
16	609,4879	597,6372	281,6883	565,3165	435,1711	359,6186	247,3423
18	545,4904	719,8815	544,3751	517,2294	471,3379	456,4025	380,7241



## II- Le facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor participe au changement de phénotype associé à l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome

**Nina Tardif\***, Anaïs Paris\*, Héloïse M. Leclair, Marie-Dominique Galibert & Sébastien Corre

*Manuscrit en préparation*

Environ 50% des patients atteints de mélanome métastatique sont porteur de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> et sont en conséquence traités par des inhibiteurs de la voie des MAPK : les inhibiteurs de BRAF (BRAFi) combinés aux inhibiteurs de MEK (MEKi). Ces thérapies ciblées engendrent des réponses à court terme impressionnantes et permettent une amélioration significative de la survie sans progression des patients. Malheureusement des mécanismes de résistance se développent invariablement, limitant l'efficacité thérapeutique de ces molécules et engendrant des rechutes pour 95% des patients.

Des études récentes, utilisant des techniques modernes comme le single-cell RNAseq, ont mis en évidence l'importance de l'hétérogénéité intra-tumorale ainsi que de la plasticité cellulaire dans la résistance aux BRAFi. Ainsi, il a été démontré que la résistance passe par la transition d'un phénotype prolifératif et différencié vers un phénotype invasif et indifférencié. Nous avons précédemment montré (Résultats I) que AhR était impliqué dans la résistance et contrôlait une signature génétique associée à l'invasion et la dédifférenciation. Dans ce contexte, nous cherchons ici à impliquer plus spécifiquement AhR dans l'acquisition du phénotype invasif par switch phénotypique des cellules de mélanome résistantes aux BRAFi.

Grâce à l'établissement de lignées cellulaires de mélanome humaines invalidées pour AhR (CRSIPR-Cas9), sensibles (S) ou résistantes (R) aux BRAFi, nous avons pu dans un premier temps démontrer que l'absence d'expression d'AhR (AhR KO) augmentait non seulement la sensibilité aux BRAFi mais diminuait également les propriétés migratoires (test de blessure) et invasives (sphéroïdes). Ce qui s'observe au niveau phénotypique est confirmé au niveau transcriptomique : les cellules R AhR KO voient leur signature génétique invasion / dédifférenciation baisser au profit de l'augmentation d'une signature prolifération / différenciation. En croisant plusieurs bases de données d'expression, nous avons ensuite créé

une signature transcriptomique associée non seulement à la résistance aux BRAFi mais également régulée par AhR. L'expression élevée de cette signature avant traitement chez les patients corrèle à une plus faible survie (data TCGA).

Après avoir établi que l'activité d'AhR contrôlait l'expression de nombreux gènes associés à l'acquisition de la résistance aux BRAFi, nous nous sommes demandé si cela pouvait être dû à la régulation par AhR d'un facteur de transcription clé associé à la sensibilité et la différenciation des mélanocytes : le facteur de transcription Microphthalmia (MITF). Par différentes expériences *in vitro*, nous avons ainsi déterminé qu'il existe une balance d'expression entre MITF et AhR : si la perte totale d'AhR ne semble pas entraîner d'augmentation de MITF, un état AhR<sup>low</sup> entraîne quant à lui l'augmentation de l'expression de MITF (MITF<sup>high</sup>). Ainsi, l'augmentation de l'expression d'AhR dans les lignées résistantes aux BRAFi entraîne l'inhibition de l'expression de MITF et donc le passage d'un phénotype prolifératif à un prolifératif invasif.

Afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs de BRAF, nous proposons d'inhiber l'activation d'AhR par l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine chaperonne Hsp90. En absence de Hsp90, AhR est dans une conformation non stable et est dégradé, et son activation canonique est donc empêchée.

# **Aryl hydrocarbon Receptor transcription factor promotes “phenotype switching” during acquisition of BRAFi-resistance of melanoma.**

Nina Tardif\*<sup>1</sup>, Anaïs Paris\*<sup>1</sup>, Héroïse M. Leclair<sup>1</sup>, Marie-Dominique Galibert<sup>1,2</sup>, Sébastien Corre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) – UMR6290, F-35000 Rennes, France.

<sup>2</sup>Hospital University of Rennes (CHU Rennes), Department of Molecular Genetics and Genomics, F-35000 Rennes, France.

\*Co-first authors.

†Co-last authors.

\*These authors contributed equally to this work.

#Corresponding authors ([sebastien.corre@univ-rennes1.fr](mailto:sebastien.corre@univ-rennes1.fr); [mgaliber@univ-rennes1.fr](mailto:mgaliber@univ-rennes1.fr))



## **Abstract**

The use of BRAF inhibitors, specific of the BRAF<sup>V600E</sup> mutation, as a therapeutic strategy for melanoma has significantly improved patient survival. However, resistance mechanisms appear systematically and limit the benefit of treatment. Among the identified mechanisms, phenotypic plasticity under the control of transcriptional expression program participates in the acquisition of resistance. We previously involved the transcription factor AhR in the control of BRAFi sensitivity and resistance. In this study we show that AhR indeed participates in BRAFi resistance, but more specifically that it is associated with the acquisition of an invasive and a dedifferentiated melanoma phenotype by controlling the expression of specific genes. Interestingly, this phenotypic change is associated with a cross-regulation of expression level and activity of MITF and AhR transcription factors, which are in balance according to melanoma phenotype. While a MITF<sup>high</sup>/AhR<sup>low</sup> phenotype is associated with sensitivity and proliferation of melanoma cells, at the opposite a MITF<sup>low</sup>/AhR<sup>high</sup> phenotype drives resistant and invasive state responsible for metastasis and relapses. Loss of AhR expression in BRAFi-resistant cells leads to the reactivation of MITF transcription factor and so to the recovery of a BRAFi-sensitive state. It is thus possible to recover sensitivity to BRAFi in melanoma. By preventing AhR expression/activation (chemically or genetically), it is thus possible to prevent the acquisition of the invasive phenotype and maintain a MITF-associated transcriptomic program, associated with BRAFi sensitivity.

## Introduction

Approximately half of the patients diagnosed with metastatic melanoma harbor an activating mutation in BRAF (Davies et al. 2002), most commonly T1799A. This encodes the BRAF<sup>V600E</sup> protein, which renders these patients eligible for treatment with selective BRAF inhibitors (BRAFi) (Vemurafenib (Bollag et al. 2010), Dabrafenib (Hauschild et al. 2012), Encorafenib (Koelblinger, Thuerigen, and Dummer 2018)). These therapies are currently used in combination with MEK inhibitors (MEKi) (respectively Cobimetinib (Larkin 2014), Trametinib (Robert et al. 2015; Salama and Kim 2013; Daud et al. 2017), Binimetinib (Dummer et al. 2018; Shirley 2018)). Patients under such therapy elicit partial or complete tumor regression. Despite these promising results, while some patients show remarkable durable responses to BRAF inhibition (BRAFi), the majority of them shows an initial but transient response followed by the development of resistance leading to the relapse after a median of ~5–7 months, ultimately leading to patient's death (Chapman et al. 2011; Hauschild et al. 2012). Many resistance mechanisms have been identified in the last decade, involving the reactivation of signaling pathways such as the MAPK pathway and the PI3K/AKT pathway, along with the upregulation of tyrosine kinase receptors (TKR) (EGFR, IGF1R, PDGFR, AXL...) (Arozarena and Wellbrock 2017). The ERK pathway interacts with other pathways, such as WNT/ $\beta$ -catenin (Chen et al. 2017), c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Titz et al. 2016), Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) (Müller et al. 2014; Noguchi et al. 2017; Wellbrock and Marais 2005), which may collaborate to maintain ERK activity under drug pressure. Such networks of signaling pathways are complex and are starting to emerge in the literature.

In parallel with the reactivation of cellular pathways during the acquisition of BRAFi resistance, various studies have involved the phenotype switching of melanoma cells as an escape route (Kemper et al. 2014; Hoek and Goding 2010). Under the control of microenvironment or intrinsic cell factors and because of melanoma plasticity (Tsoi et al. 2018; Rambow et al. 2018), melanoma cells by switching from a proliferative to invasive state can acquire resistance to targeted therapies. These changes are associated with a process of dedifferentiation similar to the epithelial-to-mesenchymal-like (EMT-like) transition promoting metastasis spreading (Cohen-Solal, Kaufman, and Lasfar 2017). These changes of phenotype are under the control of genetic expression by different key transcription factors such as MITF (Cohen-Solal, Kaufman, and Lasfar 2017) (Invasive<sup>low</sup> phenotype/ proliferative<sup>high</sup> phenotype) (Müller et al. 2014; Tirosh et al. 2016; Wellbrock et al. 2015), RUNX2 (Boregowda et al. 2016), STAT3-PAX3 axis (Smith et al. 2016a), YAP/TAZ (Hugo et al. 2015), GLI1/2 (Faião-Flores et al. 2017), TEAD4 (Verfaillie et al. 2015), C-JUN (Titz et al. 2016), SMAD3...

We have recently involved the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) transcription factor in the acquisition of resistance during melanoma treatment by BRAFi. While AhR induces after its direct activation by BRAFi an expression program associated with the sensitive/differentiated state of melanoma cells, canonical activation of AhR switch to an expression program associated with resistant/dedifferentiated state of cells (Corre et al. 2018). By targeting AhR canonical activity using specific AhR antagonist, it is thus possible to propose new therapeutic strategies in combination with BRAFi so to avoid resistant mechanisms and delay patient relapses. To decipher the role of AhR in the phenotype switch, we analysed genes expressions data from different models for metastatic melanoma and patients in order to establish different transcriptomic signatures that are respectively associated with BRAFi-sensitivity (proliferation, differentiation, epithelial) or acquisition of BRAFi-resistance (invasion, dedifferentiation, mesenchymal). These genes participate to the “phenotype switching” and BRAFi resistance acquiring during melanoma treatment. Here, we also directly involved the AhR transcription factor in the regulation of the expression of these genes and in the acquisition of resistant and invasive phenotype of melanoma. There is emerging evidence that in the context of acquired resistance, canonical activation of AhR not only promotes resistance to BRAFi but also promotes dedifferentiation of melanoma cells and increases invasiveness favourable to further dissemination and metastasis. This phenotype switching is under the control of finely regulated gene expression through cross-regulation of the level and activity of both AhR and MITF transcription factors that are in balance in melanoma cells. It is thus possible to counteract the phenotype switch of melanoma cells by specifically targeting AhR protein level by chemical strategies against the HSP90/p23/XAP2 complex that is required to protect itself from proteasomal degradation. Such therapeutic (HSP90 inhibitors) opportunities have already been tested *in vitro* with success in combination with BRAFi during melanoma treatment (Acquaviva et al. 2014; Zhang et al. 2016; Eroglu et al. 2018; Azimi et al. 2018) but didn’t go further with clinical trial because of a poor benefit for patients and severe grade 3-4 toxicity. Nonetheless, targeting specifically AhR protein level seems to be promising in combination with classical targeted therapies (BRAFi, BRAFi/MEKi) in order to revert phenotype switching during resistance acquiring of melanoma.

## **Results**

### **AhR is involved in the acquisition of an invasive phenotype.**

BRAFi-sensitivity is associated with a proliferative and differentiated cell state while BRAFi-resistance with an invasive and dedifferentiated phenotype (Tsoi et al. 2018). Because AhR is markedly expressed in highly dedifferentiated, resistant and invasive melanoma cells (Corre et al. 2018), we studied the role of AhR in controlling cell migration and invasion. First, we confirmed the role of AhR in the control of BRAFi-resistance. Indeed, knockout of AhR expression by CRISPR Cas9 (AhR KO) (Supplemented Fig 1A) significantly increased sensitivity of the human melanoma cell line SKMel28 cells resistant to BRAFi (SK28R) after treatment by the different BRAF inhibitors (Vemurafenib, Dabrafenib and Encorafenib) (Fig. 1A). We then performed wound healing assays to evaluate the role of AhR transcription factor on cell migration of SKMel28 sensitive (SK28S) or resistant (SK28R) to BRAFi after genetic depletion of AhR (SK28S/R KO) (Fig. 1B) or chemical inhibition of AhR using the specific antagonist CH-223191 (CH, 10 $\mu$ M) (Fig. 1C). SK28S cells migrated more rapidly than SK28R cells and loss or inhibition of AhR significantly reduced the ability of cells to migrate (Fig. 1B and Fig. 1C). Then, we analyzed the effect of AhR modulation on the invasive potential of SK28S and SK28R melanoma cell lines using spheroids assays, that mimic the 3D architecture of melanoma. We confirmed that BRAFi-resistant cells are highly invasive, much more than the sensitive's ones (Fig. 1D). Lack of AhR transcription factor significantly reduced invasion of SK28R after 4 days in a collagen matrix (Fig. 1D). We also performed comparable experiments using CH, the AhR antagonist. Specific inhibition of AhR reduced significantly the invasive ability of BRAFi-resistant SK28 cells but had no effect on AhR KO cells (Fig. 1E).

### **AhR directs dedifferentiated and invasive states associated with BRAFi-resistance of melanoma cells and patients**

Sensitivity of melanoma cells to BRAFi has been associated with a highly differentiated cell state (i.e., MITF<sup>high</sup> or pigmentation signature) (Rose et al. 2016; Smith et al. 2016b; Rambow et al. 2018), also favoured by the non-canonical activation of AhR transcription factor by BRAFi (beta  $\beta$ -signature) (Corre et al. 2018). Considering proliferative and differentiated states of melanoma cells correspond to BRAFi-sensitivity while invasive and dedifferentiated states correspond to BRAFi-resistance, we first showed in different Vem-sensitive (green) or -resistant (red) melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) RNAseq dataset (Barretina et al. 2012) that the expression for different genes signatures (established by the median of expression for specific genes, see Table 1) (Proliferative, Melanocytic, Transitory

vs Invasive, Neural crest-like, Undifferentiated) match respectively with the beta  $\beta$ - or the alpha  $\alpha$ -AhR signatures (Corre et al. 2018)) and resistant signatures (Fig. 2A). Whereas the  $\beta$ -signature was highly represented in the proliferative, differentiated (Melanocytic and Transitory (Tsoi et al. 2018)) and BRAFi-sensitive cell lines, the  $\alpha$ -signature was most prominent in dedifferentiated (Neural crest-like and Undifferentiated (Tsoi et al. 2018)) BRAFi-resistant lines and co-occurred with the resistance signature (Fig. 2A). Moreover, the  $\alpha$ - and resistance-signatures significantly overlapped with the invasive genes expression signature (Verfaillie et al. 2015) (Supplemented Fig. 1B) and dedifferentiated cell states (Supplemented Fig. 1C) in accordance with the expression data from the recently published Graeber's melanoma data sets (Tsoi et al. 2018). To further characterize these cell sub-populations, we investigated publicly available single-cell analyses that were more informative than bulk analyses (Tirosh et al. 2016) (Supplemented Fig. 1D). As anticipated, cells expressing an  $\alpha$ -signature (15%) are representative of neural crest-like and undifferentiated states but not entirely to the invasive state.

Having established that AhR-signatures discriminate cell differentiation states and sensitivity/resistance to BRAFi in melanoma cells, we explored all these signatures in SK28S and SK28R melanoma cell lines after or not genetic depletion of AhR (SK28S/R KO). Analysis of gene expression for the different signatures have been performed using expression data obtained after RNAseq in the different cell lines SK28S and SK28R expressing or not the AhR (Fig. 2B-D and Supplemented Fig. 1E-F). The obtained results confirmed not only the role of AhR in the regulation of resistance genes expression but also in the acquisition of the dedifferentiated/invasive/mesenchymal phenotype, as lack of AhR expression significantly decreased the expression of these signatures in SK28R (Fig. 2C). Interestingly, we also observed an increase of  $\beta$ -, proliferative and differentiated signatures in the absence of AhR in SK28R (Fig. 2C) with an increase of the level expression of pigmentation genes and a decrease of resistance genes (Fig. 2D). At the opposite, loss of AhR transcription factor in SK28S didn't significantly change the profile of expression of the cells (Fig. 2C-D).

Because AhR transcription factor could be involved in the regulation of several genes potentially involved in the acquisition of BRAFi resistant associated phenotype, we then performed comparison analysis for all the different signature genes. On the Venn diagram are represented the different signatures genes overlapping with genes that have been previously shown to be differentially expressed in 501Mel cells exposed to vehicle, Vem (1  $\mu$ M) or TCDD (10 nM) (n=2) for 48 h (GSE104869 (Corre et al. 2018)), with AhR target genes identified by

ChIPseq experiments performed by Mathews'lab for AhR transcription factor 45 min to 24h after induction by TCDD (10 nM) of MCF7 cells (GSE90550 (Yang et al. 2017)) and with MITF target genes identified by ChIPseq experiments performed by Strub et al. (Supplementary table 1) (Strub et al. 2011) (Supplemented Fig. 2A). Thanks to this analysis, we can identify different genes belonging to the transcriptional signatures associated with sensitivity / differentiation (98 genes) or resistance / dedifferentiation (75 genes) phenotypes that could be regulated directly or indirectly by AhR and could be involved in phenotype switching during BRAFi-resistance acquiring.

### **AhR regulates the expression of genes involved in BRAFi-resistance and dedifferentiated phenotype of melanoma cells**

We confirmed by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) by comparing Vem-sensitive or -resistant melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) RNAseq dataset (Barretina et al. 2012) that these genes are significantly enriched in sensitive (Fig. 3A, top) or in resistant (Fig. 3A, bottom) states (see genes set enrichment results in Table 2). We then selected the 50 most enriched genes between these two states. The expression profiles of these different genes allow to differentiate very distinctly BRAFi-sensitive cells from -resistant ones (Fig. 3B). We also confirmed by Gene set enrichment analysis (GSEA) by comparing differentiated (Melanocytic and transitory) or dedifferentiated (Neural crest like and undifferentiated) melanoma cell lines from Graeber's data sets (Tsoi et al. 2018), these genes are significantly enriched in differentiated (Supplemented Fig. 2B, top) or in dedifferentiated (Supplemented Fig. 2B, bottom) states (see genes set enrichment results in Table 2). The expression profiles of the 50 most enriched genes between these two states, the same as to distinguish the sensitive phenotype from the resistant one, clearly distinguish differentiation from undifferentiated states (Supplemented Fig. 2C) of melanoma cells. Some of these genes are also mostly overexpressed in Neural crest like state and others in undifferentiated (Supplemented Fig. 2C). Furthermore, using additional melanoma cells lines (SK28, M229 and M238) data sets (Hugo et al. 2015; Song et al. 2017), we demonstrated that acquisition of BRAFi resistance correlates with an increase of the expression of genes previously associated with resistance/dedifferentiation and a decrease of the expression of genes associated with sensitivity/differentiation (Supplemented Fig. 2D). Interestingly, BRAFi/MEKi double treatment blockade led to similar expression reprogramming (Fig. 2D). Similarly to our previous study in which we have involved AhR in the direct regulation of resistant genes (Corre

et al. 2018), we analysed the role of the transcription factor in the regulation of genes that participate to the phenotype switching during resistance acquiring. Thanks to RNA seq data from BRAFi-sensitive or -resistant SK28 cell line in which AhR knock out has been performed using CRISPR/Cas9 methodology, we directly involved AhR in the regulation of several genes (*CYR61, CCL2, COL1A1, COL6A1, COL6A2, ABCG2, STC2, TGFBI, CRIMI, PAWR, TBLIX...*) associated with dedifferentiated/invasive state of melanoma (Fig. 3C). Interestingly, several of these genes have been largely involved in the aggressive phenotype of melanoma or other cancers (see supplemented information in Table 3 and supplemented references). A high expression of these different genes has been frequently correlated with a poor prognosis of cancer such as *ABCG2, COL1A1, COL6A1, COL6A2, TGFBI...* Some of these factors have been also involved in cell migration, invasion or EMT (*CCL2, CRIMI, COL1A1, 6A1, 6A2...*) or in are Cancer Stem Cell markers (*ABCG2, ALDH1A1, NES*). AhR transcription factor has been also previously involved in the direct regulation of the expression of some of these genes (*ABCG2, CCL2, STC2...*) (see Table 3 and supplemented references). We also involved the AhR transcription factor in the direct regulation of these genes by rescuing AhR expression with a wild type (WT) form or CA-AhR (constitutively activated form of AhR lacking ligand activating domain) in SK28R AhR KO cell lines (Fig. 3D). We also confirmed these results after specific inhibition of AhR using the antagonist CH (10 $\mu$ M, 2days) (Supplemented Fig. 3A).

### **In patients' tumors, AhR target genes expression correlates with cell-dedifferentiation states and resistance to BRAFi.**

Having established that these new AhR-signatures discriminate cell differentiation states and sensitivity/resistance to BRAFi, we then explored these signatures in melanoma samples. We first examined melanoma samples from the TCGA cohort (Barretina, Caponigro, and Stransky 2012). As we previously reported, patients segregate according to the  $\alpha$ - and  $\beta$ -signatures (Corre et al. 2018) (Fig. 4A). Patients expressing strongly the  $\alpha$ -signature (17%) had a significantly lower survival to those expressing highly the  $\beta$ - signature. Interestingly, in these patients with the  $\alpha$ -signature, we also observed a very strong expression of genes previously identified to participate to invasive, resistance and dedifferentiation phenotypes and that have been shown to be regulated by AhR (*CYR61, CCL2, ABCG2, STC2, TGFBI, CRIMI, PAWR, TBLIX...*)(Fig4A). We then investigated the expression of these different genes, in melanoma

patients exposed to single drug-blockage (BRAFi) during resistance acquiring (RNAseq dataset from Hugo et al., GSE65185 (Hugo et al. 2015)) by classifying their melanoma biopsies during the medication course (before, during and at relapse). Results showed that again by patients the level of expression of the different genes decrease at the beginning of the treatment and slowly but significantly increase during BRAFi resistance acquiring (Fig. 4B). The analysis of the level of expression of these different genes therefore correlates with the acquisition of BRAFi resistance during melanoma treatment. However, the direct link between their level of expression and the acquisition of the aggressive (invasive, dedifferentiated) phenotype remains to be clearly established. Indeed, the specific invalidation of the expression of each of these targets after siRNA did not seem to have individually a major effect on the proliferation of melanoma cells in culture (Supplemented Fig. 3B-C).

### **Balance of AhR and MITF protein levels to control phenotype switching**

BRAFi-sensitive melanoma cells usually strongly express MITF and weakly AhR (MITF<sup>high</sup>/AhR<sup>low</sup>) whereas the opposite is observed in resistant cells (MITF<sup>low</sup>/AhR<sup>high</sup>). We then asked whether there was a cross-regulation of the level and activity of both transcription factors during the acquisition of BRAFi resistance in melanoma. We first showed the opposite expression levels of RNA (Fig. 5A) and proteins (Fig. 5B) of both factors in SK28S and SK28R. While we observed a high expression level of MITF correlated with a low AhR level in the SK28S (Fig. 5A-B), we had the opposite in the SK28R. Interestingly, specific decrease of AhR expression (SK28R<sup>low</sup>) in SK28R reversed this phenotype with a significant increase of MITF expression level (Fig. 5A-B). This induction of MITF expression was only observed in the presence of a residual AhR expression (SK28R<sup>low</sup>) but not after complete depletion of AhR (SK28R KO) (Fig. 5B). We also confirmed this increase of MITF protein level after specific depletion of AhR in SK28R by siRNA (Fig. 5C). The inhibition of AhR at a low level (siAhR#1) led to a strong induction of MITF expression which seemed to be absent while AhR level is absent siAhR#2, #3 (Fig. 5C). Regulation of MITF protein expression level in SK28R cells could be recovered by specifically decrease AhR expression but not by its complete depletion. So, rescuing AhR expression with increasing doses of AhR WT form (pLL3.7 AhR WT) or constitutively activated form (pLL3.7 CA-AhR) in SK28R<sup>low</sup> cells significantly decreased MITF protein level (Fig. 5D). In conclusion, MITF and AhR seem to be in balance for their protein expression level with respectively a MITF<sup>high</sup>/AhR<sup>low</sup> phenotype in BRAFi-sensitive cells and a MITF<sup>low</sup>/AhR<sup>high</sup> phenotype in BRAFi-resistant cells. Interestingly, the decrease of



AhR level in SK28R (SK28R<sup>low</sup>) correlates with a significant increase of MITF, restoring the MITF<sup>high</sup>/AhR<sup>low</sup> sensitive phenotype of melanoma. In order to analyse the impact of the decrease of AhR expression in SK28R (SK28R<sup>low</sup>) on MITF transcriptional activity, we then analysed the level of expression of previously identified MITF target genes (Strub et al. 2011) using RNAseq data obtained in the different cell lines SK28 BRAFi-sensitive (S) or -resistant (R) melanoma cell lines after genetic depletion of AhR transcription factor (GSE#####). Expression level of several MITF putative target genes was significantly regulated between SK28S and SK28R melanoma cells (Fig. 5E and Supplemented Fig. 4). Depletion of AhR in SK28S KO didn't significantly modulate the expression of MITF target genes (Fig. 5E). At the opposite, in SK28R<sup>low</sup> (MITF<sup>high</sup>), the level of expression of 2/3 of MITF target genes is significantly impacted by the loss of AhR transcription factor with of a pattern of expression (heatmap) comparable to SK28S cells (Fig. 5E). In conclusion, decrease of AhR transcription factor in SK28R cells (SK28R<sup>low</sup>) led to both to the increase of MITF protein level and to its transcriptional activity in order to increase the expression of genes participating in sensitive/differentiated phenotype of melanoma. BRAFi-resistant phenotype seems to be thus reversible after specific inhibition of AhR expression leading to the reactivation of MITF pathway. We wondered then if it was possible to restore MITF in SK28R by the use of specific inhibitors leading to the protein degradation of AhR. It is clearly established that the Hsp90/p23/XAP2 complex participates in the nuclear translocation and activation of AhR (Kudo et al. 2017). In the absence of this complex AhR is degraded by proteasome. We have analysed AhR and MITF protein levels in SK28R after treatment of cells with increasing doses of specific Hsp90 inhibitor (NVP-HSP990, 1 to 10 nM). Again, we observed that in parallel to AhR degradation using Hsp90 inhibitor, MITF protein level significantly increased in SK28R cells (Fig. 5F). The level of expression of genes involved in invasive/dedifferentiated signatures that have been shown to be regulated by AhR decreased after treatment of SK28R cells by Hsp90 inhibitor (1nM). In conclusion, it is possible to reverse BRAFi-resistant phenotype to a sensitive one using Hsp90 inhibitor in order to prevent the activation of invasive/dedifferentiated genes expression by AhR and by restoring MITF protein level.

## **Discussion**

In conclusion, we were able to show that the AhR transcription factor plays a major role in the control of phenotypic plasticity of melanoma and the acquisition of the resistance during BRAF inhibitor treatment. We have previously shown that AhR can promote BRAFi sensitivity

after binding of inhibitors and transcriptional activation, or on the contrary that its canonical activation participates in the acquisition of the mechanism of resistance to BRAFi (Corre et al. 2018). Malignant melanoma has a high inter- and intratumour heterogeneity, based on transcriptionally distinct melanoma cell phenotypes. Phenotype plasticity in melanoma and transcriptional reprogramming plays a major role in the resistance to targeted therapy. Two predominant transcriptional programs have been predominantly associated with ‘proliferative’ phenotype or ‘invasive’ phenotype (Falletta et al. 2017; Kim et al. 2017). This phenotype switch is associated with different gene expression signatures correlated with melanoma phenotype (Hoek et al. 2008; Verfaillie et al. 2015; Bittner et al. 2000), prognosis (Winnepenninckx et al. 2006; Harbst et al. 2012) or targeted therapy response efficiency (Tsoi et al. 2018; Rambow et al. 2018). The level of expression of the melanoma transcriptional master regulator microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and the tyrosine protein kinase receptor AXL, were commonly used to define respectively proliferative phenotype or invasive phenotype of melanoma (Sensi et al. 2011). Accordingly, these two markers are so commonly used to identify phenotype populations described as MITF<sup>high</sup>/AXL<sup>low</sup> and MITF<sup>low</sup>/AXL<sup>high</sup> (Müller et al. 2014). Other transcription factors such as SOX10, AP1, TEAD...have been also specifically associated with ‘proliferative’ or ‘invasive’ phenotype (Verfaillie et al. 2015). During this study, we were also able to involve the transcription factor AhR in the control of cell plasticity and phenotypic change occurring during the acquisition of BRAFi resistance. Indeed, a high level of AhR and high activity are associated with an invasive/dedifferentiated phenotype through the transcriptional regulation of the expression of many genes involved in these phenotype signatures (invasive (Verfaillie et al. 2015; Hoek et al. 2008); dedifferentiation (Tsoi et al. 2018; Rambow et al. 2018)). Interestingly, it is also possible to characterize melanoma phenotypes in function of AhR and MITF level or activity, in a similar way as MITF and AXL. A ‘proliferative/sensitive’ phenotype is associated with MITF<sup>high</sup>/AhR<sup>low</sup> while an ‘invasive/resistant’ phenotype is associated with MITF<sup>low</sup>/AhR<sup>high</sup>. Considering that transcriptional changes are induced through signaling pathways activated by extracellular factors, the tumour microenvironment (TME) plays a major role in adaptive phenotype plasticity. It is so interesting to consider that the tryptophan (Trp) catabolite kynurenine (Kyn) as an endogenous and canonical ligand of the human AhR that is constitutively generated by human tumor cells via tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) and highly activates its level in activity. TDO-derived Kyn suppresses antitumor immune responses and promotes tumor-cell survival and motility through the AhR in an autocrine/paracrine fashion (Opitz et al. 2011).

Therapeutic strategies of cancer have been already designed to target IDO/TDO and Kyn pathway (Labadie, Bao, and Luke 2019; Triplett et al. 2018).

We have also shown that AhR and MITF transcription factors are in balance between BRAFi-sensitive and resistant cell lines, and that it is possible to reverse the ‘invasive/resistant’ phenotype to a ‘proliferative/sensitive’ phenotype after depletion of AhR leading to an increase of MITF protein level and activity. The inhibition of AhR by specific antagonists such as CH-223191 seems to be poorly effective to counteract resistance and to switch to a sensitive phenotype. However, when we significantly decrease the level of AhR after genetic depletion or after using Hsp90 specific inhibitor, we’re able first to inhibit AhR induction of resistance, invasive genes expression. This also restores a high protein level of MITF in melanoma cell leading to the re-sensitization to BRAFi and the loss of ‘invasive’ phenotype.

Several studies have already used Hsp90 inhibitor (XL888, Geldanamycin) to overcome acquired BRAFi resistance in melanoma (Acquaviva et al. 2014; Montagut et al. 2008; Azimi et al. 2018; Eroglu et al. 2018). Unfortunately, anti-cancer therapies using HSP90 inhibitors are based on the very broad action of HSP90 in metabolic reprogramming, epigenetic regulation (Condelli et al. 2019). It is therefore difficult to directly control the fate of the cell by modifying the activity of such ubiquitous factor without side effect.

A major take-home message from our understanding on the role of AhR/MITF balance on phenotype plasticity is that responses to MAPKi in melanoma can be reversible. This reversibility is a realistic therapeutic opportunity by specifically monitoring ‘invasive/resistant’ phenotype. We thus propose to counteract AhR transcription factor activation using specific antagonists for its canonical activity such as the natural flavonoids or by favouring its degradation in the cell and so the reactivation of MITF. Such therapeutic approaches targeting specifically AXL with antibody conjugated with MMAE (AXL-107-MMAE) (Boshuizen et al. 2018) have been already improved to treat BRAFi-resistant melanoma.

However, the use of therapeutic strategies using AhR inhibitors, as promising as they seem to be (Safe, Cheng, and Jin 2017), may be difficult to control because of the ubiquitous and broad role of this transcription factor for the control of physiological mechanisms. Despite this, they deserve to be tested in combination with current melanoma treatment, targeted therapy and immunotherapy.

## **Methods**

## **Reagents**

The AhR ligands were obtained from: 2,3,7,8-TCDD (TCDD) (Sigma Aldrich, 48599), Vemurafenib (Vem, PLX4032) (Selleckchem, S1267), Dabrafenib (Dab) (Selleckchem, S2807), Encorafenib (LGX818) (Selleckchem, S7108), HSP90i (NVP-HSP990, Selleckchem S7097), p23i inhibitor (Ailanthone, Med Chem Express HY-N1943), CH-223191 (Selleckchem S7711), MG132 (Sigma Aldrich M7449).

### **Plasmids**

The different Luciferase reporter plasmids (pGL4 luciferase) containing proximal promoter region -500b (IDT, Leuven, Belgium) (sequences in Table 5 have been cloned into the pGL4.10 (Promega, USA) using Gibson Assembly® Master Mix following manufacturer's recommendations (NEB, UK). Plasmids for overexpression of MITF has been kindly provided by Eiríkur Steingrímsson. The orf for AhR wild type or CA-AhR have been cloned into pLL3.7 using Gblocks (IDT DNA) using Gibson Assembly® Master Mix following manufacturer's recommendations (NEB, UK).

### **Cell culture and reagents**

Human melanoma cell lines (SK28, M229 and 501Mel) were grown in humidified air (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in RPMI-1640 medium (Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Eurobio) and 1% Penicillin-Streptomycin antibiotics (Gibco, Invitrogen). SK28 (S+R) cells were obtained from J.C Marine's lab at VIB Center for Cancer Biology, VIB, Leuven, Belgium. M229 cells were obtained from T.G Graeber's lab at UCLA Molecular Biology Institute, Los Angeles, CA, USA. 501Mel cells (S) were obtained from ATCC and 501Mel BRAFi resistant cells (R) have been obtained after 3 months treatment with Vem (1 µM every 2 days). All cell lines have been routinely tested for mycoplasma contamination.

### **CRISPR/Cas9 experiment**

AhR knock out has been performed using CRISPR/Cas9 methodology. Guide sequence targeting AhR (Sigma-Genosys, St Louis, MO, USA) has been cloned into the GeneArt CRISPR Nuclease vector according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Next, vectors were transfected in 501Mel cells or SK28 cells, and two days later cells were seeded in 96-well plates at 0.5 cells/well for single cell clonal expansion. Clones of interest were validated by DNA-sequencing, Western blot analysis, and RT-qPCR (Corre et al. 2018).

### **Cell Density Evaluation**

Cell density was assessed using a methylene blue colorimetric assay (Gilot et al. 2011). Briefly, cells were fixed for at least 30 min in 95% ethanol. Following ethanol removal, the fixed cells were dried and stained for 30 min with 1% methylene blue dye in borate buffer. After four washes with tap water, 100 µl of 0.1 N HCl were added to each well. Plates were next analysed with a spectrophotometer at 620 nm.

### **Wound healing migration assay**

Briefly, SK28 cells were grown until confluency in 2 well silicone insert (Ibidi®, Germany) placed in six-well tissue culture dishes. Cell culture insert has been removed after 1 day. Afterwards, the plates were washed with PBS and incubated at 37 °C in fresh RPMI-1640 medium (Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Eurobio) and 1% Penicillin-Streptomycin antibiotics (Gibco, Invitrogen) in the presence of vehicle (DMSO) or indicated concentrations of flavonoids. The wound was photographed with an inverted microscope at X5 magnification Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss). Wound closure was determined by measuring the distance between the edges of the wound at time 0 and 15h, using ImageJ (Fiji). Quantification of the distance migrated by the cells was done as follow:  $D = (\text{Size of the wound at } t = 0 \text{ h} - \text{size of the wound at } t = 15\text{h})$ .

### **Wound healing migration assay**

Briefly, SKmel28 cells were grown until confluency in 2 well silicone insert (Ibidi®, Germany) placed in 12-wells tissue culture dishes. Cell culture insert has been removed after 1 day. Afterwards, the plates were washed with PBS and incubated at 37 °C in fresh RPMI-1640 medium (Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Eurobio) and 1% Penicillin-Streptomycin antibiotics (Gibco, Invitrogen) in the presence of vehicle (DMSO) or indicated concentrations of flavonoids. The wound was photographed with an inverted microscope at X5 magnification Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss). Wound closure was determined by measuring the distance between the edges of the wound at time 0 and 15h, using ImageJ (Fiji). Quantification of the distance migrated by the cells was done as follow:  $D = (\text{Size of the wound at } t = 0 \text{ h} - \text{size of the wound at } t = 15\text{h})$ .

### **Spheroid formation assay**

Spheroid formation assay was performed as described. Briefly, SK28 cells (20000cells/ml) were plated in 24 wells plate coated with 1.5% agarose in completed RPMI medium and concentrate in the center by circular agitation. After 2 days, spheroids were recovered for inclusion in extracellular matrix of collagen (100µl) (final concentration=2mg/ml in buffer (acetic acid 0.01N; neutralization buffer: 33mM Hepes pH7.4, 0.37% sodium bicarbonate, 0.03N NaOH; MEM 1X) in 24 wells plate coated with 1.5% agarose. Spheroids were maintained in completed medium in the presence or not of flavonoids and pictures of spheroids were taken during many days (0 to 4 days) with an inverted microscope at X5 magnification Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss).

### **RNA extraction & RT-qPCR expression**

Experiments have been done as previously described (Bouafia et al. 2014). Primers used for RT-qPCR experiments are available in Table S4.

### **RNA interference**

All siRNAs were transfected at 66nM using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). For RNA analysis, 50.000 cells were seeded in 6-well plates. Cells were harvested 48h after transfection. All siRNAs were purchased from IDT DNA (Table S5).

### **Luciferase Activity**

$1.10^5$  SK28 cells were cultured in 24-well plates and transfected with respectively the pGL4-promoterX-Luc constructs (proximal carrying the firefly luciferase). Transient transfection of cells was performed as previously described (Corre et al. 2018). After a 24-h period, cells were exposed to TCDD, Vemurafenib for a 6-h period. Luciferase assays were then performed with a Promega kit according to the manufacturer's instructions. Data were expressed in arbitrary units, relative to the value of luciferase activity levels found in DMSO-exposed cells, arbitrarily set at 1 arbitrary unit (a.u.). Firefly luciferase activity was normalized to protein content using Bicinchoninic Acid Kit from Sigma-Aldrich® and measured with using a luminometer (Centro XS<sup>3</sup> LB960, Berthold Technologies).

### **Western Blot**

Harvested cells were solubilized as previously described (Gilot et al. 2011). Protein samples were denatured at 95°C, resolved by SDS-PAGE and transferred onto Hybond™-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Bucks, UK). Membranes were probed with

appropriated antibodies and signals were detected using the Fujifilm LAS-3000 Imager (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan). Primary antibodies were: AhR (H211), Hsc70 (B6) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), MITF (C5). Horseradish-Peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from (Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)) (1:1000).

### **RNA-Seq**

Total RNAs was extracted from BRAFi-sensitive or resistant SK28 cells invalidated or not for AhR in the absence of treatment using the miRVana kit (Thermo Fisher Scientific). Libraries were generated from 500ng of total RNAs using Truseq Stranded mRNA kit (Illumina). Libraries were then quantified with KAPA library quantification kit (Kapa biosystems) and pooled. 0.5nM of this pool were loaded on a high output flowcell and sequenced on a NextSeq500 platform (Illumina) with 2×75bp paired-end chemistry within two runs. Reads were aligned to the human genome release hg19 using STAR v2.4.0a with default parameters. Quantification of genes was then performed using featureCounts release subread-1.5.0-p3-Linux-x86\_64 with “--primary -g gene\_name -p -s 1” options. Quality control of RNA-Seq count data was assessed using in-house R scripts. Normalization and statistical analysis were performed using the Bioconductor package DESeq2. P-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure, which controls the false discovery rate (FDR). Differentially expressed genes were selected based on an adjusted p-value below 0.05. The RNA-Seq data presented in this article have been submitted to the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under the accession number (GSE#####).

### **Data mining**

Analysis of TCGA/SKCM data was performed using OncoLnc portal [<http://www.oncolnc.org>] (Anaya 2016). The raw data count matrix composed of 479 samples (from SKCM melanoma cohort) was downloaded from the OncoLnc for the different transcriptional signatures. Expression heatmap of differentially expressed genes between samples was obtained on log2 fold change using heatmap3 package in R/Bioconductor. Cluster-specific genes rankings were obtained by contrasting the samples with the rest of the samples. Cell density curves for the available melanoma cell lines were established using GraphPad PRISM 6.0 ® in order to establish IC50 dependently to the different treatments.

The raw data count matrix from RNA seq data were obtained in GEO database for previous experiments on melanoma cell lines Cancer Cell Line Encyclopedia (Barretina, Caponigro,

and Stransky 2012) GSE36134 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE36134>] (sensitive or resistant to PLX470) (IC50 values for PLX4720 were obtained from the Supplementary Table 7 of ref (Barretina, Caponigro, and Stransky 2012)); on BRAFi or BRAFi+MEKi resistant cell lines (Song et al. 2017) GSE75299 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE752099>] and (Tsoi et al. 2018) GSE80829 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE80829>], on BRAFi treated melanoma patients GSE65185 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE65185>] (Hugo et al. 2015) ; on primary melanoma cell lines (proliferative or invasive) GSE60664 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE60664>] (Verfaillie et al. 2015), on single cell analysis of BRAFi resistant melanoma (4650 seq) GSE72056 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE72056>] (Tirosh et al. 2016) and on Vem-resistant melanoma (EGFR pos) (Shaffer et al. 2017). Expression heatmap of differentially expressed genes (pigmentation, AhR or Resistant genes) between samples was obtained on log2 fold change using heatmap3 package in R/Bioconductor.

## **Stats**

Data are presented as mean  $\pm$  s.d. unless otherwise specified, and differences were considered significant at a *p* value of less than 0.05. Comparisons between groups normalized to a control were carried out by a two-tailed *t*-test with the Holm-Sidak's multiple comparisons test when more than two groups are compared to the same control condition. OS was estimated using the Kaplan-Meier method. Univariate analysis using the Cox regression model was done to estimate hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI). All statistical analyses were performed using Prism 6 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

## **Data availability**

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## **Author information**

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.C. or D.G. or M.-D. G.



## References

- Acquaviva, Jaime, Donald L Smith, John-Paul Jimenez, Chaohua Zhang, Manuel Sequeira, Suqin He, Jim Sang, Richard C Bates, and David A Proia. 2014. "Overcoming Acquired BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma via Targeted Inhibition of Hsp90 with Ganetespib." *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (2): 353 LP – 363. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0481>.
- Anaya, Jordan. 2016. "OncoLnc: Linking TCGA Survival Data to MRNAs, MiRNAs, and LncRNAs." *PeerJ Computer Science* 2: e67. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67>.
- Arozarena, Imanol, and Claudia Wellbrock. 2017. "Overcoming Resistance to BRAF Inhibitors." *Annals of Translational Medicine* 5 (19): 387. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.09>.
- Azimi, Alireza, Stefano Caramuta, Brinton Seashore-Ludlow, Johan Boström, Jonathan L Robinson, Fredrik Edfors, Rainer Tuominen, et al. 2018. "Targeting CDK2 Overcomes Melanoma Resistance against BRAF and Hsp90 Inhibitors." *Molecular Systems Biology* 14 (3): e7858–e7858. <https://doi.org/10.15252/msb.20177858>.
- Barretina, Jordi, Giordano Caponigro, and Nicolas Stransky. 2012. "The Cancer Cell Line Encyclopedia Enables Predictive Modeling of Anticancer Drug Sensitivity." *Nature* 483 (7391): 603–7. <https://doi.org/10.1038/nature11003>.
- Barretina, Jordi, Giordano Caponigro, Nicolas Stransky, Kavitha Venkatesan, Adam A Margolin, Sungjoon Kim, Christopher J Wilson, et al. 2012. "The Cancer Cell Line Encyclopedia Enables Predictive Modeling of Anticancer Drug Sensitivity." *Nature* 483 (7391): 603–7. <https://doi.org/10.1038/nature11003>.
- Bittner, M, P Meltzer, Y Chen, Y Jiang, E Seftor, M Hendrix, M Radmacher, et al. 2000. "Molecular Classification of Cutaneous Malignant Melanoma by Gene Expression Profiling." *Nature* 406 (6795): 536–40. <https://doi.org/10.1038/35020115>.
- Bollag, Gideon, Peter Hirth, James Tsai, Jiazhong Zhang, Prabha N Ibrahim, Hanna Cho, Wayne Spevak, et al. 2010. "Clinical Efficacy of a RAF Inhibitor Needs Broad Target Blockade in BRAF-Mutant Melanoma." *Nature* 467 (7315): 596–99. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09454>.
- Boregowda, Rajeev K, Daniel J Medina, Elke Markert, Michael A Bryan, Wenjin Chen, Suzie Chen, Anna Rabkin, et al. 2016. "The Transcription Factor RUNX2 Regulates Receptor Tyrosine Kinase Expression in Melanoma." *Oncotarget* 7 (20): 29689–707. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8822>.
- Boshuizen, Julia, Louise A Koopman, Oscar Krijgsman, Aida Shahrabi, Elke Gresnigt– van den Heuvel, Maarten A Ligtenberg, David W Vredevoogd, et al. 2018. "Cooperative Targeting of Melanoma Heterogeneity with an AXL Antibody-Drug Conjugate and BRAF/MEK Inhibitors." *Nature Medicine* 24 (January): 203. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4472>.
- Bouafia, Amine, Sébastien Corre, David Gilot, Nicolas Mouchet, Sharon Prince, and Marie-Dominique Dominique Galibert. 2014. "P53 Requires the Stress Sensor USF1 to Direct Appropriate Cell Fate Decision." Edited by Marshall S Horwitz. *PLoS Genetics* 10 (5): e1004309. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004309>.
- Chapman, Paul B., Axel Hauschild, Caroline Robert, John B. Haanen, Paolo Ascierto, James Larkin, Reinhard Dummer, et al. 2011. "Improved Survival with Vemurafenib in

- Melanoma with BRAF V600E Mutation.” *N. Engl. J. Med.* 364 (26): 2507–16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal103782>.Improved.
- Chen, Guangming, Chenxi Gao, Xuan Gao, Dennis Han Zhang, Shih-Fan Kuan, Timothy F Burns, and Jing Hu. 2017. “Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activation Mediates Adaptive Resistance to BRAF Inhibition in Colorectal Cancer.” *Molecular Cancer Therapeutics*, January. <http://mct.aacrjournals.org/content/early/2017/11/22/1535-7163.MCT-17-0561.abstract>.
- Cohen-Solal, Karine A, Howard L Kaufman, and Ahmed Lasfar. 2017. “Transcription Factors as Critical Players in Melanoma Invasiveness, Drug Resistance and Opportunities for Therapeutic Drug Development.” *Pigment Cell & Melanoma Research*. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12666>.
- Condelli, Valentina, Fabiana Crispo, Michele Pietrafesa, Giacomo Lettini, S Danilo Matassa, Franca Esposito, Matteo Landriscina, and Francesca Maddalena. 2019. “HSP90 Molecular Chaperones, Metabolic Rewiring, and Epigenetics: Impact on Tumor Progression and Perspective for Anticancer Therapy.” *Cells* . <https://doi.org/10.3390/cells8060532>.
- Corre, Sébastien, Nina Tardif, Nicolas Mouchet, Héloïse M Leclair, Lise Boussemart, Arthur Gautron, Laura Bachelot, et al. 2018. “Sustained Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Transcription Factor Promotes the Resistance to BRAF Inhibitors in Melanoma.” *Nature Communications* 9 (4775).
- Daud, Adil, Japinder Gill, Sheily Kamra, Lei Chen, and Amit Ahuja. 2017. “Indirect Treatment Comparison of Dabrafenib plus Trametinib versus Vemurafenib plus Cobimetinib in Previously Untreated Metastatic Melanoma Patients.” *Journal of Hematology & Oncology* 10 (January): 3. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0369-8>.
- 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 (June): 949. <http://dx.doi.org/10.1038/nature00766>.
- Dummer, Reinhard, Paolo A Ascierto, Helen J Gogas, Ana Arance, Mario Mandala, Gabriella Liszkay, Claus Garbe, et al. 2018. “Encorafenib plus Binimetinib versus Vemurafenib or Encorafenib in Patients with BRAF-Mutant Melanoma (COLUMBUS): A Multicentre, Open-Label, Randomised Phase 3 Trial.” *The Lancet Oncology* 19 (5): 603–15. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30142-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30142-6).
- Eroglu, Zeynep, Y Ann Chen, Geoffrey T Gibney, Jeffrey S Weber, Ragini R Kudchadkar, Nikhil I Khushalani, Joseph Markowitz, et al. 2018. “Combined BRAF and HSP90 Inhibition in Patients with Unresectable &lt;Em>BRAF</Em>&lt;Sup>V600E</Sup>-Mutant Melanoma.” *Clinical Cancer Research* 24 (22): 5516 LP – 5524. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0565>.
- Faião-Flores, F, D K Alves-Fernandes, P C Pennacchi, S Sandri, A L S A Vicente, C Scapulatempo-Neto, V L Vazquez, et al. 2017. “Targeting the Hedgehog Transcription Factors GLI1 and GLI2 Restores Sensitivity to Vemurafenib-Resistant Human Melanoma Cells.” *Oncogene* 36 (13): 1849–61. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.348>.
- Falletta, Paola, Luis Sanchez-Del-Campo, Jagat Chauhan, Maïke Efferm, Amy Kenyon, Christopher J Kershaw, Robert Siddaway, et al. 2017. “Translation Reprogramming Is an Evolutionarily Conserved Driver of Phenotypic Plasticity and Therapeutic Resistance in Melanoma.” *Genes & Development* 31 (1): 18–33. <https://doi.org/10.1101/gad.290940.116>.

- Gilot, David, Nolwenn Le Meur, Fanny Giudicelli, Marc Le Vée, Dominique Lagadic-Gossmann, Nathalie Théret, and Olivier Fardel. 2011. “Rnai-Based Screening Identifies Kinases Interfering with Dioxin-Mediated up-Regulation of CYP1A1 Activity.” *PLoS ONE* 6 (3).
- Harbst, Katja, Johan Staaf, Martin Lauss, Anna Karlsson, Anna Måsbäck, Iva Johansson, Pär-Ola Bendahl, et al. 2012. “Molecular Profiling Reveals Low- and High-Grade Forms of Primary Melanoma.” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (15): 4026–36. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0343>.
- Hauschild, Axel, Jean-Jacques Grob, Lev V Demidov, Thomas Jouary, Ralf Gutzmer, Michael Millward, Piotr Rutkowski, et al. 2012. “Dabrafenib in BRAF-Mutated Metastatic Melanoma: A Multicentre, Open-Label, Phase 3 Randomised Controlled Trial.” *The Lancet* 380 (9839): 358–65. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60868-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60868-X).
- Hoek, Keith S, Ossia M Eichhoff, Natalie C Schlegel, Udo Döbbeling, Nikita Kobert, Leo Schaerer, Silvio Hemmi, and Reinhard Dummer. 2008. “&lt;Em&gt;In Vivo&lt;/Em&gt; Switching of Human Melanoma Cells between Proliferative and Invasive States.” *Cancer Research* 68 (3): 650 LP – 656. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/68/3/650.abstract>.
- Hoek, Keith S, and Colin R Goding. 2010. “Cancer Stem Cells versus Phenotype-Switching in Melanoma.” *Pigment Cell & Melanoma Research* 23 (6): 746–59. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x>.
- Hugo, Willy, Hubing Shi, Lu Sun, Marco Piva, Chunying Song, Xiangju Kong, Gatién Moriceau, et al. 2015. “Non-Genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance.” *Cell* 162 (6): 1271–85. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.061>.
- Kemper, Kristel, Pauline L de Goeje, Daniel S Peeper, and Renée van Amerongen. 2014. “Phenotype Switching: Tumor Cell Plasticity as a Resistance Mechanism and Target for Therapy.” *Cancer Research* 74 (21): 5937 LP – 5941. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/21/5937.abstract>.
- Kim, Isabella S, Silja Heilmann, Emily R Kansler, Yan Zhang, Milena Zimmer, Kajan Ratnakumar, Robert L Bowman, et al. 2017. “Microenvironment-Derived Factors Driving Metastatic Plasticity in Melanoma.” *Nature Communications* 8 (February): 14343. <https://doi.org/10.1038/ncomms14343>.
- Koelblinger, Peter, Olaf Thuerigen, and Reinhard Dummer. 2018. “Development of Encorafenib for BRAF-Mutated Advanced Melanoma.” *Current Opinion in Oncology* 30 (2): 125–33. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000426>.
- Kudo, Ikuru, Miki Hosaka, Asami Haga, Noriko Tsuji, Yuhtaroh Nagata, Hirotaka Okada, Kana Fukuda, et al. 2017. “The Regulation Mechanisms of AhR by Molecular Chaperone Complex.” *The Journal of Biochemistry* 163 (3): 223–32. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx074>.
- Labadie, Brian W, Riyue Bao, and Jason J Luke. 2019. “Reimagining IDO Pathway Inhibition in Cancer Immunotherapy via Downstream Focus on the Tryptophan–Kynurenine–Aryl Hydrocarbon Axis.” *Clinical Cancer Research* 25 (5): 1462 LP – 1471. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2882>.
- Larkin, J. 2014. “Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma.” *N. Engl. J. Med.* 371: 1867–76. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1408868>.

- Montagut, Clara, Sreenath V Sharma, Toshi Shioda, Ultan McDermott, Matthew Ulman, Lindsey E Ulkus, Dora Dias-Santagata, et al. 2008. "Elevated CRAF as a Potential Mechanism of Acquired Resistance to BRAF Inhibition in Melanoma." *Cancer Research* 68 (12): 4853–61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6787>.
- Moriceau, Gatien, Willy Hugo, Aayoung Hong, Hubing Shi, Xiangju Kong, Clarissa C Yu, Richard C Koya, et al. 2015. "Tunable-Combinatorial Mechanisms of Acquired Resistance Limit the Efficacy of BRAF/MEK Co-Targeting but Result in Melanoma Drug Addiction." *Cancer Cell* 27 (2): 240–56. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.018>.
- Müller, Judith, Oscar Krijgsman, Jennifer Tsoi, Lidia Robert, Willy Hugo, Chunying Song, Xiangju Kong, et al. 2014. "Low MITF/AXL Ratio Predicts Early Resistance to Multiple Targeted Drugs in Melanoma." *Nature Communications* 5 (December): 5712. <https://doi.org/10.1038/ncomms6712>.
- Nazarian, Ramin, Hubing Shi, Qi Wang, Xiangju Kong, Richard C Koya, Hane Lee, Zugen Chen, et al. 2010. "Melanomas Acquire Resistance to B-RAF(V600E) Inhibition by RTK or N-RAS Upregulation." *Nature* 468 (7326): 973–77. <https://doi.org/10.1038/nature09626>.
- Noguchi, Ken, Annamarie C. Dalton, Breege V. Howley, Buckley J. McCall, Akihiro Yoshida, J. Alan Diehl, and Philip H. Howe. 2017. "Interleukin-like EMT Inducer Regulates Partial Phenotype Switching in MITF-Low Melanoma Cell Lines." *PLoS ONE* 12 (5): 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177830>.
- Opitz, Christiane a., Ulrike M. Litzenburger, Felix Sahm, Martina Ott, Isabel Tritschler, Saskia Trump, Theresa Schumacher, et al. 2011. "An Endogenous Tumour-Promoting Ligand of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor." *Nature* 478 (7368): 197–203. <https://doi.org/10.1038/nature10491>.
- Rambow, Florian, Aljosja Rogiers, Oskar Marin-Bejar, Sara Aibar, Julia Femel, Michael Dewaele, Panagiotis Karras, et al. 2018. "Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma." *Cell*.
- Robert, Caroline, Boguslawa Karaszewska, Jacob Schachter, Piotr Rutkowski, Andrzej Mackiewicz, Daniil Stroiakovski, Michael Lichinitser, et al. 2015. "Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib." *New England Journal of Medicine* 372 (1): 30–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412690>.
- Rose, A. A. N., M. G. Annis, D. T. Frederick, M. Biondini, Z. Dong, L. Kwong, L. Chin, et al. 2016. "MAPK Pathway Inhibitors Sensitize BRAF-Mutant Melanoma to an Antibody-Drug Conjugate Targeting GPNMB." *Clinical Cancer Research* 22 (24): 6088–98. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1192>.
- Safe, Stephen, Yating Cheng, and Un-Ho Jin. 2017. "The Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) as a Drug Target for Cancer Chemotherapy." *Current Opinion in Toxicology* 2 (February): 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.01.012>.
- Salama, April K S, and Kevin B Kim. 2013. "Trametinib (GSK1120212) in the Treatment of Melanoma." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 14 (5): 619–27. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.770475>.
- Sensi, Marialuisa, Mara Catani, Giancarlo Castellano, Gabriella Nicolini, Federica Alciato, Gabrina Tragni, Giuseppina De Santis, et al. 2011. "Human Cutaneous Melanomas Lacking MITF and Melanocyte Differentiation Antigens Express a Functional Axl Receptor Kinase." *Journal of Investigative Dermatology* 131 (12): 2448–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/jid.2011.218>.

- Shaffer, Sydney M, Margaret C Dunagin, Stefan R Torborg, Eduardo A Torre, Benjamin Emert, Clemens Krepler, Marilda Beqiri, et al. 2017. “Rare Cell Variability and Drug-Induced Reprogramming as a Mode of Cancer Drug Resistance.” *Nature* 546 (7658): 431–35. <https://doi.org/10.1038/nature22794>.
- Shi, Hubing, Willy Hugo, Xiangju Kong, Aayoung Hong, Richard C Koya, Gatien Moriceau, Thinle Chodon, et al. 2014. “Acquired Resistance and Clonal Evolution in Melanoma during BRAF Inhibitor Therapy.” *Cancer Discovery* 4 (1): 80–93. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0642>.
- Shirley, Matt. 2018. “Encorafenib and Binimetinib: First Global Approvals.” *Drugs* 78 (12): 1277–84. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0963-x>.
- Smith, Holly Brunton, Emily J. Rowling, Jennifer Ferguson, Imanol Arozarena, Zsofia Miskolczi, Jessica L. Lee, et al. 2016a. “Inhibiting Drivers of Non-Mutational Drug Tolerance Is a Salvage Strategy for Targeted Melanoma Therapy.” *Cancer Cell* 29 (3): 270–84. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.003>.
- Smith, Michael P., Holly Brunton, Emily J. Rowling, Jennifer Ferguson, Imanol Arozarena, Zsofia Miskolczi, Jessica L. Lee, et al. 2016b. “Inhibiting Drivers of Non-Mutational Drug Tolerance Is a Salvage Strategy for Targeted Melanoma Therapy.” *Cancer Cell* 29 (3): 270–84. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.003>.
- Song, Chunying, Marco Piva, Lu Sun, Aayoung Hong, Gatien Moriceau, Xiangju Kong, Hong Zhang, et al. 2017. “Recurrent Tumor Cell–Intrinsic and –Extrinsic Alterations during MAPKi-Induced Melanoma Regression and Early Adaptation.” *Cancer Discovery* 7 (11): 1248 LP – 1265. <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/7/11/1248.abstract>.
- Strub, T, S Giuliano, T Ye, C Bonet, C Keime, D Kobi, S Le Gras, et al. 2011. “Essential Role of Microphthalmia Transcription Factor for DNA Replication, Mitosis and Genomic Stability in Melanoma.” *Oncogene* 30 (January): 2319. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.612>.
- Tirosh, Itay, Benjamin Izar, Sanjay M Prakadan, Marc H Wadsworth II, Daniel Treacy, John J Trombetta, Asaf Rotem, et al. 2016. “Dissecting the Multicellular Ecosystem of Metastatic Melanoma by Single-Cell RNA-Seq.” *Science* 352 (6282): 189–96. <https://doi.org/10.1126/science.aad0501>. Dissecting.
- Titz, Bjoern, Anastasia Lomova, Allison Le, Willy Hugo, Xiangju Kong, Johanna ten Hoeve, Michael Friedman, et al. 2016. “JUN Dependency in Distinct Early and Late BRAF Inhibition Adaptation States of Melanoma.” *Cell Discovery* 2 (September): 16028. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2016.28>.
- Triplett, Todd A, Kendra C Garrison, Nicholas Marshall, Moses Donkor, John Blazeck, Candice Lamb, Ahlam Qerqez, et al. 2018. “Reversal of Indoleamine 2,3-Dioxygenase–Mediated Cancer Immune Suppression by Systemic Kynurenine Depletion with a Therapeutic Enzyme.” *Nature Biotechnology* 36 (July): 758. <https://doi.org/10.1038/nbt.4180>.
- Tsoi, Jennifer, Lidia Robert, Kim Paraiso, Carlos Galvan, Katherine M. Sheu, Johnson Lay, Deborah J.L. Wong, et al. 2018. “Multi-Stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress.” *Cancer Cell*, 1–15.
- Verfaillie, Annelien, Hana Imrichova, Zeynep Kalender Atak, Michael Dewaele, Florian Rambow, Gert Hulselmans, Valerie Christiaens, et al. 2015. “Decoding the Regulatory Landscape of Melanoma Reveals TEADS as Regulators of the Invasive Cell State.” *Nature*

*Communications* 6: 6683. <https://doi.org/10.1038/ncomms7683>.

- Wellbrock, Claudia, Imanol Arozarena, Judith Müller, Oscar Krijgsman, Jennifer Tsoi, Lidia Robert, Willy Hugo, et al. 2015. “Microphthalmia-associated Transcription Factor in Melanoma Development and MAP-kinase Pathway Targeted Therapy.” *Pigment Cell & Melanoma Research* 28 (4): 390–406. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12370>.
- Wellbrock, Claudia, and Richard Marais. 2005. “Elevated Expression of MITF Counteracts B-RAF–Stimulated Melanocyte and Melanoma Cell Proliferation.” *The Journal of Cell Biology* 170 (5): 703–8. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505059>.
- Winnepenninckx, Véronique, On behalf of the Melanoma Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer, Vladimir Lazar, On behalf of the Melanoma Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer, Stefan Michiels, On behalf of the Melanoma Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer, Philippe Dessen, et al. 2006. “Gene Expression Profiling of Primary Cutaneous Melanoma and Clinical Outcome.” *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 98 (7): 472–82. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj103>.
- Yang, Sunny Y., Shaimaa Ahmed, Somisetty V. Satheesh, and Jason Matthews. 2017. “Genome-Wide Mapping and Analysis of Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR)- and Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor (AHRR)-Binding Sites in Human Breast Cancer Cells.” *Archives of Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2022-x>.
- Zhang, Gao, Dennie T Frederick, Lawrence Wu, Zhi Wei, Clemens Krepler, Satish Srinivasan, Young Chan Chae, et al. 2016. “Targeting Mitochondrial Biogenesis to Overcome Drug Resistance to MAPK Inhibitors.” *The Journal of Clinical Investigation* 126 (5): 1834–56. <https://doi.org/10.1172/JCI82661>.

### **Acknowledgements**

The authors thank the Gene Expression and Oncogenesis team for helpful discussions; the CNRS UMR6290; the Rennes FHU CAMIn team. The authors acknowledge the SFR Biosit core facilities of Rennes University with the cell imaging ImpACcell (Rémy Le Guevel), Microscopy Rennes Imaging Center (MRIC) platforms.

This study received financial support from the following: AVIESAN plan Cancer (ENV201308 and ENV201603), Fondation ARC (N°PGA1\*20160203868), Ligue National Contre le Cancer (LNCC) Départements du Grand-Ouest; Association “Vaincre le Cancer”, FHU CAMIn-CHU Rennes, Région Bretagne; University of Rennes 1; CNRS, Inserm. N.T. is a recipient of a doctoral fellowship from ministère de la Recherche. A.P. is a recipient of INCa.

### **Author contributions**

Conceptualization, S.C.; Methodology, H.M.L.; N.T; A.P; and S.C. Investigation, H.M.L., N.T; A.P., L.B., A.S., and S.C. Formal Analysis, H.M.L. and S.C.; Writing - Original Draft, S.C. and M.-D.G.; Funding Acquisition, S.C.; and M.-D.G.; Supervision, S.C.; and M.-D.G.

### **Competing interests**

The authors declare no competing interests.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: Loss of AhR impairs invasive phenotype of melanoma cells.**

**A**, Vem sensitivity has been established in BRAFi-sensitive or resistant SK28 cells invalidated or not for AhR by CRISPR/Cas9 by cell density measurement and calculation of the IC50 (bottom) using GraphPad (PRISM6.0<sup>®</sup>) 4 days after every 2 days of treatment with an increasing concentration of Vemurafenib, Dabrafenib or Encorafenib.

**B-C**, Wound healing assays have been performed using IBIDI<sup>®</sup> chambers to evaluate the role of AhR on cell migration. Pictures of the wound was photographed with an inverted microscope at X5 magnification Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss). The histogram represents the mean  $\pm$  sem; wound closure determined by measuring the distance between the edges of the wound at time 0 and 15h (n=3-6), unpaired *t*-tests with unpaired *t*-tests with Sidak-Bonferroni method. **B**, Results obtained with BRAFi-sensitive or resistant SK28 cells invalidated or not for AhR in the absence of treatment. (n=3). **C**, Results obtained with migration assay (0 to 15h) in SKMel28 R cells invalidated or not for AhR after or not treatment with 10 $\mu$ M CH-223191. (n=3).

**D**, Three-dimensional spheroid growth of BRAFi-sensitive or resistant SK28 cells invalidated or not for AhR by CRISPR/Cas9 in the absence of treatment. Pictures were taken four days after spheroid implantation into collagen gel. (n=4).

**E**, Three-dimensional spheroid growth of BRAFi-resistant SK28 cells invalidated or not for AhR by CRISPR/Cas9 after daily treatment by the specific AhR inhibitor CH-223191 (5  $\mu$ M) for one week or in the absence of treatment. Pictures were taken four days after spheroid implantation into collagen gel. (n=3). Each histogram represents the mean  $\pm$  s.d.; with unpaired *t*-tests with Sidak-Bonferroni method.

### **Figure 2: AhR signature regulates BRAFi-resistant phenotype in melanoma cell lines and in patients.**

**A**, Expression Heatmap for different genes signatures (established by the median of expression for specific genes) (Invasive vs Proliferative, alpha, beta, resistant, Melanocytic, Transitory, Neural crest-like, Undifferentiated, see Table 1) in different Vem-sensitive (green) or -resistant melanoma cell lines (red) from the Cancer Cell Line Encyclopedia RNAseq dataset (GEO, GSE36134 (Barretina, Caponigro, and Stransky 2012)). Genes and clusters with similar expression profiles across the cohort are placed close to each other in the grid.

**B**, Volcano plot combining the fold change magnitude (ratio of expression between resistant and sensitive SK28 cell lines) and the p-values. In red: genes that are regulated in SK28 resistant

cell lines dependently to AhR. In green: genes that are regulated in SK28 sensitive cell lines dependently to AhR.

**C**, Expression Heatmap for different genes signatures in SKMel28 BRAFi sensitive or resistant cell line invalidated or not for AhR by CRISPR/Cas9 in the absence of treatment (GSE#####).

**D**, Expression Heatmap for different selected genes for resistance and pigmentation (GSE#####).

**Figure 3: AhR regulates the expression of several genes involved in dedifferentiate, invasive and BRAFi-resistant phenotype of melanoma cell lines**

**A**, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) showing that selected gene set were enriched in both BRAFi-sensitive (top, n=92) or resistant (bottom, n=75) phenotype of melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia RNAseq dataset (GEO, GSE36134 (Barretina, Caponigro, and Stransky 2012)). (Enrichment rank for the different signatures are available in Table 2).

**B**, Expression Heatmap for top genes enriched (n=50) in BRAFi-sensitive or in resistant cell lines in the different Vem-sensitive (green) or -resistant melanoma cell lines (red) from the Cancer Cell Line Encyclopedia RNAseq dataset (GEO, GSE36134 (Barretina, Caponigro, and Stransky 2012)). Genes and clusters with similar expression profiles across the cohort are placed close to each other in the grid.

**C**, Expression Heatmap for top genes in SKMel28 BRAFi sensitive or resistant cell line invalidated or not for AhR by CRISPR/Cas9 in the absence of treatment (GSE#####).

**D**, Expression Heatmap for top genes in SKMel28S KO and RKO after transfection of increasing doses of plasmids for overexpression of human AhR wild type (pLL3.7 AhR WT) or constitutively activated form of AhR (pLL3.7 CA-AhR).

**Figure 4: In patients' tumors, AhR target genes expression correlates with cell-dedifferentiation states and resistance to BRAFi.**

**A**, Expression Heatmap depicting mRNA expression for top genes enriched in sensitive/differentiation (n=25) or resistant/dedifferentiation (n=25) states of melanoma cell lines in non-treated melanoma patient dataset from TCGA (SKCM, n=459) (Barretina, Caponigro, and Stransky 2012). Determination of OS curves by Kaplan-Meier analysis in the two subpopulations (red or blue) (from TCGA SKCM dataset). Cox regression was used to calculate *p* values, hazard ratios (HR), and 95% confidence intervals (CI).



**B**, Expression Heatmap for median of expression of different patients for top genes enriched after GSEA in BRAFi-treated melanoma patients during resistance acquiring (GSE65185 (Hugo et al. 2015)). Clinical data are available from supplemental table S1 from Hugo et al., 2015 (Hugo et al. 2015).

**Figure 5: Melanoma “phenotype switching” during BRAFi resistance acquiring is associated with a cross-regulation of AhR and MITF transxcription factors.**

**A**, Analysis by RT-qPCR of *AhR* and *MITF* mRNA expression level in SKMel28 BRAFi sensitive or resistant cell line invalidated or not for AhR by CRISPR/Cas9. (n=3)

**B**, Protein level of AhR and MITF was analyzed by Western blotting in BRAFi-sensitive or resistant SK28 cells with different levels of AhR (low and KO) and quantified using Fiji ® relatively to HSC70 protein level.

**C**, Protein level of AhR and MITF was analyzed by Western blotting in SK28R cells after decreasing AhR expression after siRNA and quantified using Fiji ® relatively to HSC70 protein level.

**D**, Protein level of AhR and MITF was analyzed by Western blotting in SKMel28Rlow (**D**) after transfection of increasing doses of plasmids for overexpression of human AhR wild type (pLL3.7 AhR WT) or constitutively activated form of AhR (pLL3.7 CA-AhR) and quantified using Fiji ® relatively to HSC70 protein level.

**E**, Venn diagram representing the overlapping between the MITF target genes identified by ChIPseq experiments performed by Strub et al. (Supplementary table 1 from Strub et al.) (Strub et al. 2011) that are differentially regulated between SKMel28S and R and are differentially regulated between between SKMel28R and Rlow cells (GSE#####). Expression Heatmap depicting mRNA expression for overlapping genes in different SKMel28 cell lines (GSE#####).

**F**, Protein level of AhR and MITF was analyzed by Western blotting in SKMel28R after induction of cells by increasing doses of HSP90 specific inhibitor (NVP-HSP990, Selleckchem S7097) and quantified using Fiji ® relatively to HSC70 protein level.

**G**, Expression Heatmap depicting mRNA expression for AhR-target genes in SKMel28R after induction of cells with HSP90 specific inhibitor (NVP-HSP990, Selleckchem S7097, 1nM).

**Supplemented Figure 1: AhR signature correlates with invasive and dedifferentiated phenotype of melanoma cell lines.**

**A**, (top) Pictures of SK28S or R invalidated or not for AhR (x20 magnitude). (bottom) Protein level of AhR was analyzed by Western blotting in BRAFi-sensitive or resistant SK28 cells invalidated or not for AhR and quantified using Fiji ® relatively to HSC70 protein level.

**B**, Expression Heatmap for different genes signatures in melanoma cell lines dataset from the GEO dataset (GSE60664 (Verfaillie et al. 2015)) depending on their proliferative (green) or invasive states (red).

**C**, Expression Heatmap for different genes signatures in melanoma cell lines dataset from the GEO dataset (GSE80824 (Tsoi et al. 2018)) depending on their differentiation status consistent with the four-stage differentiation model (Melanocytic: M, Transitory: T, Neural crest like: N and Undifferentiated) established by Tsoi et al. (Tsoi et al. 2018).

**D**, Expression Heatmap for different genes signatures in single cell analysis of BRAFi-resistant melanoma (19 patients). Cells from tumors of the different patients have been dissociated and individually sequenced for RNA expression (4650 cells) (RNAseq dataset, GEO, GSE72056 (Tirosh et al. 2016)). One filter has been included to only focus on melanoma cells expressing the *MITF* gene.

**E**, Volcano plot combining the fold change magnitude (ratio of expression between SK28 S (green) or R (red) wildtype or invalidated for AhR (KO) and the p-values.

**F**, Venn diagram representing the overlapping between the differentially expressed genes between SK28 R vs R (Fig. 2D), SK28S vs SKO and SK28R vs RKO. The RNA-Seq data are available on the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under the accession number (GSE#####).

**Supplemented Figure 2: Identification of genes involved in “phenotype switching” that are regulated by AhR transcription factor.**

**A**, Venn diagram representing the overlapping between the different genes corresponding to the different signatures between genes that are differentially expressed in 501Mel cells exposed to vehicle, Vem (1 µM) or TCDD (10 nM) (n=2) for 48 h (GSE104869 (Corre et al. 2018)), AhR target genes identified by ChIPseq experiments performed by Mathews’lab for AhR transcription factor 45 min to 24h after induction by TCDD (10 nM) of MCF7 cells (GSE90550 (Yang et al. 2017)) and MITF target genes identified by ChIPseq experiments performed by Strub et al. (Supplementary table 1) (Strub et al. 2011).

**B**, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) showing that selected gene set were enriched in both differentiation (Melanocytic or Transitory) (top, n=92) or dedifferentiation (Neural crest-like

or Undifferentiated) states of melanoma cell lines (bottom n=75) dataset from the GEO dataset (GSE80824 (Tsoi et al. 2018)) established by Tsoi et al. (Tsoi et al. 2018).

**C**, Expression Heatmap for top genes enriched in differentiation (n=25) or dedifferentiation (n=25) states melanoma cell lines dataset from Tsoi et al. (Tsoi et al. 2018).

**D**, Expression Heatmap for different genes in parental (P) cell lines (M229, M234 and M229) treated with DMSO/vehicle, temporal sub-populations (2 d, DTP, DTPP) (days to weeks on BRAFi : PLX4032), and long-term sub-lines (months to years on BRAFi or BRAFi+MEKi : PLX4032+Selunitinib) resulting in single-drug resistant (SDR) or double-drug resistant (DDR) lines. (GEO, GSE75299 (Song et al. 2017)). To derive DTPP clones, parental melanoma cells seeded at low density were treated with drugs as described (Song et al. 2017) every 2-3 days for 3-6 weeks, SDR and DDR sub-lines were derived as described (Nazarian et al. 2010; Moriceau et al. 2015; Shi et al. 2014).

### **Supplemented Figure 3: Role of specific inhibition of AhR target genes in melanoma proliferation.**

**A**, Analysis by RT-qPCR of AhR target genes (sequences in supplemented Table 3) after short term treatment (2 days) of SKMel28R with the AhR specific inhibitor (CH-223191, 10 $\mu$ M).

**B**, Analysis by RT-qPCR of AhR target genes 48h after specific depletion by siRNA (sequences in supplemented Table 4) in SKMel28R.

**C**, Cell density of SKMel28R cells 48h after specific depletion of target genes by siRNA was evaluated by methylene blue staining followed by quantification at 620 nm (n=2). Values, calculated with GraphPad PRISM represent mean  $\pm$  sem of cell density.

### **Supplemented Figure 4 : Regulation of MITF target genes in SK28S or R invalidated or not for AhR**

(top) Volcano plot combining the fold change magnitude (ratio of expression between resistant and sensitive SK28 cell lines) (GSE#####) for MITF target genes identified by ChIPseq experiments performed by Strub et al. (Supplementary table 1) (Strub et al. 2011) (Supplemented Fig. 2A). and the p-values. In red: genes that are regulated after AhR depletion.

(bottom) Volcano plot combining the fold change magnitude (ratio of expression between SK28R and SK28R KO cell lines) (GSE#####) for MITF target genes.

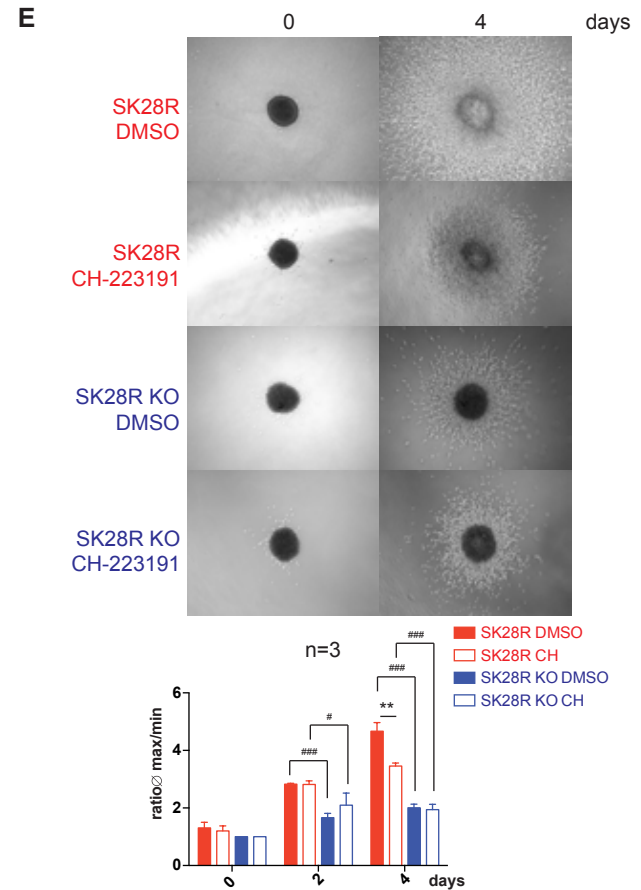
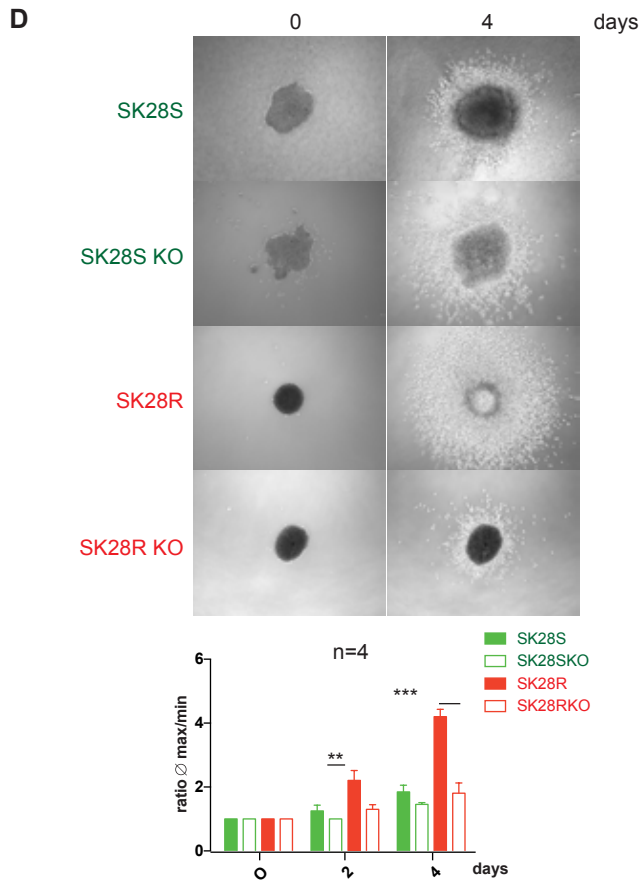
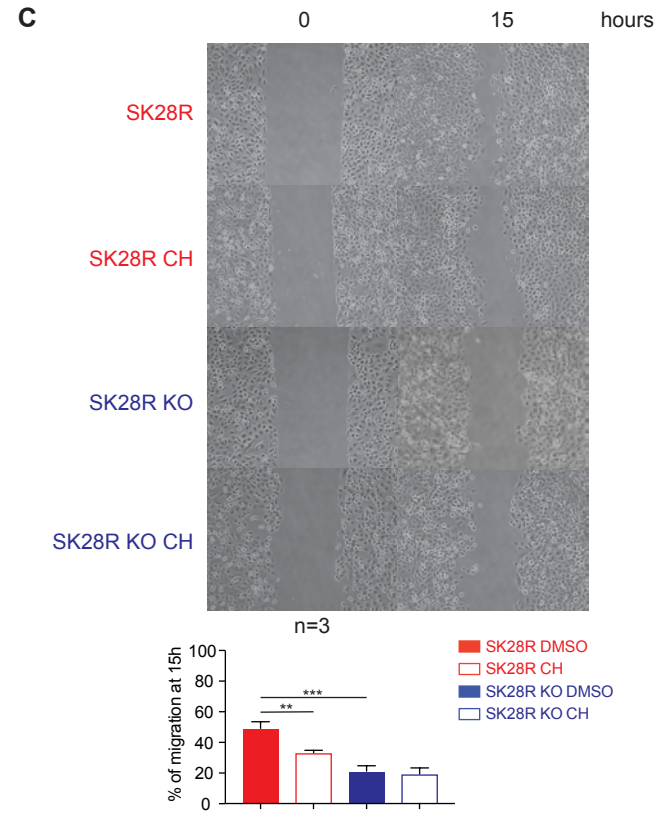
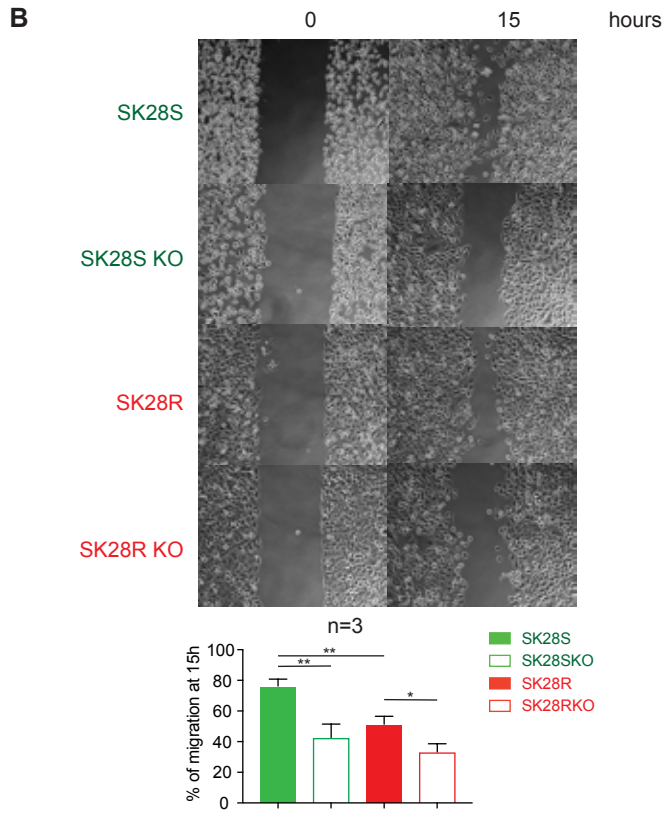
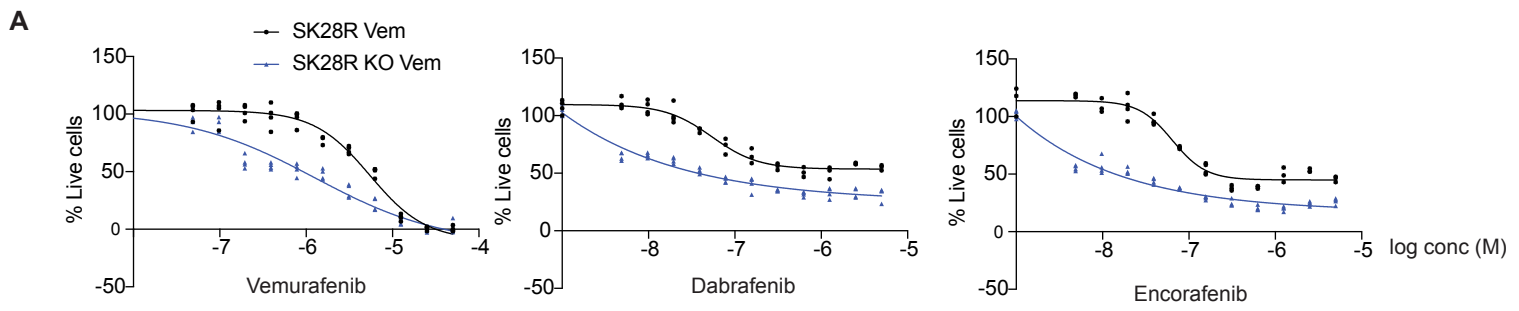


Figure 1

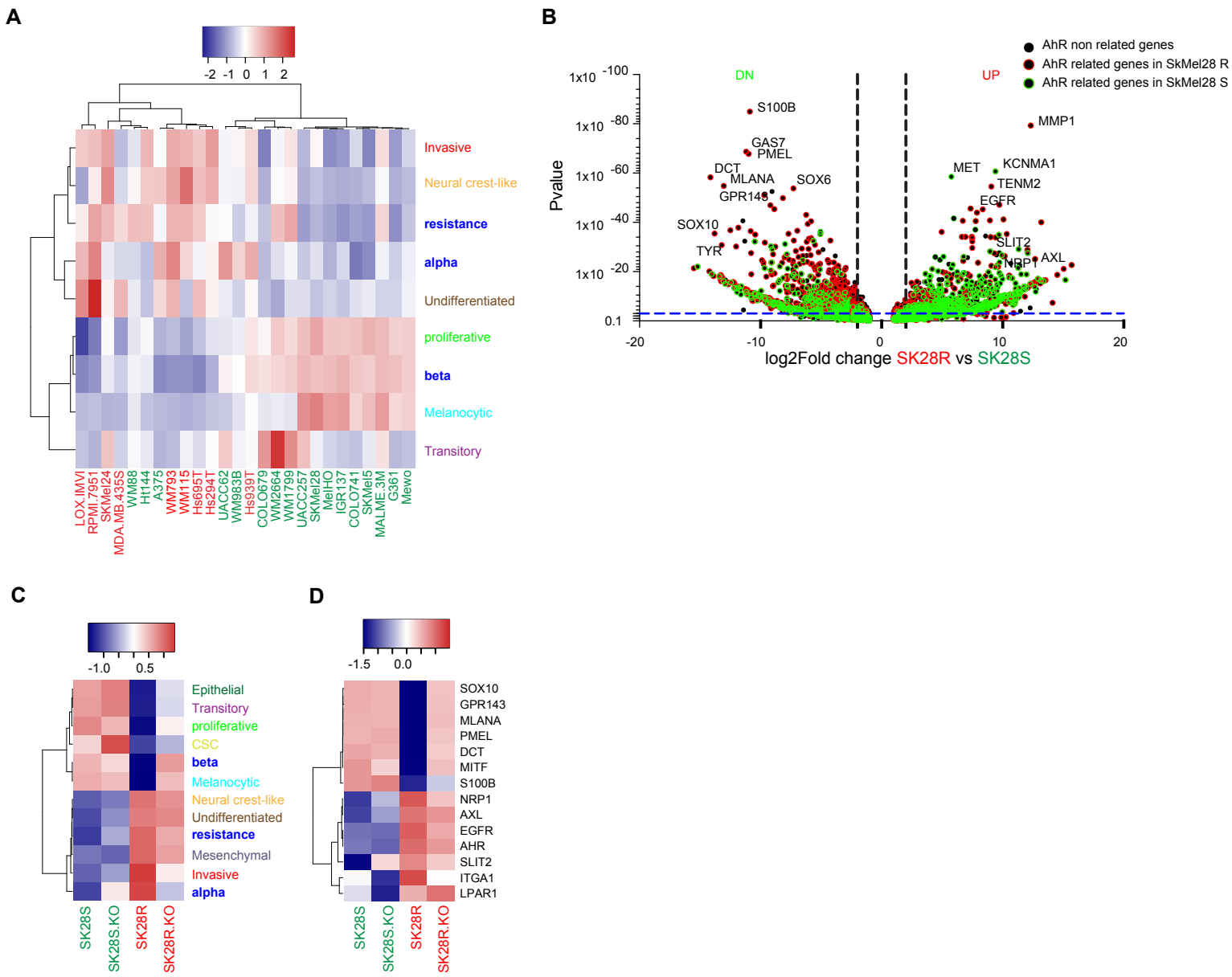
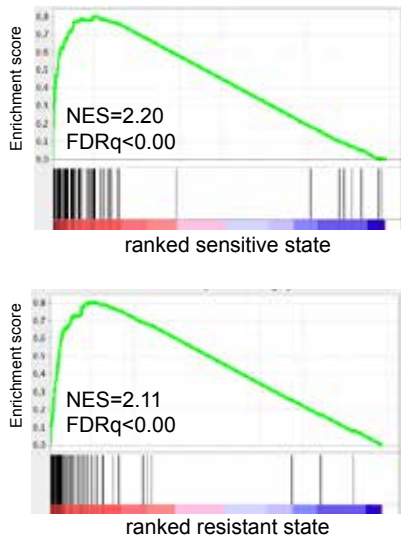
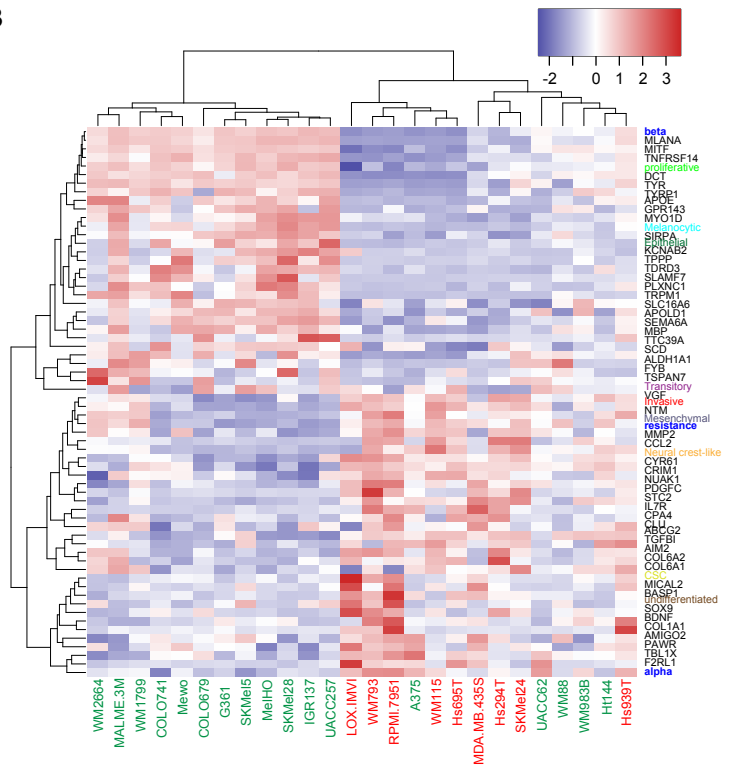


Figure 2

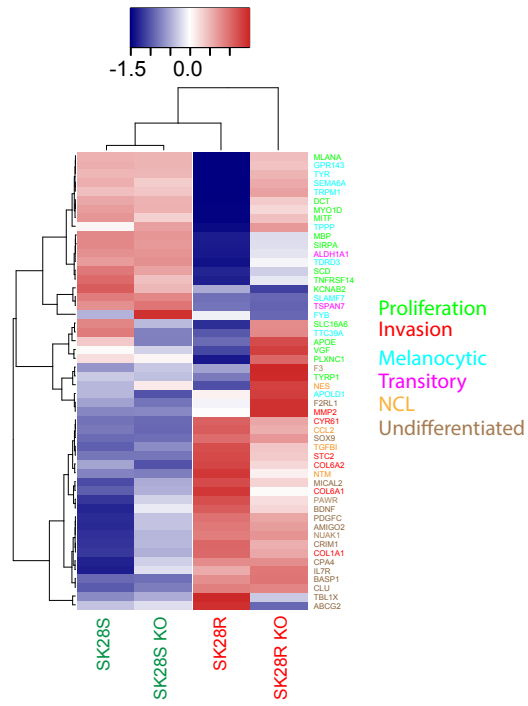
**A**



**B**



**C**



**D**

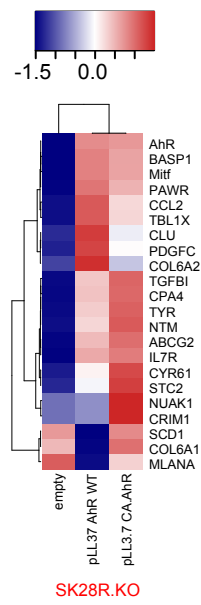
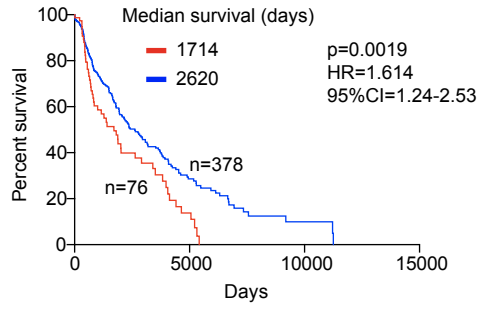
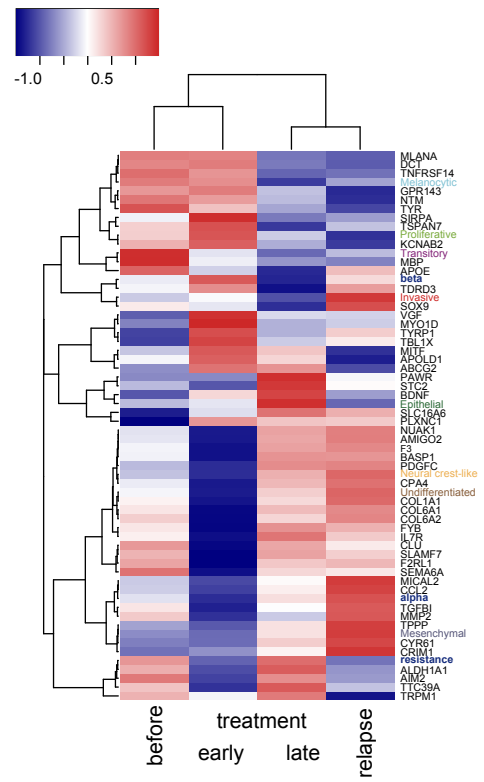


Figure 3

**A****B****Figure 4**

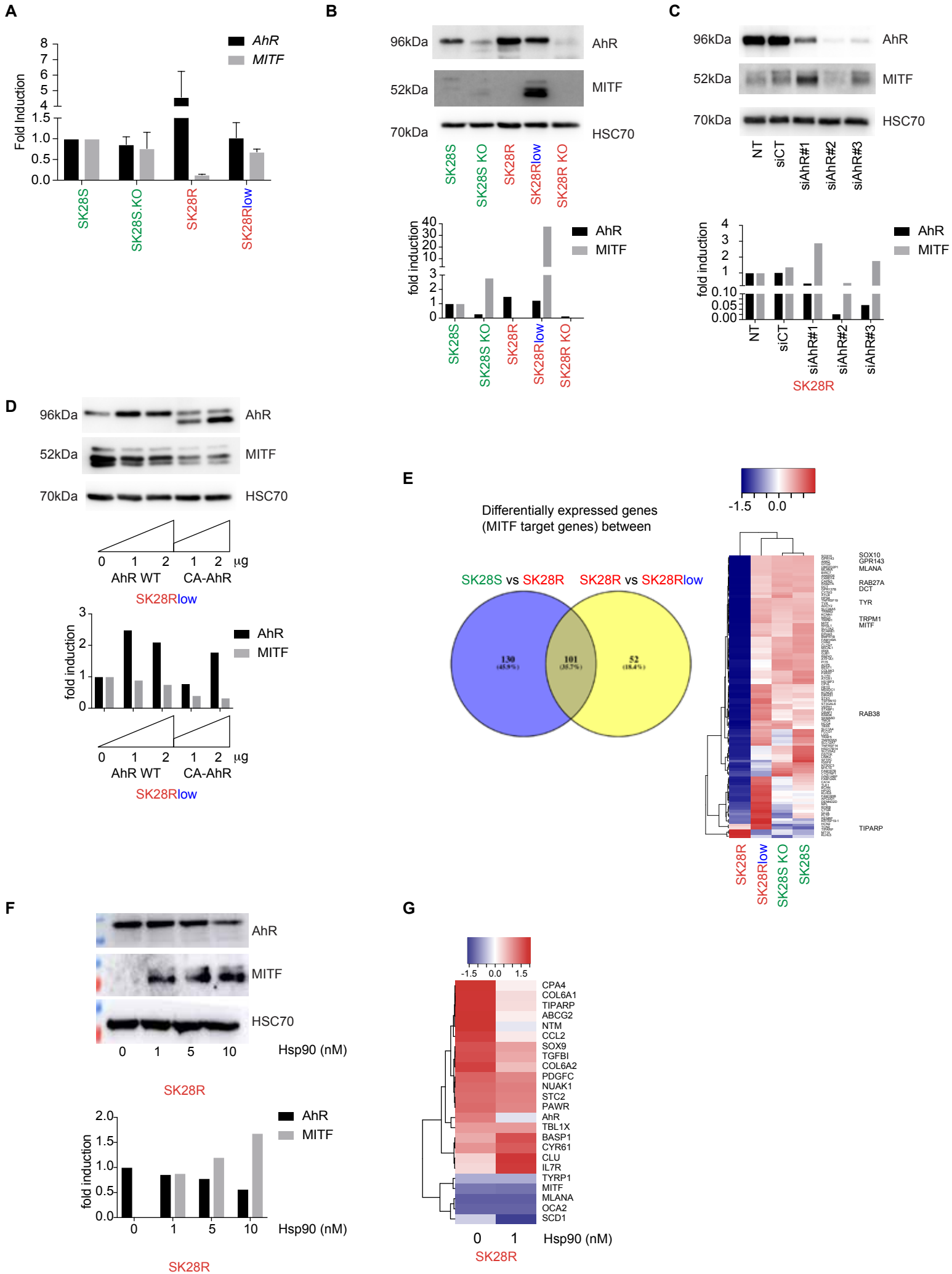
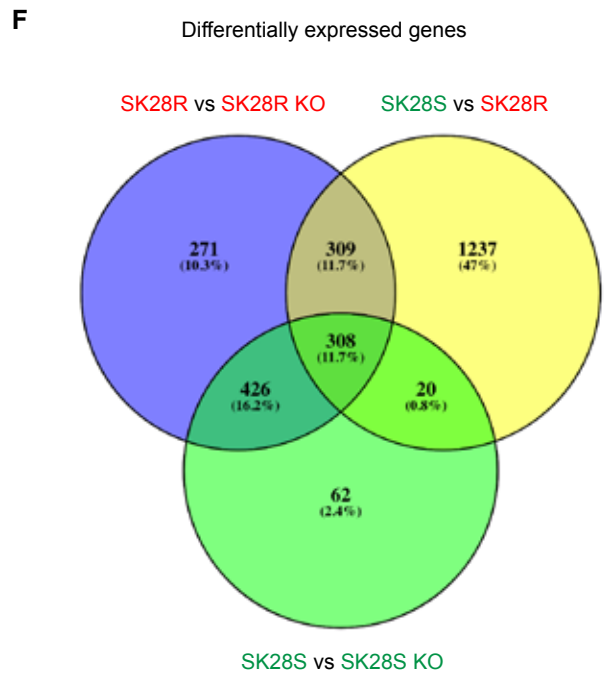
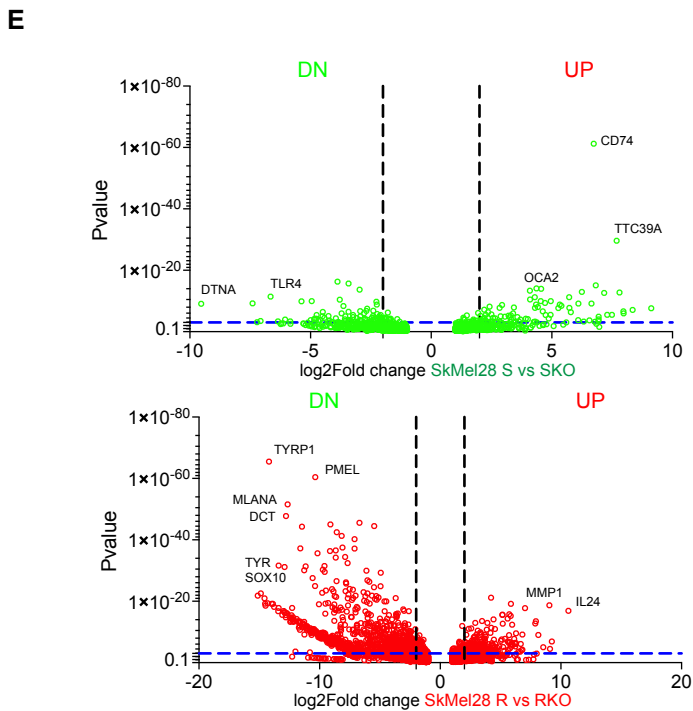
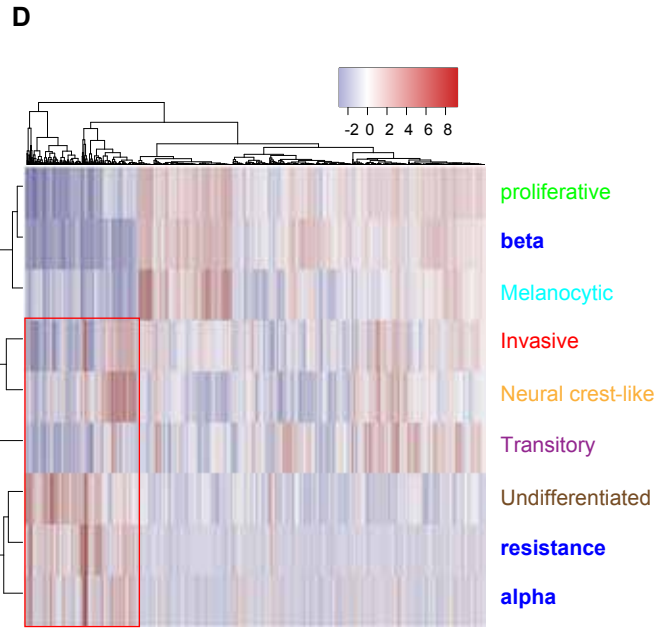
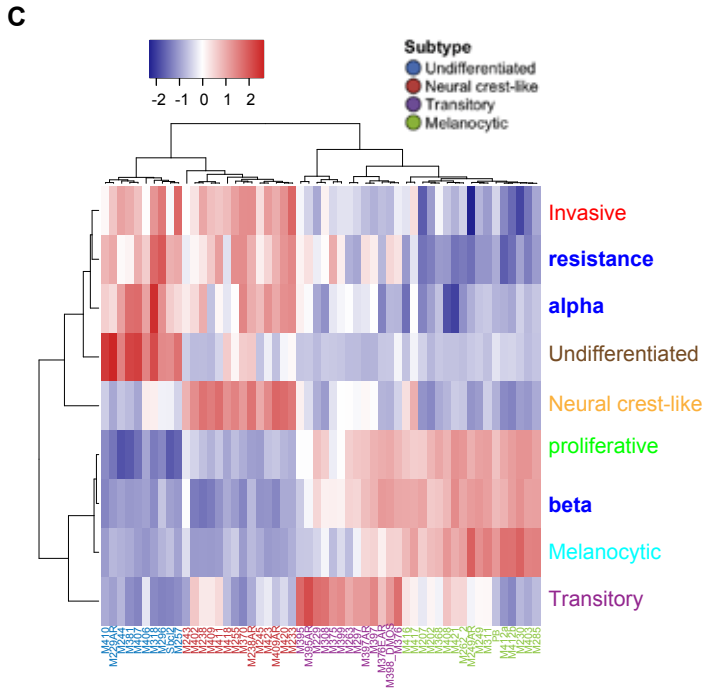
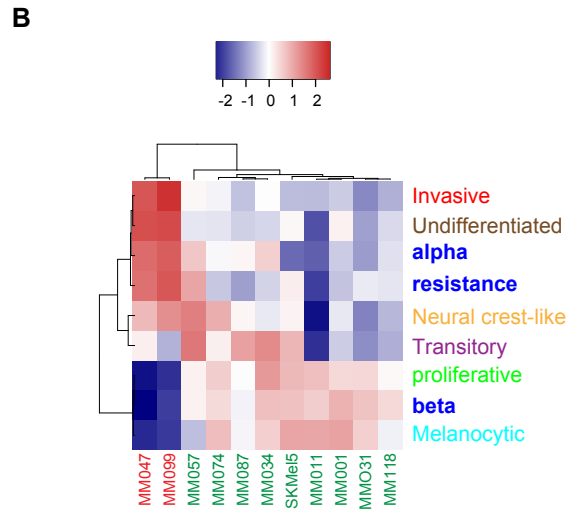
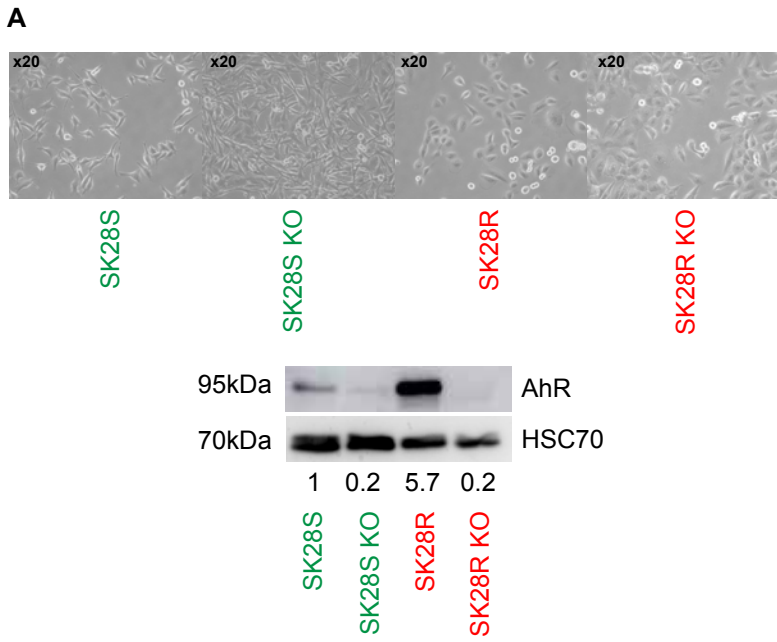
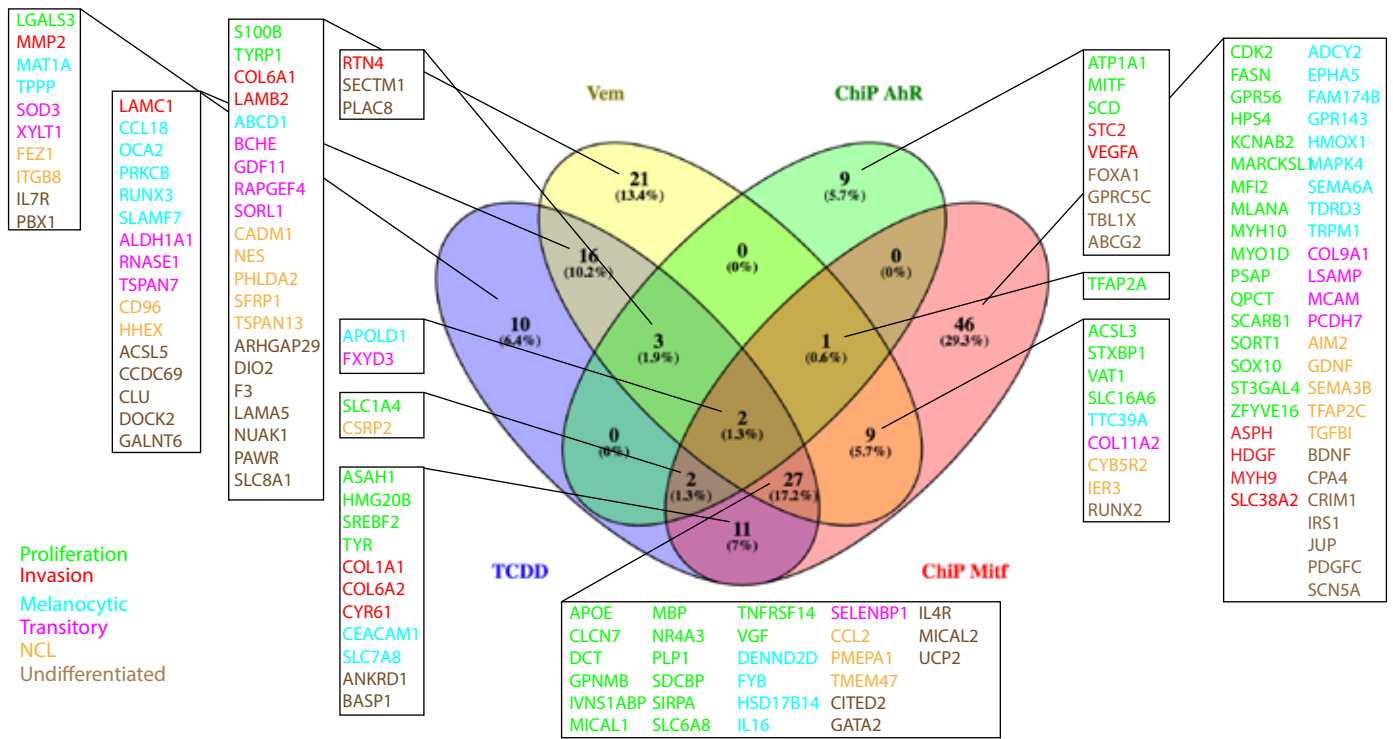


Figure 5

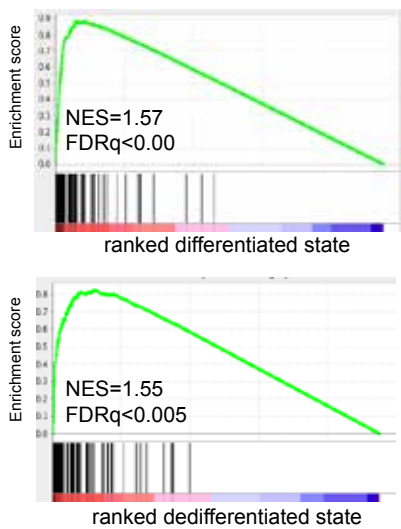




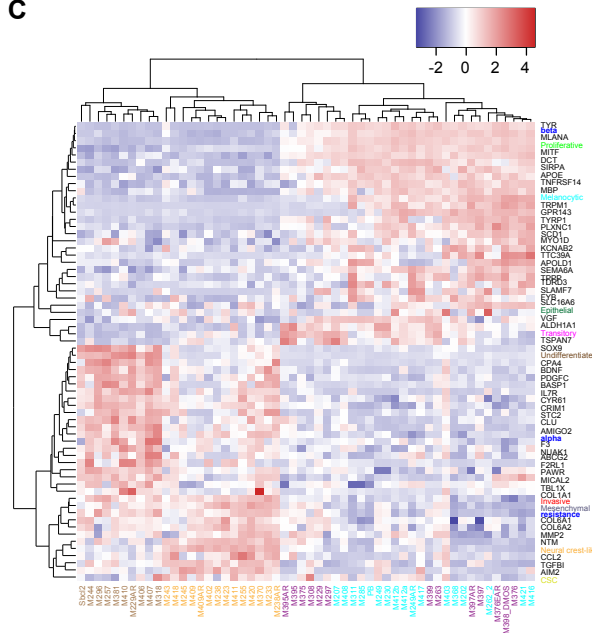
**A**



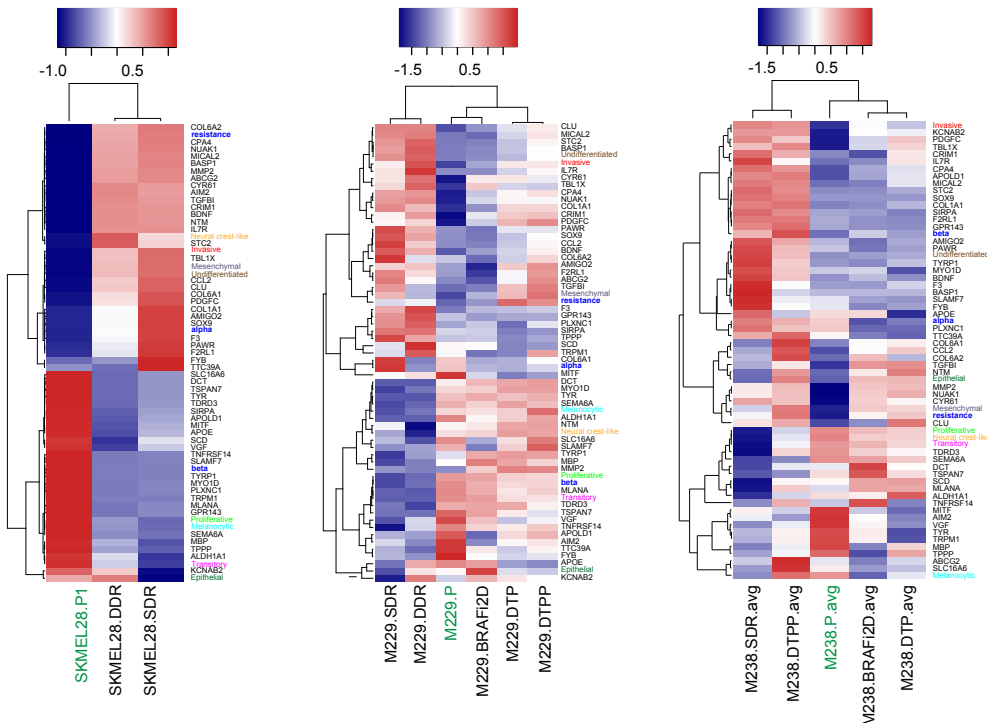
**B**

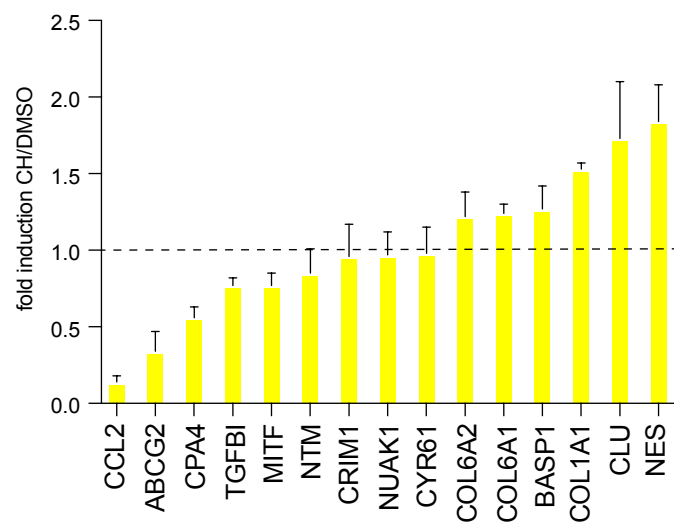
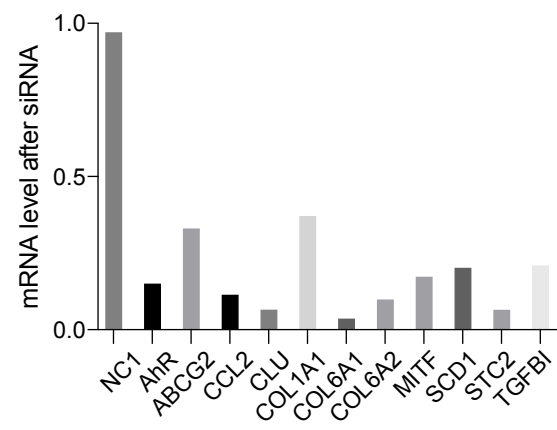
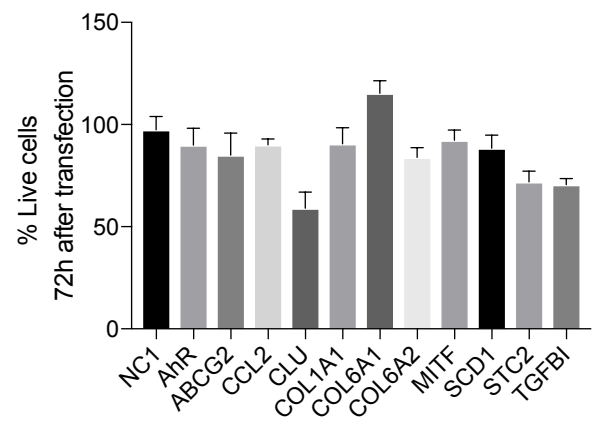


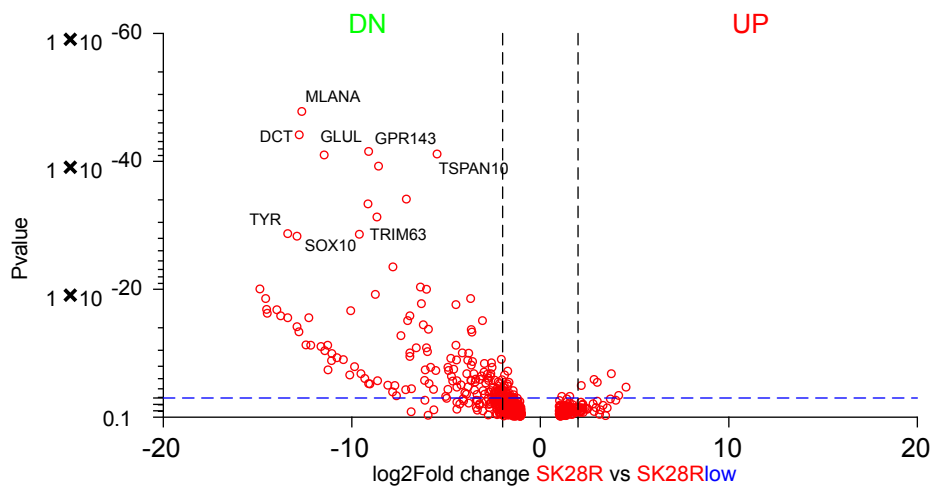
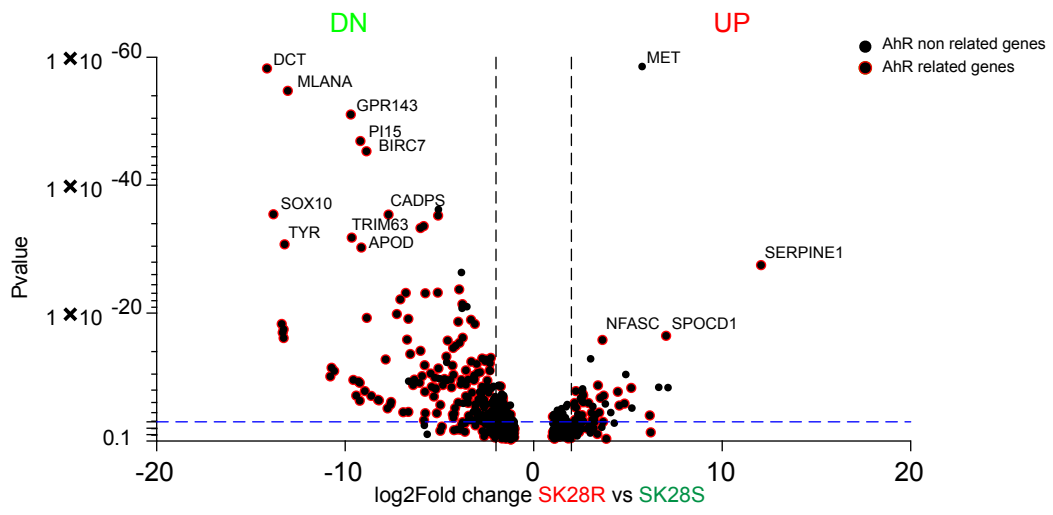
**C**



**D**



**A****B****C**





Gene Set Enrichment analysis for overexpressed genes in BRAFi-sensitive melanoma cell lines from Cancer Cell Line Encyclopediae					
ranked in sensitive state					
NAME	PROBE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
row_0	MITF	0	2.0621039867401123	0.03089603	Yes
row_1	VAT1	3	1.6437630653381348	0.05542222	Yes
row_2	MLANA	7	1.4253958463668823	0.076625705	Yes
row_3	LGALS3	11	1.3423850536346436	0.09658545	Yes
row_4	ASAH1	12	1.3306884765625	0.11652285	Yes
row_5	CLCN7	22	1.2651299238204956	0.13501932	Yes
row_6	GPNMB	28	1.2131004333496094	0.15294008	Yes
row_7	CDK2	29	1.2105351686477661	0.17107725	Yes
row_8	ZFYVE16	39	1.1856961250305176	0.18838358	Yes
row_9	SIRPA	45	1.1420646905899048	0.20524004	Yes
row_10	TYR	48	1.1320749521255493	0.22209972	Yes
row_11	TNFRSF14	49	1.128963589668274	0.23901473	Yes
row_12	SCARB1	53	1.1174943447113037	0.25560498	Yes
row_13	APOE	55	1.1131354570388794	0.27223188	Yes
row_14	HP54	72	1.068587064743042	0.28742683	Yes
row_15	MBP	82	1.035827398300171	0.3024877	Yes
row_16	SDCBP	86	1.0289623737335205	0.3177515	Yes
row_17	SREBF2	95	1.0137163400650024	0.33253205	Yes
row_18	FAM174B	124	0.9518417716026306	0.36035156	Yes
row_19	PSAP	128	0.9442926049232483	0.3743468	Yes
row_20	DC7	130	0.9340509176254272	0.3882905	Yes
row_21	HSD17B14	135	0.9270045757293701	0.40197572	Yes
row_22	GPR143	141	0.9192798733711243	0.41549426	Yes
row_23	SLC6A8	142	0.9186681509017944	0.42925847	Yes
row_24	MYO1D	158	0.8897045850753784	0.4418242	Yes
row_25	MICAL1	178	0.8638425469398499	0.45379862	Yes
row_26	SORT1	240	0.8058663010597229	0.47574455	Yes
row_27	VEGFA	241	0.8049086928367615	0.48780432	Yes
row_28	SOX10	257	0.7936099171638489	0.4989303	Yes
row_29	SEMA6A	260	0.7902194857597351	0.51066804	Yes
row_30	QPCT	281	0.7696774005889893	0.5211806	Yes
row_31	TYRP1	309	0.7490159273147583	0.5310269	Yes
row_32	ADCY2	315	0.7467924952507019	0.5419611	Yes
row_33	TRPM1	327	0.7377306818962097	0.5524537	Yes
row_34	CEACAM1	336	0.7353104948997498	0.56306297	Yes
row_35	TDRD3	360	0.7226859331130981	0.5727186	Yes
row_36	TPPP	363	0.7204734086990356	0.58341134	Yes
row_37	ACSL3	400	0.6997232437133789	0.5920604	Yes
row_38	ABCD1	431	0.6866356730461121	0.6008191	Yes
row_39	IVNS1ABP	441	0.6830155253410339	0.61059386	Yes
row_40	PLP1	470	0.6705129146575928	0.619213	Yes
row_41	APOLD1	471	0.6698083281517029	0.62924856	Yes
row_42	PLXNC1	618	0.6152510643005371	0.63102573	Yes
row_43	MAPK4	619	0.615026593208313	0.6402405	Yes
row_44	FXYD3	664	0.6032119989395142	0.64703584	Yes
row_45	PRKCB	685	0.5981348156929016	0.6549782	Yes
row_46	SLC1A4	720	0.5880330801010132	0.6710073	Yes
row_47	SLAMF7	774	0.5732426643371582	0.67689484	Yes
row_48	MYH10	838	0.5589149594306946	0.6820581	Yes
row_49	MCAM	877	0.5494935512542725	0.6883543	Yes
row_50	OCA2	885	0.5468652248382568	0.69619113	Yes
row_51	RUNX3	902	0.5427998304367065	0.7035083	Yes
row_52	SLC7A8	930	0.5363714098930359	0.71016854	Yes
row_53	NR4A3	932	0.5362226963043213	0.7181517	Yes
row_54	FASN	1053	0.5123520493507385	0.71971226	Yes
row_55	KCNAB2	1110	0.5017020106315613	0.72437507	Yes
row_56	HMG20B	1130	0.49811968207359314	0.73086995	Yes
row_57	IL16	1165	0.4927613437175751	0.73652	Yes
row_58	LSAMP	1199	0.4853188991546631	0.74210954	Yes
row_59	TTC39A	1216	0.48298853635787964	0.7485306	Yes
row_60	ALDH1A1	1217	0.4828605353832245	0.7557652	Yes
row_61	GDF11	1226	0.481351375579834	0.7625694	Yes
row_62	STXBP1	1238	0.47994282841682434	0.7691997	Yes
row_63	CDH3	1260	0.4773573577404022	0.77528155	Yes
row_64	S100B	1371	0.4568566977977527	0.7765203	Yes
row_65	RNASE1	1527	0.43492576479911804	0.775137	Yes
row_66	TSPAN7	1607	0.4239921569824219	0.77746326	Yes
row_67	DENND2D	1645	0.4207620918750763	0.7818817	Yes
row_68	ATP1A1	1654	0.4193308353424072	0.78775674	Yes
row_69	SELENBP1	1838	0.4002652168273926	0.78442705	Yes
row_70	MAT1A	2039	0.3770619034767151	0.7798833	Yes
row_71	TFAP2A	2160	0.3661731481552124	0.7792537	Yes
row_72	FYB	2250	0.3565900921821594	0.78006047	Yes
row_73	RAPGEF4	2269	0.35471850633621216	0.78445774	Yes
row_74	SCD	2274	0.3542410731315613	0.7895614	Yes
row_75	BCHE	2344	0.34791189432144165	0.79125744	Yes
row_76	PCDH7	2389	0.3437664210796356	0.79416555	Yes
row_77	MARCKSL1	2405	0.3424709737300873	0.7985322	Yes
row_78	COL9A1	2456	0.33795079588890076	0.8010474	Yes
row_79	PEBP1	2493	0.3354586362838745	0.8042387	Yes
row_80	HMOX1	2848	0.3077964782714844	0.79080844	No
row_81	SOD3	3026	0.2949451804161072	0.7862066	No
row_82	SORL1	3284	0.2764239013195038	0.77725	No
row_83	COL11A2	3417	0.26851794123649597	0.7745456	No
row_84	SLC16A6	3553	0.26179805397987366	0.7715877	No
row_85	CCL18	3919	0.23999594151973724	0.7603578	No
row_86	MF12	7318	0.08109579235315323	0.58839107	No
row_87	NE5	15286	-0.20191511511802673	0.18537176	No
row_88	SCN5A	17007	-0.2918112874031067	0.10208272	No
row_89	CCDC69	17750	-0.3493594229221344	0.07422985	No
row_90	SEMA3B	18300	-0.4041118323802948	0.052304473	No
row_91	TSPAN13	19359	-0.6100805997848511	0.00752335	No
row_92	HHEX	19548	-0.7156627178192139	0.008664389	No

Table 2b : Gene Set Enrichment analysis for overexpressed genes in BRAFi-sensitive melanoma cell lines from Cancer Cell Line Encyclopediae					
ranked in resistant state					
NAME	PROBE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
row_0	CRIM1	42	0.9426167607307434	0.023147287	Yes
row_1	PDGFC	51	0.9152666926383972	0.047291726	Yes
row_2	HMGA1	78	0.8564644455909729	0.06894251	Yes
row_3	EGFR	80	0.8553443551063538	0.09183589	Yes
row_4	NTM	83	0.8393282890319824	0.11424875	Yes
row_5	BDNF	119	0.7734836935997009	0.13321544	Yes
row_6	STC2	151	0.7360144257545471	0.15138067	Yes
row_7	PMEPA1	163	0.7201982140541077	0.17013976	Yes
row_8	CYR61	174	0.7148749232292175	0.18880695	Yes
row_9	SECTM1	189	0.7063243985176086	0.20704116	Yes
row_10	COL6A2	199	0.7015902996063232	0.22540289	Yes
row_11	TGFBI	205	0.6989232301712036	0.24389672	Yes
row_12	VEGFA	224	0.6831257939338684	0.261305	Yes
row_13	CD96	249	0.6689696907997131	0.27802813	Yes
row_14	SOX9	254	0.6666429042816162	0.29570696	Yes
row_15	PAWR	265	0.6617652177810669	0.31294948	Yes
row_16	ASPH	292	0.6431377530097961	0.32887787	Yes
row_17	RTN4	300	0.6377566456794739	0.3456291	Yes
row_18	IER3	326	0.6226933598518372	0.36105996	Yes
row_19	CPA4	378	0.6029390692710876	0.37463737	Yes
row_20	F2RL1	407	0.5931165814399719	0.38912213	Yes
row_21	NUAK1	423	0.5868393182754517	0.4041003	Yes
row_22	DIO2	435	0.5806843638420105	0.41911697	Yes
row_23	RUNX2	458	0.5724022388458252	0.43335152	Yes
row_24	AMIGO2	467	0.5692670345306396	0.44821462	Yes
row_25	BASP1	479	0.5653040409088135	0.46281874	Yes
row_26	IL7R	495	0.559495747089386	0.47706342	Yes
row_27	TFAP2C	510	0.5569980144500732	0.491292	Yes
row_28	IL4R	540	0.549990713596344	0.504569	Yes
row_29	SLC38A2	554	0.5469866394996643	0.51857996	Yes
row_30	CREB3L1	564	0.5434186458587646	0.5326988	Yes
row_31	EHF	583	0.5381160378456116	0.54621726	Yes
row_32	HDGF	607	0.5330626964569092	0.5593456	Yes
row_33	SFRP1	619	0.5300782918930054	0.5730048	Yes
row_34	FEZ1	625	0.5294061899185181	0.5869514	Yes
row_35	F3	676	0.5174332857131958	0.59828603	Yes
row_36	AIM2	705	0.5099638104438782	0.6105403	Yes
row_37	CSRP2	727	0.506211519241333	0.62305015	Yes
row_38	COL6A1	743	0.5033794641494751	0.6357895	Yes
row_39	GPRC5C	812	0.48889830708503723	0.6454424	Yes
row_40	CLU	827	0.487045556306839	0.65779454	Yes
row_41	GDNF	968	0.4633820652961731	0.66309774	Yes
row_42	ARHGAP29	1052	0.4523451030254364	0.67100656	Yes
row_43	SLC8A1	1138	0.43959325551986694	0.67847145	Yes
row_44	LAMA5	1179	0.4335692524909973	0.6880655	Yes
row_45	CHST2	1241	0.4259575605392456	0.6963864	Yes
row_46	TBL1X	1245	0.425717294216156	0.7076534	Yes
row_47	PBX1	1276	0.4223921000957489	0.7174567	Yes
row_48	ABCG2	1337	0.4152733385562897	0.7255419	Yes
row_49	CADM1	1422	0.40366682410240173	0.732094	Yes
row_50	IRS1	1613	0.38222795724868774	0.73267496	Yes
row_51	CCL2	1768	0.365980327129364	0.7346527	Yes
row_52	TMEM47	1853	0.3586795926094055	0.73999804	Yes
row_53	FOXA1	1858	0.35849735140800476	0.749411	Yes
row_54	PHLDA2	1875	0.3572765290737152	0.7581803	Yes
row_55	GATA2	1890	0.3560572862625122	0.76701874	Yes
row_56	DOCK2	1892	0.355995237827301	0.7765173	Yes
row_57	MYH9	1997	0.34687066078186035	0.7805277	Yes
row_58	CITED2	2028	0.3442990481853485	0.7882362	Yes
row_59	ITGB8	2071	0.34120267629623413	0.7952508	Yes
row_60	GALNT6	2196	0.32997632026672363	0.79778993	Yes
row_61	ANKRD1	2226	0.32738542556762695	0.8050956	Yes
row_62	LAMC1	2428	0.31159788370132446	0.803222	No
row_63	MICAL2	2591	0.2995600402355194	0.80301076	No
row_64	MMP2	2763	0.2886926531791687	0.8020499	No
row_65	JUP	3104	0.26958972215652466	0.7919735	No
row_66	COL1A1	3179	0.2645910084247589	0.79530394	No
row_67	CYB5R2	3791	0.2336823046207428	0.7704688	No
row_68	ACSL5	4121	0.21705573797225952	0.75954306	No
row_69	PLAC8	5537	0.150567889213562	0.69154984	No
row_70	LAMB2	5729	0.1425398737192154	0.68565035	No
row_71	UCP2	6046	0.12861937284469604	0.67301416	No
row_72	EPHA5	14400	-0.17082533240318298	0.2523776	No
row_73	ST3GAL4	16115	-0.25899454951286316	0.17207195	No
row_74	XYLT1	18075	-0.42095059156417847	0.08363868	No

Table 2c : Gene Set Enrichment analysis for overexpressed genes in BRAFi-sensitive melanoma cell lines from Cancer Cell Line Encyclopediae					
ranked in differentiated state					
NAME	PROBE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
row_0	DCT	8	0.691028356552124	0.025211088	Yes
row_1	MLANA	15	0.6200006008148193	0.047930572	Yes
row_2	TRPM1	17	0.6160944700241089	0.07092712	Yes
row_3	MYO1D	20	0.5945929884910583	0.09303346	Yes
row_4	MITF	21	0.5923312306404114	0.115224436	Yes
row_5	SIRPA	23	0.5860340595245361	0.13709481	Yes
row_6	KCNAB2	40	0.504636287689209	0.1546455	Yes
row_7	APOE	45	0.4930799603462219	0.17277941	Yes
row_8	TNFRSF14	47	0.4842083752155304	0.19083501	Yes
row_9	MBP	53	0.4714048206806183	0.20807222	Yes
row_10	TSPAN7	60	0.4638550281524658	0.2249419	Yes
row_11	TYR	61	0.46340373158454895	0.24230275	Yes
row_12	SEMA6A	65	0.4602627754211426	0.2592919	Yes
row_13	GPR143	75	0.43712756037712097	0.27490622	Yes
row_14	ALDH1A1	86	0.4268124997615814	0.2900494	Yes
row_15	FYB	91	0.4215278923511505	0.3055027	Yes
row_16	TPPP	92	0.42070627212524414	0.32126397	Yes
row_17	TTC39A	99	0.4112634062767029	0.33616337	Yes
row_18	PLXNC1	100	0.41065093874931335	0.3515479	Yes
row_19	SLAMF7	108	0.401620477437973	0.36600137	Yes
row_20	TYRP1	121	0.38872435688972473	0.37954828	Yes
row_21	APOLD1	123	0.3853214383125305	0.3938992	Yes
row_22	VGf	127	0.3824118673801422	0.40797174	Yes
row_23	SLC16A6	133	0.37540504336357117	0.42161244	Yes
row_24	TDRD3	134	0.37469178438186646	0.4356498	Yes
row_25	PCDH7	142	0.37124037742614746	0.4489651	Yes
row_26	RUNX3	156	0.35483163595199585	0.4611576	Yes
row_27	SLC6A8	159	0.3478415012359619	0.47401968	Yes
row_28	CEACAM1	161	0.346474289894104	0.48691523	Yes
row_29	OCA2	182	0.33344584703445435	0.523605	Yes
row_30	SLC1A4	183	0.33261242508888245	0.5360659	Yes
row_31	FXYD3	195	0.3265249729156494	0.5473673	Yes
row_32	MF12	198	0.32296085357666016	0.5592972	Yes
row_33	FAM174B	202	0.31972643733024597	0.5710213	Yes
row_34	PLP1	215	0.312244713306427	0.58170307	Yes
row_35	ZFYVE16	219	0.3096281588077545	0.5930488	Yes
row_36	IL16	221	0.30914542078971863	0.6045459	Yes
row_37	GNPMB	222	0.3088925778865814	0.6161182	Yes
row_38	LGALS3	224	0.30612099170684814	0.62750196	Yes
row_39	HPS4	235	0.3010023534297943	0.6379318	Yes
row_40	SORT1	237	0.2981211245059967	0.6490159	Yes
row_41	CDK2	248	0.29213130474090576	0.65911347	Yes
row_42	SORL1	251	0.2892788052558899	0.66978157	Yes
row_43	SLC7A8	261	0.28705334663391113	0.6797735	Yes
row_44	ASAH1	267	0.28116732835769653	0.6898837	Yes
row_45	MYH10	272	0.28003212809562683	0.70003605	Yes
row_46	SOX10	278	0.2771007716655731	0.7099939	Yes
row_47	LSAMP	283	0.27445095777511597	0.71993715	Yes
row_48	ADCY2	290	0.27229738235473633	0.72963035	Yes
row_49	BCH1	292	0.27193430066108704	0.73973334	Yes
row_50	MCAM	317	0.2609277069568634	0.74747634	Yes
row_51	MAT1A	324	0.2566317021846771	0.7565827	Yes
row_52	VAT1	340	0.25203830003738403	0.7647548	Yes
row_53	S100B	348	0.24904324114322662	0.7734921	Yes
row_54	HSD17B14	375	0.23856587707996368	0.78022796	Yes
row_55	HMOX1	434	0.21817095577716827	0.78348994	Yes
row_56	IVNS1ABP	465	0.21167650818824768	0.78887975	Yes
row_57	RAPGEF4	480	0.2063428908586502	0.7954246	Yes
row_58	MICAL1	490	0.20167987048625946	0.80221814	Yes
row_59	SCARB1	518	0.19338776171207428	0.81478685	Yes
row_60	NR4A3	545	0.1879487931728363	0.8196264	Yes
row_61	SELENBP1	558	0.1845467984676361	0.82552403	Yes
row_62	GDF11	567	0.18308165669441223	0.8317055	Yes
row_63	ABCD1	571	0.18187494575977325	0.8382652	Yes
row_64	QPCT	601	0.1741698682308197	0.8423345	Yes
row_65	CLCN7	639	0.16690593957901	0.8454542	Yes
row_66	STXBP1	663	0.16368131339550018	0.8496387	Yes
row_67	COL11A2	692	0.15858280658721924	0.8532087	Yes
row_68	HHEX	696	0.15818794071674347	0.858881	Yes
row_69	SOD3	699	0.15712982416152954	0.86459833	Yes
row_70	MARCKSL1	708	0.15646590292453766	0.8697827	Yes
row_71	FASN	734	0.15347354114055634	0.87341535	Yes
row_72	PRKCB	739	0.1528402864933014	0.8788026	Yes
row_73	CDH3	765	0.14975444972515106	0.88229597	Yes
row_74	RNASE1	972	0.12534135580062866	0.87446135	No
row_75	ATP1A1	997	0.12314587086439133	0.87704253	No
row_76	TFAP2A	1049	0.11881855875253677	0.88179713	No
row_77	SDCBP	1304	0.10161281377077103	0.8640949	No
row_78	DENND2D	1380	0.0979408547282219	0.86141306	No
row_79	ACSL3	1398	0.09737999737262726	0.8636217	No
row_80	SCD	1584	0.0883105918765068	0.8512641	No
row_81	HMG20B	1713	0.0830775797367096	0.84353733	No
row_82	PSAP	1788	0.08051566034555435	0.8402874	No
row_83	CCL18	1893	0.07723767310380936	0.8343741	No
row_84	TSPAN13	2231	0.06654791533946991	0.8083297	No
row_85	NES	2561	0.05764472484588623	0.7826292	No
row_86	COL9A1	3018	0.04724474996328354	0.7457846	No
row_87	PEBP1	3076	0.04623544216156006	0.7426899	No
row_88	SREBF2	3135	0.04538673534989357	0.73947877	No
row_89	MAPK4	3561	0.037251461297273636	0.7048848	No
row_90	SEMA3B	4755	0.018996886909008026	0.6045719	No
row_91	CCDC69	5317	0.010926861315965652	0.5574751	No
row_92	SCN5A	5748	0.00536706205457449	0.52155125	No



Table 2d : Gene Set Enrichment analysis for overexpressed genes in BRAFi-sensitive melanoma cell lines from Cancer Cell Line Encyclopediae					
ranked in differentiated state					
NAME	PROBE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
row_0	CCL2	19	0.6608766317367554	0.032180913	Yes
row_1	PDGFC	25	0.6402608752250671	0.064491004	Yes
row_2	STC2	29	0.6305099129676819	0.0964716	Yes
row_3	IL7R	30	0.6243824362754822	0.12839247	Yes
row_4	NTM	34	0.6151419281959534	0.1595874	Yes
row_5	BDNF	42	0.6002076864242554	0.18968078	Yes
row_6	CRIM1	44	0.5912573337554932	0.21982367	Yes
row_7	BASP1	46	0.5807108879089355	0.24942736	Yes
row_8	CYR61	48	0.5762340426445007	0.2788022	Yes
row_9	NUAK1	58	0.5605746507644653	0.30670038	Yes
row_10	TGFBI	67	0.5375363230705261	0.33350524	Yes
row_11	CPA4	71	0.5250365734100342	0.36009362	Yes
row_12	COL6A2	72	0.5215969681739807	0.3867597	Yes
row_13	AMIGO2	84	0.4972372055053711	0.4112508	Yes
row_14	F3	114	0.4589988589286804	0.43226585	Yes
row_15	COL1A1	125	0.44583895802497864	0.4542138	Yes
row_16	PAWR	150	0.4184523820877075	0.47357848	Yes
row_17	CLU	153	0.4152645170688629	0.4946394	Yes
row_18	F2RL1	177	0.387771338224411	0.5125201	Yes
row_19	SOX9	185	0.3824198842048645	0.5314793	Yes
row_20	COL6A1	226	0.3545737564563751	0.54622614	Yes
row_21	MICAL2	244	0.34116625785827637	0.5622312	Yes
row_22	MMP2	246	0.3405523896217346	0.57955706	Yes
row_23	AIM2	269	0.331856906414032	0.5946637	Yes
row_24	TBL1X	307	0.31122851371765137	0.60744804	Yes
row_25	IRS1	328	0.30289432406425476	0.621243	Yes
row_26	FEZ1	364	0.28753677010536194	0.6329852	Yes
row_27	UCP2	395	0.2779780328273773	0.6446612	Yes
row_28	SECTM1	403	0.27488768100738525	0.65812296	Yes
row_29	PMPEA1	469	0.2554657459259033	0.66569024	Yes
row_30	GPRC5C	473	0.2540595233440399	0.67842525	Yes
row_31	CITED2	479	0.25306636095046997	0.69094044	Yes
row_32	VEGFA	544	0.23377776145935059	0.6974835	Yes
row_33	EPHA5	564	0.22943544387817383	0.70760745	Yes
row_34	GDNF	570	0.22671736776828766	0.7187756	Yes
row_35	TNEM47	618	0.21735626459121704	0.72591573	Yes
row_36	JUP	620	0.21655583381652832	0.7369024	Yes
row_37	SFRP1	684	0.20424051582813263	0.7420199	Yes
row_38	CD96	715	0.19733087718486786	0.74957293	Yes
row_39	ACSL5	719	0.19705112278461456	0.7593934	Yes
row_40	IL4R	745	0.19357328116893768	0.76717687	Yes
row_41	HMG1A1	772	0.19022122025489807	0.7747045	Yes
row_42	IER3	784	0.1883360743522644	0.7834034	Yes
row_43	CSRP2	882	0.17695684731006622	0.7842527	Yes
row_44	FOXA1	909	0.17269103229045868	0.7908841	Yes
row_45	DOCK2	927	0.1702951341867447	0.7981536	Yes
row_46	EGFR	931	0.16947390139102936	0.8065642	Yes
row_47	ARHGAP29	1006	0.16117128729820251	0.80855024	Yes
row_48	SLC8A1	1035	0.1567007601261139	0.8141951	Yes
row_49	ABCG2	1240	0.13699616491794586	0.80395895	Yes
row_50	LAMB2	1251	0.13537228107452393	0.81003463	Yes
row_51	SLC38A2	1297	0.1315433233976364	0.8129567	Yes
row_52	RUNX2	1386	0.12519976496696472	0.8119206	Yes
row_53	TFAP2C	1438	0.12151145935058594	0.81382275	Yes
row_54	CYB5R2	1448	0.12062755227088928	0.8192291	Yes
row_55	CREB3L1	1494	0.1173754632472992	0.82142687	Yes
row_56	ASPH	1532	0.11459709703922272	0.82415867	Yes
row_57	LAMA5	1815	0.09543970227241516	0.8052063	No
row_58	ST3GAL4	1860	0.09302327036857605	0.80624354	No
row_59	PBX1	2001	0.08557771891355515	0.7987873	No
row_60	EHF	2025	0.08460302650928497	0.80116886	No
row_61	CHST2	2128	0.07967233657836914	0.79662204	No
row_62	CADM1	2175	0.07755783200263977	0.79669964	No
row_63	MYH9	2176	0.07750983536243439	0.8006623	No
row_64	ANKRD1	2226	0.07544619590044022	0.8003784	No
row_65	DIO2	2582	0.06113853678107262	0.7735032	No
row_66	PLAC8	3040	0.04785483330488205	0.73732895	No
row_67	ITGB8	3142	0.0451955683529377	0.731104	No
row_68	XYLT1	3220	0.043193597346544266	0.72680503	No
row_69	LAMC1	3426	0.03876972943544388	0.7114627	No
row_70	RTN4	4062	0.025482386350631714	0.65910196	No
row_71	GATA2	4322	0.02068018727004528	0.6382713	No
row_72	HDGF	4392	0.01948905922472477	0.63343644	No
row_73	GALNT6	4414	0.019086413085460663	0.63263756	No
row_74	PHLDA2	4994	0.009917883202433586	0.5842136	No

Table 3. target genes

Gene ID	Name	#OMIM	Description	Function	Role in melanoma and in resistance, invasion, differentiation	Regulation by AHR
ABCG2	ATP-BINDING CASSETTE, SUBFAMILY G, MEMBER 2	603756	membrane transporter belonging to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily of membrane transporters	xenobiotic transporter, multidrug resistance transporter (1)	highly expressed in Vem resistant cells (2,3) and associated with bad prognosis (4)	induction of expression (5,6)
ALDH1A1	ALDEHYDE DEHYDROGENASE 1 FAMILY, MEMBER A1	100640	liver cytosolic isoform of acetaldehyde dehydrogenase	detoxification of endogenous and exogenous aldehyde substrates, stem cells and cancer stem cells marker (7)	Inhibition significantly reduces melanoma tumor growth and invasion (8)	induction of expression (8)
BASP1	BRAIN-ABUNDANT SIGNAL PROTEIN, MEMBRANE-ATTACHED, 1	605940		Intercellular signaling and nerve outgrowth	susceptibility locus associated with melanoma (9,10)	
BDNF	BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR	113505	prosurvival factor	survival of striatal neurons in the brain	involved in melanoma dedifferentiation reprogramming (11)	potential regulation (12)
CCL2	CHEMOKINE, CC MOTIF, LIGAND 2	158105	member of the small inducible gene (SIG) family	recruitment of monocytes to sites of injury and infection, tumor progression, angiogenesis (13)	induced specific miRNA expression in resistant melanoma (14), BRAF decreased CCL2 expression (15), CCL2 favorize melanoma invasion (16), therapeutic target in melanoma (17)	induction of expression (18,19)
CLU	CLUSTERIN	185430	member of the human complement system	control mechanism of the complement cascade; role in cancer chemoresistance (20)	regulates drug resistance in melanoma (21) Loss of expression induces apoptosis in melanoma (22)	Loss of expression induces apoptosis in melanoma (22)
COL1A1	COLLAGEN, TYPE I, ALPHA-1	120150	protein containing 2 alpha-1 polypeptide chains and 1 alpha-2 chain	Skin Collagen component	expressed in melanoma metastasis (23)	FICZ inhibits induction of expression by TGFβ (24,25)
COL6A1	COLLAGEN, TYPE VI, ALPHA-1	120220	Members of the collagen VI family	form distinct networks of microfibrils in connective tissue and interact with other extracellular matrix components	high expression is a poor prognosis in cancer (26-28)	
COL6A2	COLLAGEN, TYPE VI, ALPHA-2	120240	alpha-2 subunit of type VI collagen	extracellular matrix protein	high expression is a poor prognosis in cancer (29)	
CPA4	CARBOXYPEPTIDASE A4	607635	metallocarboxypeptidase	cell proliferation and differentiation	prognostic markers in several cancers (30-34)	
CRIM1	CYSTEINE-RICH MOTOR NEURON PROTEIN 1	606189	Membrane protein	interaction with growth factors implicated in motor neuron differentiation and survival, antagonist of BMP	invasion and migration (35), high expression in cancer (36)	
CYR61	CYSTEINE-RICH, ANGIOGENIC INDUCER, 61	602369	secreted, cysteine-rich, heparin-binding protein acting as an extracellular matrix-associated signaling protein	promotes the adhesion of endothelial cells through interaction with integrin and augments growth factor-induced DNA synthesis in the same cell type (37)	tumor suppressor in melanoma (38), therapeutic target (39)	potential regulation (40)
F2RL1	COAGULATION FACTOR II RECEPTOR-LIKE 1	600933	7-transmembrane-region receptor	Inflammation	contributes to tumor cell motility and metastasis (41), loss of PAR2 contributes to the limitation of local metastatic spread of melanoma (42)	
IL7R	INTERLEUKIN 7 RECEPTOR	146661	receptor for interleukin-7	regulation of lymphopoiesis		
MICAL2	MICROTUBULE-ASSOCIATED MONOOXYGENASE, CALPONIN AND LIM DOMAINS-CONTAINING, 2	608881	cytoskeleton dynamics regulator	cell growth, axon guidance, vesicle trafficking, apoptosis	involved in cell migration, invasion and EMT (43, 45)	
NTM	NEUOTRIMIN	607938	IgLN family of GPI-anchored cell adhesion molecules			
NUAK1	NUAK FAMILY, SNF1-LIKE KINASE, 1	608130		tumor cell survival factor	high expression is a poor prognosis in cancer (46-48), involved in chemoresistance by inducing EMT (49), potential target in melanoma (50)	
PAWR	PRK, APOPTOSIS, WTL, REGULATOR	601936		inhibition of transcription induced by WT1		
PDGFC	PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR C	608452	monomeric protein secreted as a latent dimeric factor, PDGFCC,	major mitogens and stimulants of motility in mesenchymal cells	paracrine stimulation of NRP1 by PDGFCC contributes to the acquisition of a metastatic phenotype by melanoma cell (51)	
SOX9	SRY-BOX 9	608160	transcription factor essential for both sex and skeletal development	formation of testes from bipotential gonads	high expression is a poor prognosis in melanoma and is associated with invasion phenotype (52)	
STC2	STANNIOCALCIN 2	603665		regulation of Ca2+, highly expressed in cancers (53)	induces cell proliferation in cisplatin resistant cervical cancer (54)	induction of expression (55, 56)
TBLIX	TRANSDUCIN-BETA-LIKE 1, X-LINKED	300196	component of the nuclear corepressor (NCOR) complex	specific adaptor that recruits the ubiquitin-conjugating/195, proteasome complex	important for wnt signalling activation (57)	
TGFBI	TRANSFORMING GROWTH FACTOR, BETA-INDUCED	601692	extracellular matrix protein	binding to fibronectin, collagen, and integrins	high expression is a poor prognosis in melanoma and is associated with invasion phenotype (58, 59)	

### Supplemented references related to Table 3

1. Hasanabady, M. H. & Kalalinia, F. ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer. *J. Biosci.* **41**, 313–324 (2016).
2. Zubrilov, I. *et al.* Vemurafenib resistance selects for highly malignant brain and lung-metastasizing melanoma cells. *Cancer Lett.* **361**, 86–96 (2015).
3. Michaelis, M. *et al.* Association between acquired resistance to PLX4032 (vemurafenib) and ATP-binding cassette transporter expression. *BMC Res. Notes* **7**, 1–7 (2014).
4. Speigl, L., Janssen, N., Weide, B., Pawelec, G. & Shipp, C. Prognostic impact of the putative cancer stem cell markers ABCG2, CD133, ALDH1A1 and CD44V7/8 in metastatic melanoma. *Br. J. Dermatol.* **177**, 1447–1449 (2017).
5. Yan, B. *et al.* Activation of AhR with nuclear IKK $\alpha$  regulates cancer stem-like properties in the occurrence of radioresistance. *Cell Death Dis.* **9**, (2018).
6. Wu, C., Yu, S., Tan, Q., Guo, P. & Liu, H. Role of AhR in regulating cancer stem cell-like characteristics in choriocarcinoma. *Cell Cycle* **17**, 2309–2320 (2018).
7. Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T. & Hara, A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* **7**, 11018–11032 (2016).
8. Contador-Troca, M. *et al.* Dioxin receptor regulates aldehyde dehydrogenase to block melanoma tumorigenesis and metastasis. *Mol. Cancer* **14**, 148 (2015).
9. Chahal, H. S. *et al.* ARTICLE Genome-wide association study identifies novel susceptibility loci for cutaneous squamous cell carcinoma. *Nat. Commun.* **7**, 1–8 (2016).
10. Ransohoff, K. J. *et al.* Two-stage genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus associated with melanoma. *Oncotarget* **8**, 17586–17592 (2017).
11. Zhang, H. *et al.* Reprogramming A375 cells to induced-resembled neuronal cells by structured overexpression of specific transcription genes. *Mol. Med. Rep.* **14**, 3134–3144 (2016).
12. Lin, C.-H. *et al.* Knockdown of the aryl hydrocarbon receptor attenuates excitotoxicity and enhances NMDA-induced BDNF expression in cortical neurons. *J. Neurochem.* **111**, 777–789 (2009).
13. Yoshimura, T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 335–345 (2018).
14. Vergani, E. *et al.* Overcoming melanoma resistance to vemurafenib by targeting CCL2-induced miR-34a, miR-100 and miR-125b. *Oncotarget* **7**, 4428–4441 (2015).
15. Knight, D. A. *et al.* Host immunity contributes to the anti-melanoma activity of BRAF inhibitors. *J. Clin. Invest.* **123**, 1371–1381 (2013).
16. Li, L., Dragulev, B., Zigrino, P., Mauch, C. & Fox, J. W. The invasive potential of human melanoma cell lines correlates with their ability to alter fibroblast gene expression in vitro and the stromal microenvironment in vivo. *Int. J. Cancer* **125**, 1796–1804 (2009).
17. Gazzaniga, S. *et al.* Targeting Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of MCP-1 Reduce Angiogenesis and Tumor Growth in a Human Melanoma Xenograft. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 2031–2041 (2007).
18. Goode, G., Pratap, S. & Eltom, S. E. Depletion of the aryl hydrocarbon receptor in MDA-MB-231 human breast cancer cells altered the expression of genes in key regulatory pathways of cancer. *PLoS One* **9**, e100103–e100103 (2014).
19. Watanabe, I. *et al.* Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Indoxyl Sulfate-Induced Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Circ. J.* **77**, 224–230 (2013).

20. Koltai, T. OTT-58622-clusterin--a-central-player-in-cancer-chemoresistance-and-it. *Onco. Targets. Ther.* **7**, 447–456 (2014).
21. Hoeller, C. *et al.* Clusterin regulates drug-resistance in melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 1300–1307 (2005).
22. Mustafi, S., Sant, D. W., Liu, Z. J. & Wang, G. Ascorbate induces apoptosis in melanoma cells by suppressing Clusterin expression. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
23. Ilhan-Mutlu, A. *et al.* Expression profiling of angiogenesis-related genes in brain metastases of lung cancer and melanoma. *Tumor Biol.* **37**, 1173–1182 (2016).
24. Murai, M. *et al.* An endogenous tryptophan photo-product, FICZ, is potentially involved in photo-aging by reducing TGF- $\beta$ -regulated collagen homeostasis. *J. Dermatol. Sci.* **89**, 19–26 (2018).
25. Monteleone, I. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor-driven signals inhibit collagen synthesis in the gut. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1047–1057 (2016).
26. Turtoi, A. *et al.* Accessibilome of human glioblastoma: Collagen-VI-alpha-1 is a new target and a marker of poor outcome. *J. Proteome Res.* **13**, 5660–5669 (2014).
27. Wan, F. *et al.* Upregulation of COL6A1 is predictive of poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma patients. *Oncotarget* **6**, 27378–87 (2015).
28. Hou, T. *et al.* Expression of COL6A1 predicts prognosis in cervical cancer patients. *Am. J. Transl. Res.* **8**, 2838–2844 (2016).
29. Cheon, D. *et al.* Serous Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**, 711–723 (2015).
30. Sun, L. *et al.* CPA4 is a promising diagnostic serum biomarker for pancreatic cancer. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 91–96 (2016).
31. Sun, L. *et al.* CPA4 is a novel diagnostic and prognostic marker for human non-small-cell lung cancer. *J. Cancer* **7**, 1197–1204 (2016).
32. Tanco, S. *et al.* Characterization of the substrate specificity of human carboxypeptidase A4 and implications for a role in extracellular peptide processing. *J. Biol. Chem.* **285**, 18385–18396 (2010).
33. Sun, L. *et al.* Serum carboxypeptidaseA4 levels predict liver metastasis in colorectal carcinoma. *Oncotarget* **7**, (2016).
34. Sun, L. *et al.* Association between expression of carboxypeptidase 4 and stem cell markers and their clinical significance in liver cancer development. *J. Cancer* **8**, 111–116 (2017).
35. Ogasawara, N. *et al.* Reduction of Membrane Protein CRIM1 Decreases E-Cadherin and Increases Claudin-1 and MMPs , Enhancing the Migration and Invasion of Renal Carcinoma Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **41**, 604–611 (2018).
36. Tang, H. Z. and L. CRIM1, the Antagonist of BMPs, is a Potential Risk Factor of Cancer. *Current Cancer Drug Targets* **14**, 652–658 (2014).
37. Lau, L. F. CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3149–3163 (2011).
38. Dobroff, A. S. *et al.* Silencing cAMP-response element-binding protein (CREB) identifies CYR61 as a tumor suppressor gene in melanoma. *J. Biol. Chem.* **284**, 26194–26206 (2009).
39. Chen, J. *et al.* CYR61 suppresses growth of human malignant melanoma. *Oncol. Rep.* **36**, 2697–2704 (2016).
40. Collins, N. H. *et al.* Characterization of antiestrogenic activity of the Chinese herb, *prunella vulgaris*, using in vitro and in vivo (Mouse Xenograft) models. *Biol. Reprod.* **80**, 375–383 (2009).

41. Shi, X., Gangadharan, B., Brass, L., Ruf, W. & Mueller, B. Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol. Cancer Res.* **2**, 395–402 (2004).
42. OLEJAR, T. *et al.* Dual Role of Host Par2 in a Murine Model of Spontaneous Metastatic B16 Melanoma. *Anticancer Res.* **34**, 3511–3515 (2014).
43. Mariotti, S. *et al.* MICAL2 is a novel human cancer gene controlling mesenchymal to epithelial transition involved in cancer growth and invasion. *Oncotarget* **7**, (2016).
44. Wang, Y. *et al.* MICAL2 promotes breast cancer cell migration by maintaining epidermal growth factor receptor (EGFR) stability and EGFR/P38 signalling activation. *Acta Physiol.* **222**, 1–15 (2018).
45. Cai, Y., Lu, J. & Tang, F. Overexpression of MICAL2, a novel tumor-promoting factor, accelerates tumor progression through regulating cell proliferation and EMT. *J. Cancer* **9**, 521–527 (2018).
46. Port, J. *et al.* Colorectal Tumors Require NUAK1 for Protection from Oxidative Stress. *Cancer Discov.* **8**, 632–647 (2018).
47. Phippen, N. T. *et al.* NUAK1 (ARK5) Is Associated with Poor Prognosis in Ovarian Cancer. *Front. Oncol.* **6**, 213 (2016).
48. Chen, D. *et al.* Knockdown of ARK5 Expression Suppresses Invasion and Metastasis of Gastric Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* **42**, 1025–1036 (2017).
49. Xu, T. *et al.* ARK5 promotes doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma via epithelial–mesenchymal transition. *Cancer Lett.* **377**, 140–148 (2016).
50. Bell, R. E. *et al.* Transcription Factor/microRNA Axis Blocks Melanoma Invasion Program by miR-211 Targeting NUAK1. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 441–451 (2014).
51. Ruffini, F. *et al.* Platelet-derived growth factor-C promotes human melanoma aggressiveness through activation of neuropilin-1. *Oncotarget* **8**, 66833–66848 (2017).
52. Cheng, P. F. *et al.* Methylation-dependent SOX9 expression mediates invasion in human melanoma cells and is a negative prognostic factor in advanced melanoma. *Genome Biol.* **16**, 42 (2015).
53. Yeung, B. H. Y., Law, A. Y. S. & Wong, C. K. C. Evolution and roles of stanniocalcin. *Mol. Cell. Endocrinol.* **349**, 272–280 (2012).
54. Wang, Y., Gao, Y., Cheng, H., Yang, G. & Tan, W. Stanniocalcin 2 promotes cell proliferation and cisplatin resistance in cervical cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 362–368 (2015).
55. Joshi, A. D., Hossain, E. & Elferink, C. J. Epigenetic Regulation by Agonist-Specific Aryl Hydrocarbon Receptor Recruitment of Metastatic Associated Protein 2 Selectively Induces Stanniocalcin 2 Expression. *Mol. Pharmacol.* mol.117.108878 (2017). doi:10.1124/mol.117.108878
56. Harper Jr, T. A., Joshi, A. D. & Elferink, C. J. Identification of stanniocalcin 2 as a novel aryl hydrocarbon receptor target gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **344**, 579–588 (2013).
57. Li, J. & Wang, C.-Y. TBL1–TBLR1 and  $\beta$ -catenin recruit each other to Wnt target-gene promoter for transcription activation and oncogenesis. *Nat. Cell Biol.* **10**, 160 (2008).
58. Lauden, L. *et al.* TGF- $\beta$ -induced (TGFBI) protein in melanoma: A signature of high metastatic potential. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1675–1685 (2014).
59. Nummela, P. *et al.* Transforming growth factor beta-induced (TGFBI) is an anti-adhesive protein regulating the invasive growth of melanoma cells. *Am. J. Pathol.* **180**, 1663–1674 (2012).

### III- Utilisation thérapeutique des antagonistes d'AhR dans le traitement du mélanome en combinaison avec les inhibiteurs de BRAF

Héloïse M. Leclair, **Nina Tardif**, Anaïs Paris, Marie-Dominique Galibert & Sébastien Corre

*Manuscrit en préparation*

Les inhibiteurs de la kinase mutée BRAF<sup>V600E</sup> (BRAFi), couramment utilisés dans le traitement du mélanome métastatique, sont associés à des réponses à court terme impressionnantes. Malheureusement, ces réponses sont suivies par le développement de mécanismes de résistances conduisant à la rechute systématique des patients. Nous avons précédemment démontré que l'activation canonique du facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) dans une sous-population de cellules tumorales participait à l'acquisition de la résistance aux BRAFi en favorisant un phénotype indifférencié / invasif. Nous avons également établi qu'il était possible de contrer cette activation délétère par l'utilisation d'un antagoniste d'AhR : le flavonoïde resveratrol. Grande famille de molécules naturelles regroupant plus de 9000 composés, les flavonoïdes sont de plus en plus étudiés pour leurs propriétés anti-tumorales, cependant leur mécanisme d'action reste peu compris.

Ici, nous nous sommes intéressés à un panel de flavonoïdes. Dans un premier temps, nous avons démontré que les flavonoïdes sélectionnés étaient des antagonistes puissants d'AhR, capables d'empêcher l'activation du programme canonique induite par des ligands agonistes, particulièrement l'apigénine (Api) et la chrysin (Chr). En effet ces flavonoïdes augmentent significativement la sensibilité aux BRAFi des cellules résistantes. Cela s'explique par leur capacité à diminuer l'expression de gènes impliqués dans l'acquisition de la résistance comme *AXL*, *NRP1* ou *LPAR1*. De plus, l'Api et la Chr influent sur le phénotype des cellules de mélanome résistantes aux BRAFi : une diminution de la migration et de l'invasion des cellules est observée après un traitement court (48h) ou long (14 jours) des cellules par ces flavonoïdes.

Ainsi, l'utilisation thérapeutique des flavonoïdes en combinaison avec les inhibiteurs de BRAF représente un nouvel espoir afin de prévenir l'acquisition d'un phénotype résistant aux BRAFi. La validation de ces molécules *in vivo* est actuellement en cours.

## **Role of flavonoids in the prevention of AhR-dependent resistance during treatment with BRAF inhibitors**

Héloïse M. LECLAIR<sup>1</sup>, Nina TARDIF<sup>1</sup>, Anaïs PARIS<sup>1</sup>, Marie-Dominique GALIBERT<sup>1,2,#</sup>, Sébastien CORRE<sup>1,#</sup>

<sup>1</sup>Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) – UMR6290, F-35000 Rennes, France.

<sup>2</sup>Hospital University of Rennes (CHU Rennes), Department of Molecular Genetics and Genomics, F-35000 Rennes, France.

#Corresponding authors ([sebastien.corre@univ-rennes1.fr](mailto:sebastien.corre@univ-rennes1.fr); [mgaliber@univ-rennes1.fr](mailto:mgaliber@univ-rennes1.fr))

## **Abstract**

BRAF and MEK inhibitors (BRAFi and MEKi) are actively used for the treatment of metastatic melanoma in patients with BRAF<sup>V600E</sup> mutations, greatly improving progression-free survival. However, the development of resistance to BRAFi and MEKi remains a difficult clinical challenge with limited therapeutic options available for these patients. In this study, we investigated the therapeutic potential of BRAFi and natural flavonoids combination, with flavonoids acting as specific AhR transcription factor antagonists. **Experimental Design:** Investigations were performed *in vitro* and *in vivo* with various human melanoma cell lines (mutated for BRAF<sup>V600E</sup>) sensitive and resistant to BRAFi. We evaluated the role of different flavonoids on sensitivity to BRAFi and their ability to counteract resistance and invasive phenotype of melanoma. **Results:** Herein we report that flavonoids are highly effective to potentialize BRAFi therapy in human melanoma cell lines by increasing sensitivity and by delaying the emergence of resistant/persister cells occurring during treatment. Thanks to their function as AhR antagonists, flavonoids counteract a gene expression program associated with resistance acquiring and phenotype switching, leading to an invasive and EMT-like phenotype. **Conclusions:** The use of natural flavonoids thus opens new therapeutic opportunities for the treatment of patients with BRAF-resistant disease.



## Introduction

Treatment of BRAF-mutant melanomas with MAP kinase (MAPK) pathway inhibitors is paradigmatic of precision cancer therapy expectations but also highlights the problematic of drug resistance that limit patient benefit. MAPK inhibitors, such as BRAF inhibitors (e.g., Vemurafenib and Dabrafenib), MEK inhibitors (e.g., Cobimetinib and Trametinib), or their combination, benefit for a majority of melanoma patients whose tumors carry activating V600E/K mutations in the BRAF oncogene (Davies et al. 2002). However, they commonly fail to cure disease due to the development of acquired resistance. A diversity of oncogenic processes have been associated with acquired resistance such as mutations in components of the MAPK pathway (Nazarian et al. 2010; Wagle et al. 2014; Moriceau et al. 2015; Heidorn 2010), reactivation of parallel signaling networks such as PI3K/AKT (H. Shi et al. 2014; Paluncic et al. 2016; Chan et al. 2017), or the overexpression of different tyrosine kinase receptors (TKRs) (PDGFRb, EGFR, NGFR) (Nazarian et al. 2010; da Silva-Diz et al. 2016; Girotti et al. 2013). Melanoma cells are not only capable of rapidly adapt to therapies by acquiring *de novo* mutations, they also tend to switch their molecular and cellular phenotype in an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)- like manner to bypass drug treatment. The most common phenotypic changes that melanoma cells undergo to escape inhibition are linked to the ratio of expression between the master transcription factor MITF and the TKR AXL (Arozarena and Wellbrock 2017; Hoek and Goding 2010; Müller et al. 2014; Konieczkowski et al. 2014). The balanced expression of those two factors will participate, among others, to differentiation/dedifferentiation, changes in proliferation rates, and metabolic rewiring. Drug resistance can also arise through the selection of pre-existing subclones harboring cancer stem cell like properties, able to withstand drug treatment (Shaffer et al. 2017). Indeed, a drug-induced epigenetic reprogramming, initiated by loss of SOX10-mediated differentiation (Shaffer et al. 2017), activates several transcription factors including TEAD (Verfaillie et al. 2015) allowing melanoma cells to survive. Recently, different studies have identified a de-differentiation process associated with a phenotype switching. Indeed, during resistance acquiring cells undergo a switch from a proliferative/pigmented phenotype to an invasive/dedifferentiated phenotype, involved in BRAFi resistance and further highlighting the plasticity of melanoma cells during treatment (Tsoi et al. 2018; Rambow et al. 2018; Rose et al. 2016).

We recently demonstrated that in melanoma, BRAFi constitute a new class of Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) transcription factor ligands that promote sensitivity by triggering a transcriptomic program associated with cell differentiation (pigmentation). Conversely, AhR

is constitutively activated in a subset of melanoma cells, promoting the dedifferentiation of melanoma cells, associated with the expression of BRAFi-resistance genes. Under BRAFi pressure, this small subpopulation of AhR-activated and BRAFi-persister cells will be enriched, and will further lead to the relapse (Corre et al. 2018). We have also shown that the natural AhR antagonist Resveratrol could be used in combination with BRAFi to prevent the emergency of persister-resistant cells and so to delay tumor growth *in vivo*.

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is the only ligand-dependent transcription factor of the basic-helix-loop-helix (bHLH) Per-Arnt-Sim (PAS) family (Bersten et al. 2013). It's involved in many physiological processes (Veldhoen and Duarte 2010; Denison et al. 2002), diseases and cancers (Safe, Lee, and Jin 2013). Several exogenous or endogenous ligands have been described to be AhR-agonists or antagonists (Murray, Patterson, and Perdew 2014). Among these, we here focus on the role of natural flavonoids to control AhR transcriptional activity and on their function in cancer, more especially for melanoma treatment.

The role of natural flavonoids in cancer prevention has long been described in several types of cancers (Abotaleb et al. 2018). Dietary flavonoids are the most common polyphenols found in fruits, vegetables, flowers, chocolate, tea, wine, and other plant sources (Chahar et al. 2011; Panche, Diwan, and Chandra 2016). With more than 9000 members in this family, flavonoids can be divided into several subfamilies, including flavones, flavanols, isoflavones, flavonols, flavanones, and flavanonols that share the basic chemical structure consisting of two benzene rings connected by a 3-carbon bridge, forming a heterocycle (C6-C3-C6) (Hodek, Trefil, and Stiborová 2002). Several studies suggests that the dietary intake of flavonoids reduces the risk of developing certain types of cancers (Neuhouser 2004; Amawi, Ashby Jr, and Tiwari 2017). Several types of flavonoids have been shown to have antiproliferative efficacy and preventive effects against various cancers (Amawi, Ashby Jr, and Tiwari 2017) . Their chemopreventive effect is mediated by the induction of apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of metabolizing enzymes (notably cytochromes P450), inhibition of reactive oxygen species formation and inhibition of mediated angiogenesis (Amawi, Ashby Jr, and Tiwari 2017).

During this project, we focused on the role of a set of flavonoids in the control of the transcriptional activity of AhR (Murray, Patterson, and Perdew 2014; Zhang, Qin, and Safe 2003; Kolluri, Jin, and Safe 2017) and their importance in pigmentation, in the context of cutaneous melanoma (Table 1). Indeed, all these different flavonoids have been described for positively or negatively regulating melanin synthesis and pigmentation. However, they have also been largely implicated for their beneficial inhibitory effect in the development, growth

and spreading of melanoma (Table 1). Nevertheless, the majority of these studies focus on the antioxidant role of flavonoids, their ability to induce apoptosis or to prevent invasion.

Here, we were able to challenge these different flavonoids for their role as AhR antagonists in order to select the most potent one, to prevent AhR canonical activation occurring during BRAFi resistance acquiring. We found that fine tuning of AhR activity by Apigenin and Chrysin (at low doses) allows during BRAFi-treatment a significant increase in melanoma cells sensitivity and prevent the emergency of persister-resistant cells. Treatment by Apigenin and Chrysin also prevent the expansion, migration and invasion of resistant melanoma cells, responsible for metastasis.

## Results

### Flavonoids are AhR ligands controlling its transcriptional activity

Flavonoids are small and planar molecules that have been previously shown to activate or antagonize AhR transcriptional activity (Zhang, Qin, and Safe 2003). We previously described that binding of PAS-B domain of AhR by its canonical ligands such as TCDD, FICZ, BaP... at a position we named arbitrarily  $\alpha$ -pocket could be competed by different antagonists that bind to the same  $\alpha$ -pocket (CH-223191, Resveratrol) (Corre et al. 2018). This strategy allowed us to propose inhibitors to prevent the activation of AhR canonical activity associated with dedifferentiation and resistance phenotype during BRAFi treatment of melanoma. The first step of the project was to challenge several flavonoids by their putative AhR interaction using modelling experiment. Docking experiments were carried out between AhR PAS-B model and different AhR ligands or flavonoids chemical structures recovered in ZINC database (zinc.docking.org). Like AhR canonical ligands (TCDD, FICZ, BaP) prediction of amino acids interaction confirmed that most of the flavonoids potentially bind inside  $\alpha$ -pocket (Fig. 1A-B). These flavonoids interacting with  $\alpha$ -pocket, are thus particularly interesting for their ability to prevent binding of AhR canonical ligands. Interestingly, compared to dioxin (TCDD), all these different flavonoids fail to activate AhR canonical pathway accordingly to *CYP1A1* mRNA expression (Fig. 1C). We then performed different experiments with flavonoids that potentially bind  $\alpha$ -pocket of AhR to challenge their potential as AhR antagonists. XRE luciferase assays have been first performed after induction by TCDD (10nM) alone or in combination with the different flavonoids 10 $\mu$ M (Fig. 2A) on 501Mel human melanoma cell line. All these flavonoids except Naringenin inhibit XRE luciferase activity induced by TCDD (Fig. 2A). Competition assays performed with increasing doses of flavonoids confirmed flavonoids competed as

efficiently as the prototypical AhR antagonist (CH-223191) on AhR activity (1 to 10 $\mu$ M for 50% inhibition of TCDD induction) (Fig. 2B). Measurement of EROD enzymatic activity in MCF7 cells (Fig. 2C) and *CYP1A1* mRNA expression level (Fig. 2D) or protein level (Fig. 2E) in 501Mel cells after induction by TCDD alone (10nM) or in combination with flavonoids (10 $\mu$ M), identified Apigenin, Chrysin and Kaempferol as the most powerful inhibitors to antagonize AhR canonical activity. Considering, these results we then proposed to evaluate the role of selected flavonoids on melanoma phenotype during BRAFi treatment.

### **Flavonoids increase BRAFi sensitivity and diminish the pool of persister cells**

Critically, flavonoids+TCDD co-treatment failed to induce AhR canonical activity, illustrating the effectiveness of flavonoids to counteract the effect of  $\alpha$ -ligands on AhR transcriptional activity reprogramming associated with resistance acquiring during melanoma BRAFi treatment (Corre et al. 2018). In order to evaluate the impact of flavonoids on melanoma cells proliferation, we first analyzed flavonoids toxicity in different cell lines (501MelR and SKMel28R = BRAFi resistant melanoma and in HaCat keratinocytes) by treating cells for 48h with increasing doses of flavonoids (0-100 $\mu$ M) (Fig. 3A). Treatment of cells with flavonoids induces a significant decrease of cell density at a dose greater than 20 $\mu$ M (Fig. 3A), according to IC50 (Fig. S1A). Indeed, percentage of cell death is significantly increased after the addition of flavonoids at high doses (>20 $\mu$ M), except for Naringenin, after an induction of apoptosis or necrosis by flavonoids (Fig. S1B).

To characterize the impact of flavonoids, we also evaluated cell density in SKMel28R cells after 48h treatment with Vemurafenib (IC50 dose = 5 $\mu$ M) alone or in combination with increasing doses of flavonoids (0 to 100 $\mu$ M) (Fig. 3B). Vem treatment leads to around 50% of cell death. Percentage of cell death which is significantly increased after the addition high doses of flavonoids (>20 $\mu$ M), except for Naringenin (Fig. 3B). It should be noted that even at low doses (<20 $\mu$ M) Apigenin (Api), Chrysin (Chr) and Kaempferol (Kae) potentiate the effect to sensitize melanoma cells to BRAFi (Fig. 3B) independently to their ability to induce apoptosis of cells. We then confirmed this finding by testing the combined effect of flavonoids and Vemurafenib on the sensitivity of melanoma cells using low doses of flavonoids (10 $\mu$ M). SKMel28R (Fig. 3C) or 501MelR (Fig. S1C) cells were pretreated with flavonoids (10 $\mu$ M) for 48h and washed before treatment with 5 $\mu$ M of Vemurafenib for 4 days (every 2 days) in order to compare cell density after Vem treatment alone or in combination with flavonoids (Fig. 3C). The efficiency of the different flavonoids to increase BRAFi sensitivity is weak in SKMel28R

cell lines expect for Apigenin. The same results were obtained in 501MelR (Fig. S1C). When prolonging pre-treatment flavonoids (10 $\mu$ M) with Vemurafenib (5 $\mu$ M) during 10 days, we significantly increase the beneficial effect of flavonoids in combination with Vem with a decrease of residual cells (notably for Api, Chr, Fis or Kae, Fig. S1D). BRAFi-sensitivity of melanoma cells could also be increased after a long-term treatment with flavonoids alone (at low doses = 5 $\mu$ M) for 14 days (Fig. 3D) leading to significantly reduced the expression of resistance genes (*AXL*, *NRP1*, *LPAR1*) (Fig. 3E). Finally, we analyzed the ability of cells that become insensitive to BRAFi to re-proliferate while maintaining pressure with Vemurafenib. The cells were treated with Vemurafenib alone (5 $\mu$ M) or in combination with flavonoids (5 $\mu$ M) every 2 days. After 2 weeks of treatment, we analyzed level of proliferation of resistant cells (Fig. S1E). While in the presence of BRAFi alone or after combination with Fis, RSV, Nar, cells are able to proliferate under BRAFi pressure, treatment of SKMel28R cells with Api, Chr, Kae or CH prevents the proliferation of resistant cells (Fig. S1E). Thanks to these results, we were able to identify especially Api, Chr, and Kae as powerful inhibitors of melanoma cell proliferation, even at low doses, that potentialize BRAFi-effect to kill melanoma cells by increasing cell death, but also by preventing the induction of the expression of resistance genes. Using BRAFi combined with these flavonoids, that counteract AhR canonical activity, we avoid the emergence of BRAFi resistant cells responsible for melanoma relapse. Interestingly, despite the high similarity of structures between flavonoids (Fig. 1B), their function on AhR and especially on melanoma cell survival under BRAFi treatment is significantly different. That's why when we combined different flavonoids (#3 = Api + Chr + Fis, #2 = Api + Chr) with a comparable chemical structure, we didn't potentialize flavonoids effect on BRAFi sensitivity.

### **Flavonoids delay melanoma dedifferentiation process associated with resistant and invasive phenotype of melanoma**

Under the control of microenvironment or acquired or intrinsic cell factors and because of melanoma plasticity (Tsoi et al. 2018; Rambow et al. 2018), melanoma cells by switching from a proliferating to invasive state can acquire resistance to targeted therapies. These changes are associated with an aggressive phenotype similar to the epithelial-to-mesenchymal-like transition favorizing metastasis spreading (Cohen-Solal, Kaufman, and Lasfar 2017). We recently involved the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) transcription factor in the acquisition of resistance during melanoma treatment by BRAFi. While AhR induces after its direct activation by BRAFi an expression program associated with the sensitive/differentiate state of

melanoma cells (associated with pigmentation), canonical activation of AhR switch to an expression program associated with resistant/dedifferentiate cell state (Corre et al. 2018). Because flavonoids have been largely involved in pigmentation (Table 1), we first analyzed their impact on pigmentation. When we treated 501Mel cells with Vemurafenib (1 $\mu$ M) we induced a strong pigmentation (Fig. 4A), characteristic of a differentiated phenotype and associated with BRAFi sensitivity. Co-treatment with flavonoids didn't prevent this induction of pigmentation (Fig. 4A) nor the induction of the expression of pigmentation related genes (Fig. 4B). Then, we analyzed their impact on melanoma phenotype. We first performed clonogenic assay on SKMel28R as an *in vitro* cell survival assay to evaluate the ability of a single cell to grow into a colony after or not treatment by the different flavonoids. Melanoma cells were seeded in 6-well plates at 200 cells per well. After complete cell adherence, the cells were exposed to flavonoids treatment (10 $\mu$ M) and cultivated for 12 days. Clonogenic assays showed antiproliferative effects of Apigenin and Chrysin in SKMel28R compared to the prototypical AhR antagonist (CH-223191) and to all others flavonoids (Fig. 5A). We then performed wound healing assays to evaluate the role of flavonoids on cell migration. Short-term treatment of SKMel28R melanoma cells with flavonoids (10 $\mu$ M) especially Api, Chr, Fis and Nar significantly delayed cell migration (Fig. 5B and Fig. S2A). We confirmed also this inhibitory effect after a long-term treatment of SKMel28R cells with Api, Chr or Fis (5 $\mu$ M) (Fig. 5C and Fig. S2B). Interestingly, combination of these three flavonoids (#3, 5 to 10 $\mu$ M final) has the same effect on cell migration (Fig. 5B-C and Fig. S2A-B). Finally, we analyzed the effect of the different flavonoids on the invasive potential of SKMel28R melanoma cells using spheroids assays. Indeed, these BRAFi-resistant cells are highly invasive and are characteristic of metastatic phenotype. The short-term (Fig. 5D and Fig. S2C) or long-term treatment (Fig. 5E and Fig. S2D) of cells with AhR antagonist (CH-223191) but also with Api, Chr significantly reduced invasion ability of SKMel 28 cells. Again, the combinations of Api + Chr (#2) or Api + Chr + Fis (#3) inhibit in the same way SKMel28 invasion. In conclusion, the flavonoids Apigenin and Chrysin appear to be the most powerful to counteract SKMel28R cell proliferation, migration and invasion *in vitro* (Table 2).

## Discussion

Although therapeutic advances in melanoma have greatly helped in recent years to improve patient survival, there is still a long way to increase survival for late-stage patients. Combined BRAF and MEK inhibition have increased median PFS to 9–11 months (Ugurel et

al. 2017), but could have much better clinical outcomes if it was not for the inevitable emergence of drug resistance. Numerous recent studies have established that melanoma is a heterogeneous tumor with very high cellular plasticity, which contributes to the acquisition of the resistance phenotype (Kemper et al. 2014; Rambow et al. 2018; Ahmed and Haass 2018; Tsoi et al. 2018). Indeed, during the acquisition of resistance to BRAFi and/or MEKi, the melanoma cells will operate a phenotype-switching from a proliferative and differentiated (pigmented) state to a dedifferentiated, poorly proliferative, invasive, EMT-like state (Tsoi et al. 2018; Rambow et al. 2018; Kong et al. 2017). Different factors participate in this phenotype switching via the control of a specific expression program that is largely influenced by the tumor environment. One of the main actors are the melanocyte specific transcription factor : Microphthalmia MITF which plays the role of rheostat, according to its activity, to control proliferation/invasion and differentiated/dedifferentiated states of melanoma cells and AXL receptor tyrosine kinase (Hoek and Goding 2010; Arozarena and Wellbrock 2017; Müller et al. 2014; Konieczkowski et al. 2014). We also recently involved the canonical activation of AhR transcription factor in the acquisition of resistance during BRAFi-treatment of melanoma (Corre et al. 2018). In this study, we showed that we were able to counteract AhR canonical activity with specific antagonist such as the natural flavonoid Resveratrol to decrease the pool of BRAFi resistant/persister cells and so to delay tumor relapse.

One of the goals of our study was to propose new combination treatments with BRAF inhibitors that would act synergistically and could prevent or overcome resistance. In order to find new combinations of potential inhibitors to treat BRAFi-resistant melanoma, delay or avoid development of resistance, we mainly focused in this paper on the role of natural flavonoids. Flavonoids are polyphenols that are found in numerous edible plant species, such as fruits, vegetables, grains, roots, flowers, tea and wine. Data obtained from preclinical and clinical studies suggest that specific flavonoids are chemo-preventive and cytotoxic against various cancers via a multitude of mechanisms notably in melanoma (Abotaleb et al. 2018). These flavonoids have been largely studied in cancer for their role to induce apoptosis, to inhibit cell proliferation and invasion or for their antioxidant power (Ginwala et al. 2019). In our study, we were particularly interested in the role of flavonoids for their function as specific AhR antagonists (Jin et al. 2018; Zhang, Qin, and Safe 2003; Mukai et al. 2010). Thus, we were able to show that although the different flavonoids have very similar chemical structures, their role in controlling the transcriptional activity of AhR was very different. Flavonoids do not bind in the same way in the PAS-B binding domain of AhR and do not have the same antagonistic power (Jin et al. 2018). Among the different tested flavonoids, Apigenin and Chrysin are the

most powerful antagonists to counteract AhR activity during BRAFi-resistance acquiring. Indeed, these two flavonoids significantly increase BRAFi sensitivity of melanoma cells, even at low doses. The use of these flavonoids could be also particularly interested to prevent the migration and the invasion of BRAFi-resistant melanoma cells. Recently, Apigenin has been widely investigated for its anti-cancer activities and low toxicity (Yan et al. 2017). Apigenin was reported to suppress various human cancers in vitro and in vivo by multiple biological effects, such as triggering cell apoptosis (Zhao, G., Han, X., Cheng, W., Ni, J., Zhang, Y., Lin, J. 2017) and autophagy, inducing cell cycle arrest (Zhao, G., Han, X., Cheng, W., Ni, J., Zhang, Y., Lin, J. 2017; M. Shi et al. 2015), suppressing cell migration and invasion (Zhao, G., Han, X., Cheng, W., Ni, J., Zhang, Y., Lin, J. 2017), stimulating an immune response (L. Xu et al. 2018), and suppresses cancer stem cells (CSCs) (Li et al. 2018; Ketkaew et al. 2017). Indeed, Apigenin has been demonstrated to show broad anticancer effects in various types of cancers, including colorectal cancer, breast cancer, liver cancer, lung cancer, melanoma, prostate cancer and osteosarcoma (M. Xu et al. 2016; Huang et al. 2016; Zhao, G., Han, X., Cheng, W., Ni, J., Zhang, Y., Lin, J. 2017; Gupta, Afaq, and Mukhtar 2002; Angulo et al. 2017). Apigenin has a large spectrum of activity by inhibiting several intracellular pathway involved in cancer formation and progression such as PI3K/AKT/mTOR (Zhao, G., Han, X., Cheng, W., Ni, J., Zhang, Y., Lin, J. 2017), MAPK/ERK (Hasnat et al. 2015; Lim et al. 2016), NF $\kappa$ B (Shukla et al. 2015), JAK/STAT (Wakim 2019), Wnt/ $\beta$ -catenin (Lin et al. 2017) even its mechanism of action hasn't yet been clearly established. For the first time, we specifically associated its anti-cancer properties to its role as an AhR antagonist. We thus propose the use of Apigenin during melanoma treatment with BRAFi to increase sensitivity and delay resistance and relapse. The main purposes of the combinatorial strategy for cancer therapy are to potentiate the antitumor effects of chemotherapeutic agents and to overcome the limitation of acquired drug resistance. Apigenin is an effective anti-cancer agent but with only moderate anti-cancer efficacy when used alone at human physiological dosages. Therefore, co-treatment with other chemodrugs is a reasonable way to enhance its anti-cancer activities and has been widely tested and should achieved great success in clinical applications (Yan et al. 2017). Several phase II clinical trials using flavonoids for cancer treatment have been already tested such as in colorectal (Hoensch et al. 2008), breast (Samavat et al. 2017) and prostate (Lesinski et al. 2015) cancers.

However, the clinical use of flavonoids is limited due to challenges associated with their effective use, including (1) the isolation and purification of flavonoids from their natural resources; (2) demonstration of the effects of flavonoids in reducing the risk of certain cancer, in tandem with the cost and time needed for epidemiological studies, and (3) numerous



pharmacokinetic challenges (e.g., bioavailability, drug–drug interactions, and metabolic instability) (Amawi, Ashby Jr, and Tiwari 2017; Hu 2010). Currently, numerous approaches are being developed to surmount some of these challenges, thereby increasing the bioavailability using nano-engineered flavonoids (polymer, lipid or metal nanoparticles, nanocarriers) to be used as chemo-preventive drugs in the clinic (Bunkar et al. 2019). These strategies could be promising in the future to benefit for melanoma patients treated by targeting therapies (BRAFi/MEKi).

## **Methods**

### **Reagents**

The AhR ligands were obtained from: 2,3,7,8-TCDD (TCDD) (Sigma Aldrich, 48599), FICZ (Sigma Aldrich, SML1489), Vemurafenib (Vem, PLX4032) (Selleckchem, RG7204), Dabrafenib (Dab) (Santa Cruz Biotechnology, SC364477), CH-223191 (Selleckchem, S7711), Resveratrol (RSV) (Selleckchem, S1396), and all the different natural flavonoids (Selleckchem, Table S1).

### **Cell Lines and Culture Conditions**

The mammary MCF7 epithelial cells and the human HaCat keratinocytes were cultured in humidified air (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4500 mg/l D-glucose, 110 mg/l sodium pyruvate, supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (PAA cell culture company) and 1% Penicillin-Streptomycin antibiotics (Gibco, Invitrogen). The melanoma cell lines (501Mel, SKmel28) were grown in humidified air (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in RPMI-1640 medium (Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% Fetal Bovine. SKMel28 (S+R) cell were obtained from J.C Marine's lab at VIB Center for Cancer Biology, VIB, Leuven, Belgium. 501Mel cells (S) were obtained from ATCC and 501Mel BRAFi resistant cells (R) have been obtained after 3 months treatment with Vem (1 μM every 2 days). All cell lines have been routinely tested for mycoplasma contamination (Mycoplasma contamination detection kit ; rep-pt1; InvivoGen - San Diego - CA).

### **Molecular Modelling**

Docking experiments were performed with AutoDock4.2 (free open tool, <http://autodock.scripps.edu>). (Morris et al. 2009) A multiple alignment between the sequences of PAS-B mAhR (residues 278–384) and PAS-B HIF-2α was generated according to the sequence alignment suggested by Pandini et al (Pandini et al. 2007). The homology model of

PAS-B mAhR was constructed using the crystal structures of the heterodimer complex of PAS-B HIF-2 $\alpha$  (pdb code: 3f1p, 3f1o, 3f1n) and Prime v.2.1. Docking experiments were carried out between AhR PAS-B model and different AhR ligands, BRAFi and flavonoids chemical structures recovered in ZINC database (zinc.docking.org).

### **Cell Density Evaluation**

Cell density was assessed using a methylene blue colorimetric assay (Gilot et al. 2011). Briefly, cells were fixed for at least 30 min in 95% ethanol. Following ethanol removal, the fixed cells were dried and stained for 30 min with 1% methylene blue dye in borate buffer. After four washes with tap water, 100  $\mu$ l of 0.1 N HCl were added to each well. Plates were next analyzed with a spectrophotometer at 620 nm.

### **Wound healing migration assay**

Briefly, SKmel28 cells were grown until confluency in 2 well silicone insert (Ibidi®, Germany) placed in 12-wells tissue culture dishes. Cell culture insert has been removed after 1 day. Afterwards, the plates were washed with PBS and incubated at 37 °C in fresh RPMI-1640 medium (Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Eurobio) and 1% Penicillin-Streptomycin antibiotics (Gibco, Invitrogen) in the presence of vehicle (DMSO) or indicated concentrations of flavonoids. The wound was photographed with an inverted microscope at X5 magnification Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss). Wound closure was determined by measuring the distance between the edges of the wound at time 0 and 15h, using ImageJ (Fiji). Quantification of the distance migrated by the cells was done as follow:  $D = (\text{Size of the wound at } t = 0 \text{ h} - \text{size of the wound at } t = 15\text{h})$ .

### **Spheroid formation assay**

Spheroid formation assay was performed as described. Briefly, SkMel28 cells (7000cells/ml) were plated in 24 wells plate coated with 1.5% agarose in completed RPMI medium and concentrate in the center by circular agitation. After 2 days, spheroids were recovered for inclusion in extracellular matrix of collagen (100 $\mu$ l) (final concentration=2mg/ml in buffer (acetic acid 0.01N; neutralization buffer: 33mM Hepes pH7.4, 0.37% sodium bicarbonate, 0.03N NaOH; MEM 1X) in 24 wells plate coated with 1.5% agarose. Spheroids were maintained in completed medium in the presence or not of flavonoids and pictures of spheroids were taken during many days (0 to 4 days) with an inverted microscope at X5 magnification Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss).

### **Colony-formation assay**

Melanoma cells were seeded in 6-well plates at 200 cells per well. After complete cell adherence, the cells were exposed to flavonoids treatment (10 $\mu$ M) and cultivated for 12 days, medium with flavonoids was changed every 2 days. At the end of the experiment, colonies were stained with 0.5% crystal violet (50% H<sub>2</sub>O, 50% methanol), and were manually counted. Each measurement was done in triplicate, and three independent experiments were performed.

**Apoptosis and Necrosis Assays.** At the end of the treatment, cells are stained by adding 25  $\mu$ l of dyes mixture containing Hoechst33342 (5  $\mu$ g/ml) Propidium iodure (4  $\mu$ g/ml) and YO-PRO<sup>®</sup>-1 (0.8 $\mu$ M) directly into 100  $\mu$ L of culture media and incubated at 37°C for 30 minutes. Cells are imaged, analyzed and counted using an ArrayScan<sup>™</sup> VTI High-Content Systems (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France). The apoptotic (green), the necrotic (red) cells are expressed in function of total Hoechst positive cells (blue).

### **Ethoxyresorufin O-Deethylase Activity Assay**

Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity, corresponding to the O-deethylation of ethoxyresorufin, and mainly supported by the CYP1A1 enzyme in living MCF7 cells, was measured as described previously (Monteiro et al. 2008).

### **Luciferase Activity**

501Mel cells were cultured in 48-well plates and transfected with respectively the pGL3-XRE3-FL (Monteiro et al. 2008) and the pGL4-Luc constructs for the different resistant genes (*AXL*...) carrying the firefly luciferase. Transient transfection of cells was performed using Lipofectamine 2000 transfection reagent<sup>®</sup> according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific). 24h after transfection, cells were exposed to TCDD with or without flavonoids for a 16h period. Luciferase assays were then performed with a Promega kit according to the manufacturer's instructions. Data were expressed in arbitrary units, relative to the value of luciferase activity levels found in DMSO-exposed cells, arbitrarily set at 1 arbitrary unit (a.u.). Firefly luciferase activity was normalized to protein content using Bicinchoninic Acid Kit from Sigma-Aldrich<sup>®</sup> and measured with using a luminometer (SAFAS Xenius XL, SAFAS Monaco).

### **RNA extraction & RT-qPCR expression**

Experiments have been done as previously described (Bouafia et al. 2014). Primers used for RT-qPCR experiments are available in Supplementary Table S3.

### **Western Blot**

Harvested cells were solubilized as previously described (Gilot et al. 2011). Protein samples were denatured at 95°C, resolved by SDS-PAGE and transferred onto Hybond™-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Bucks, UK). Membranes were probed with appropriated antibodies and signals were detected using the Fujifilm LAS-3000 Imager (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan). Primary antibodies were: AhR (H211), Hsc70 (B6) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Horseradish-Peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from (Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)) (1:1000).

### **Data mining**

Cell density curves for the available melanoma cell lines were established using GraphPad PRISM 7.0 ® in order to establish IC50 dependently to the different treatments.

### **Stats**

Data are presented as mean ± s.d. unless otherwise specified, and differences were considered significant at a *p* value of less than 0.05. Comparisons between groups normalized to a control were carried out by a two-tailed *t*-test with the Holm-Sidak's multiple comparisons test when more than two groups are compared to the same control condition. OS was estimated using the Kaplan-Meier method. Univariate analysis using the Cox regression model was done to estimate hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI). All statistical analyses were performed using Prism 7 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

### **Data availability**

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### **Supplementary Tables**

**Table S1:** References for the different flavonoids

**Table S2:** Binding Energy of different ligands for PAS-B domain of AhR and AA close contact evaluated by docking experiments.

**Table S3:** Primer sequences for RT-qPCR.

**Author information**

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.C. or M.-D. G.

## References

- Abotaleb, Mariam, Samson Mathews Samuel, Elizabeth Varghese, Sharon Varghese, Peter Kubatka, Alena Liskova, and Dietrich Büsselberg. 2018. "Flavonoids in Cancer and Apoptosis." *Cancers* 11 (1): 28. <https://doi.org/10.3390/cancers11010028>.
- Ahmed, Farzana, and Nikolas K Haass. 2018. "Microenvironment-Driven Dynamic Heterogeneity and Phenotypic Plasticity as a Mechanism of Melanoma Therapy Resistance." *Frontiers in Oncology* 8 (May): 173. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00173>.
- Amawi, Haneen, Charles R Ashby Jr, and Amit K Tiwari. 2017. "Cancer Chemoprevention through Dietary Flavonoids: What's Limiting?" *Chinese Journal of Cancer* 36 (1): 50. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0217-4>.
- Angulo, Pablo, Gaurav Kaushik, Dharmalingam Subramaniam, Prasad Dandawate, Kathleen Neville, Katherine Chastain, and Shrikant Anant. 2017. "Natural Compounds Targeting Major Cell Signaling Pathways: A Novel Paradigm for Osteosarcoma Therapy." *Journal of Hematology & Oncology* 10 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0373-z>.
- Arozarena, Imanol, and Claudia Wellbrock. 2017. "Targeting Invasive Properties of Melanoma Cells." *The FEBS Journal* 284 (14): 2148–62. <https://doi.org/10.1111/febs.14040>.
- Bersten, David C, Adrienne E Sullivan, Daniel J Peet, and Murray L Whitelaw. 2013. "BHLH–PAS Proteins in Cancer." *Nature Reviews Cancer* 13 (November): 827. <https://doi.org/10.1038/nrc3621>.
- Bouafia, Amine, Sébastien Corre, David Gilot, Nicolas Mouchet, Sharon Prince, and Marie-Dominique Dominique Galibert. 2014. "P53 Requires the Stress Sensor USF1 to Direct Appropriate Cell Fate Decision." Edited by Marshall S Horwitz. *PLoS Genetics* 10 (5): e1004309. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004309>.
- Bunkar, Neha, Ruchita Shandilya, Arpit Bhargava, Ravindra M Samarth, Rajnarayan Tiwari, Dinesh Kumar Mishra, Rupesh Kumar Srivastava, Radhey Shyam Sharma, and Nirmal Kumar Lohiya. 2019. "Nano-Engineered Flavonoids for Cancer Protection," 1097–1157.
- Chahar, Maheep K, Neelu Sharma, Mahabeer P Dobhal, and Yogesh C Joshi. 2011. "Flavonoids: A Versatile Source of Anticancer Drugs." *Pharmacognosy Reviews* 5 (9): 1–12. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.79093>.
- Chan, Xian Yang, Alamdeep Singh, Narin Osman, and Terrence J Piva. 2017. "Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7): 1527. <https://doi.org/10.3390/ijms18071527>.

- Cohen-Solal, Karine A, Howard L Kaufman, and Ahmed Lasfar. 2017. "Transcription Factors as Critical Players in Melanoma Invasiveness, Drug Resistance and Opportunities for Therapeutic Drug Development." *Pigment Cell & Melanoma Research*. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12666>.
- Corre, Sébastien, Nina Tardif, Nicolas Mouchet, Héloïse M Leclair, Lise Boussemart, Arthur Gautron, Laura Bachelot, et al. 2018. "Sustained Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Transcription Factor Promotes the Resistance to BRAF Inhibitors in Melanoma." *Nature Communications* 9 (4775).
- 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 (June): 949. <http://dx.doi.org/10.1038/nature00766>.
- Denison, M S, a Pandini, S R Nagy, E P Baldwin, and L Bonati. 2002. "Ligand Binding and Activation of the Ah Receptor." *Chem Biol.Interact.* 141 (0009-2797 (Print)): 3–24. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00063-7).
- Gilot, David, Nolwenn Le Meur, Fanny Giudicelli, Marc Le Vée, Dominique Lagadic-Gossmann, Nathalie Théret, and Olivier Fardel. 2011. "Rnai-Based Screening Identifies Kinases Interfering with Dioxin-Mediated up-Regulation of CYP1A1 Activity." *PLoS ONE* 6 (3).
- Ginwala, Rashida, Raina Bhavsar, DeGaulle I Chigbu, Pooja Jain, and Zafar K Khan. 2019. "Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin." *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 8 (2): 35. <https://doi.org/10.3390/antiox8020035>.
- Girotti, Maria R, Malin Pedersen, Berta Sanchez-Laorden, Amaya Viros, Samra Turajlic, Dan Niculescu-Duvaz, Alfonso Zambon, et al. 2013. "Inhibiting EGF Receptor or SRC Family Kinase Signaling Overcomes BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma." *Cancer Discovery* 3 (2): 158–67. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0386>.
- Gupta, Sanjay, Farrukh Afaq, and Hasan Mukhtar. 2002. "Involvement of Nuclear Factor-Kappa B, Bax and Bcl-2 in Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Apigenin in Human Prostate Carcinoma Cells." *Oncogene* 21 (May): 3727. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205474>.
- Hasnat, Abul, Mehnaz Pervin, Ji Hong Lim, and Beong Ou Lim. 2015. "Apigenin Attenuates Melanoma Cell Migration by Inducing Anoikis through Integrin and Focal Adhesion Kinase Inhibition," 21157–66. <https://doi.org/10.3390/molecules201219752>.
- Heidorn, S J. 2010. "Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor

- Progression through CRAF.” *Cell* 140: 209–21.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.040>.
- Hodek, Petr, Pavel Trefil, and Marie Stiborová. 2002. “Flavonoids-Potent and Versatile Biologically Active Compounds Interacting with Cytochromes P450.” *Chemico-Biological Interactions* 139 (1): 1–21. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(01\)00285-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-2797(01)00285-X).
- Hoek, Keith S, and Colin R Goding. 2010. “Cancer Stem Cells versus Phenotype-Switching in Melanoma.” *Pigment Cell & Melanoma Research* 23 (6): 746–59.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x>.
- Hoensch, Harald, Bertram Groh, Lutz Edler, and Wilhelm Kirch. 2008. “Prospective Cohort Comparison of Flavonoid Treatment in Patients with Resected Colorectal Cancer to Prevent Recurrence.” *World Journal of Gastroenterology* 14 (14): 2187–93.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.14.2187>.
- Hu, S Gao and M. 2010. “Bioavailability Challenges Associated with Development of Anti-Cancer Phenolics.” *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/138955710791384081>.
- Huang, Cheng, Yu-Xuan Wei, Ma-Ching Shen, Yu-Hsuan Tu, Chia-Chi Wang, and Hsiu-Chen Huang. 2016. “Chrysin, Abundant in Morinda Citrifolia Fruit Water–EtOAc Extracts, Combined with Apigenin Synergistically Induced Apoptosis and Inhibited Migration in Human Breast and Liver Cancer Cells.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (21): 4235–45. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00766>.
- Jin, Un-Ho, Hyejin Park, Xi Li, Laurie A Davidson, Clinton Allred, Bhimanagouda Patil, Guddadarangavva Jayaprakasha, et al. 2018. “Structure-Dependent Modulation of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Activities by Flavonoids.” *Toxicological Sciences* 164 (1): 205–17. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfy075>.
- Kemper, Kristel, Pauline L de Goeje, Daniel S Peeper, and Renée van Amerongen. 2014. “Phenotype Switching: Tumor Cell Plasticity as a Resistance Mechanism and Target for Therapy.” *Cancer Research* 74 (21): 5937 LP – 5941.  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/21/5937.abstract>.
- Ketkaew, Yuwaporn, Thanaphum Osathanon, Prasit Pavasant, and Sireerat Sooampon. 2017. “Apigenin Inhibited Hypoxia Induced Stem Cell Marker Expression in a Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Line.” *Archives of Oral Biology* 74: 69–74.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.11.010>.
- Kolluri, Siva Kumar, Un-Ho Jin, and Stephen Safe. 2017. “Role of the Aryl Hydrocarbon



- Receptor in Carcinogenesis and Potential as an Anti-Cancer Drug Target.” *Archives of Toxicology* 91 (7): 2497–2513. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1981-2>.
- Kong, Xiangjun, Thomas Kuilman, Aida Shahrabi, Julia Boshuizen, Kristel Kemper, Ji Ying Song, Hans W.M. Niessen, et al. 2017. “Cancer Drug Addiction Is Relayed by an ERK2-Dependent Phenotype Switch.” *Nature* 550 (7675): 270–74. <https://doi.org/10.1038/nature24037>.
- Konieczkowski, David J, Cory M Johannessen, Omar Abudayyeh, Jong Wook Kim, Zachary A Cooper, Adriano Piris, Dennie T Frederick, et al. 2014. “A Melanoma Cell State Distinction Influences Sensitivity to MAPK Pathway Inhibitors.” *Cancer Discovery* 4 (7): 816–27. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0424>.
- Lesinski, Gregory B, Patrick K Reville, Thomas A Mace, Gregory S Young, Jennifer Ahn-Jarvis, Jennifer Thomas-Ahner, Yael Vodovotz, et al. 2015. “Consumption of Soy Isoflavone Enriched Bread in Men with Prostate Cancer Is Associated with Reduced Proinflammatory Cytokines and Immunosuppressive Cells.” *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)* 8 (11): 1036–44. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0464>.
- Li, Ying-Wei, Jian Xu, Guo-Yuan Zhu, Zhu-Juan Huang, Yan Lu, Xian-Qian Li, Neng Wang, and Feng-Xue Zhang. 2018. “Apigenin Suppresses the Stem Cell-like Properties of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Inhibiting YAP/TAZ Activity.” *Cell Death Discovery* 4 (November): 105. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0124-8>.
- Lim, Whasun, Sunwoo Park, Fuller W Bazer, and Gwonhwa Song. 2016. “Apigenin Reduces Survival of Choriocarcinoma Cells by Inducing Apoptosis via the PI3K/AKT and ERK1/2 MAPK Pathways.” *Journal of Cellular Physiology* 231 (12): 2690–99. <https://doi.org/10.1002/jcp.25372>.
- Lin, Chung-Ming, Hsin-Han Chen, Chun-An Lin, Hui-Chung Wu, Jim Jinn-Chyuan Sheu, and Hui-Jye Chen. 2017. “Apigenin-Induced Lysosomal Degradation of  $\beta$ -Catenin in Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling.” *Scientific Reports* 7 (1): 372. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00409-z>.
- Monteiro, Patricia, David Gilot, Sophie Langouet, and Olivier Fardel. 2008. “Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by the Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase Inhibitor 7-Oxo-7H-Benzimidazo[2,1-a]Benz[de]Isoquinoline-3-Carboxylic Acid (STO-609).” *Drug Metab Dispos* 36 (12): 2556–63. <https://doi.org/dmd.108.023333> [pii]r10.1124/dmd.108.023333.
- Moriceau, Gatien, Willy Hugo, Aayoung Hong, Hubing Shi, Xiangju Kong, Clarissa C Yu, Richard C Koya, et al. 2015. “Tunable-Combinatorial Mechanisms of Acquired Resistance

- Limit the Efficacy of BRAF/MEK Co-Targeting but Result in Melanoma Drug Addiction.” *Cancer Cell* 27 (2): 240–56. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.018>.
- Morris, Garrett M, Ruth Huey, William Lindstrom, Michel F Sanner, Richard K Belew, David S Goodsell, and Arthur J Olson. 2009. “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility.” *Journal of Computational Chemistry* 30 (16): 2785–91. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- Mukai, Rie, Yasuhito Shirai, Naoaki Saito, Itsuko Fukuda, Shin Nishiumi, Ken Ichi Yoshida, and Hitoshi Ashida. 2010. “Suppression Mechanisms of Flavonoids on Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Signal Transduction.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501 (1): 134–41. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.002>.
- Müller, Judith, Oscar Krijgsman, Jennifer Tsoi, Lidia Robert, Willy Hugo, Chunying Song, Xiangju Kong, et al. 2014. “Low MITF/AXL Ratio Predicts Early Resistance to Multiple Targeted Drugs in Melanoma.” *Nature Communications* 5 (December): 5712. <https://doi.org/10.1038/ncomms6712>.
- Murray, Iain A, Andrew D Patterson, and Gary H Perdew. 2014. “Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands in Cancer: Friend and Foe.” *Nature Reviews. Cancer* 14 (12): 801–14. <https://doi.org/10.1038/nrc3846>.
- Nazarian, Ramin, Hubing Shi, Qi Wang, Xiangju Kong, Richard C Koya, Hane Lee, Zugen Chen, et al. 2010. “Melanomas Acquire Resistance to B-RAF(V600E) Inhibition by RTK or N-RAS Upregulation.” *Nature* 468 (7326): 973–77. <https://doi.org/10.1038/nature09626>.
- Neuhouser, Marian L. 2004. “Review: Dietary Flavonoids and Cancer Risk: Evidence From Human Population Studies.” *Nutrition and Cancer* 50 (1): 1–7. [https://doi.org/10.1207/s15327914nc5001\\_1](https://doi.org/10.1207/s15327914nc5001_1).
- Paluncic, Jasmina, Zaklina Kovacevic, Patric J Jansson, Danuta Kalinowski, Angelika M Merlot, Michael L.-H. Huang, Hiu Chuen Lok, Sumit Sahni, Darius J R Lane, and Des R Richardson. 2016. “Roads to Melanoma: Key Pathways and Emerging Players in Melanoma Progression and Oncogenic Signaling.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863 (4): 770–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.025>.
- Panche, A N, A D Diwan, and S R Chandra. 2016. “Flavonoids: An Overview.” *Journal of Nutritional Science* 5 (December): e47–e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- Pandini, Alessandro, Michael S Denison, Yujuan Song, Anatoly A Soshilov, and Laura Bonati. 2007. “Structural and Functional Characterization of the Aryl Hydrocarbon Receptor

- Ligand Binding Domain by Homology Modeling and Mutational Analysis.” *Biochemistry* 46 (3): 696–708. <https://doi.org/10.1021/bi061460t>.
- Rambow, Florian, Aljosja Rogiers, Oskar Marin-Bejar, Sara Aibar, Julia Femel, Michael Dewaele, Panagiotis Karras, et al. 2018. “Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma.” *Cell*.
- Rose, A. A. N., M. G. Annis, D. T. Frederick, M. Biondini, Z. Dong, L. Kwong, L. Chin, et al. 2016. “MAPK Pathway Inhibitors Sensitize BRAF-Mutant Melanoma to an Antibody-Drug Conjugate Targeting GPNMB.” *Clinical Cancer Research* 22 (24): 6088–98. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1192>.
- Safe, Stephen, Syng-Ook Lee, and Un-Ho Jin. 2013. “Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Carcinogenesis and Potential as a Drug Target.” *Toxicological Sciences* 135 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft128>.
- Samavat, Hamed, Giske Ursin, Tim H Emory, Eunjung Lee, Renwei Wang, Carolyn J Torkelson, Allison M Dostal, et al. 2017. “A Randomized Controlled Trial of Green Tea Extract Supplementation and Mammographic Density in Postmenopausal Women at Increased Risk of Breast Cancer.” *Cancer Prevention Research* 10 (12): 710 LP – 718. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-17-0187>.
- Shaffer, Sydney M, Margaret C Dunagin, Stefan R Torborg, Eduardo A Torre, Benjamin Emert, Clemens Krepler, Marilda Beqiri, et al. 2017. “Rare Cell Variability and Drug-Induced Reprogramming as a Mode of Cancer Drug Resistance.” *Nature* 546 (7658): 431–35. <https://doi.org/10.1038/nature22794>.
- Shi, Hubing, Willy Hugo, Xiangju Kong, Aayoung Hong, Richard C Koya, Gatien Moriceau, Thine Chodon, et al. 2014. “Acquired Resistance and Clonal Evolution in Melanoma during BRAF Inhibitor Therapy.” *Cancer Discovery* 4 (1): 80–93. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0642>.
- Shi, Ming-der, Cheng-kai Shiao, Yi-chieh Lee, and Yuan-wei Shih. 2015. “Apigenin , a Dietary Flavonoid , Inhibits Proliferation of Human Bladder Cancer T-24 Cells via Blocking Cell Cycle Progression and Inducing Apoptosis,” 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0186-0>.
- Shukla, Sanjeev, Eswar Shankar, Pingfu Fu, Gregory T MacLennan, and Sanjay Gupta. 2015. “Suppression of NF-KB and NF-KB-Regulated Gene Expression by Apigenin through IκBα and IKK Pathway in TRAMP Mice.” *PloS One* 10 (9): e0138710–e0138710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138710>.
- Silva-Diz, Victoria da, Pilar Simón-Extremuera, Adrià Bernat-Peguera, Jana de Sostoa, Maria

- Urpí, Rosa M Penín, Diana Pérez Sidelnikova, et al. 2016. “Cancer Stem-like Cells Act via Distinct Signaling Pathways in Promoting Late Stages of Malignant Progression.” *Cancer Research* 76 (5): 1245–59. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/5/1245.abstract>.
- Tsoi, Jennifer, Lidia Robert, Kim Paraiso, Carlos Galvan, Katherine M. Sheu, Johnson Lay, Deborah J.L. L Wong, et al. 2018. “Multi-Stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress.” *Cancer Cell*, 1–15.
- Ugurel, Selma, Joachim Röhm, Paolo A Ascierto, Keith T Flaherty, Jean Jacques Grob, Axel Hauschild, James Larkin, et al. 2017. “Survival of Patients with Advanced Metastatic Melanoma: The Impact of Novel Therapies—Update 2017.” *European Journal of Cancer* 83: 247–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.06.028>.
- Veldhoen, Marc, and João H Duarte. 2010. “The Aryl Hydrocarbon Receptor: Fine-Tuning the Immune-Response.” *Current Opinion in Immunology* 22 (6): 747–52. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.09.001>.
- Verfaillie, Annelien, Hana Imrichova, Zeynep Kalender Atak, Michael Dewaele, Florian Rambow, Gert Hulselmans, Valerie Christiaens, et al. 2015. “Decoding the Regulatory Landscape of Melanoma Reveals TEADS as Regulators of the Invasive Cell State.” *Nature Communications* 6: 6683. <https://doi.org/10.1038/ncomms7683>.
- Wagle, Nikhil, Eliezer M Van Allen, Daniel J Treacy, Dennie T Frederick, Zachary A Cooper, Amaro Taylor-Weiner, Mara Rosenberg, et al. 2014. “MAP Kinase Pathway Alterations in BRAF-Mutant Melanoma Patients with Acquired Resistance to Combined RAF/MEK Inhibition.” *Cancer Discovery* 4 (1): 61–68. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0631>.
- Wakim, Lara Hanna. 2019. “Apigenin as an Effective Anticancer Natural Product : Spotlight on TRAIL , WNT /  $\beta$  - Catenin , JAK - STAT Pathways , and MicroRNAs,” no. August 2018: 1060–67. <https://doi.org/10.1002/jcb.27575>.
- Xu, Lu, Yang Zhang, Kang Tian, Xi Chen, Rongxin Zhang, Xindi Mu, Yueguang Wu, et al. 2018. “Apigenin Suppresses PD-L1 Expression in Melanoma and Host Dendritic Cells to Elicit Synergistic Therapeutic Effects.” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 37 (1): 261. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0929-6>.
- Xu, Min, Shusheng Wang, Y U Song, Jianhua Yao, Kun Huang, and Xiaojuan Zhu. 2016. “Apigenin Suppresses Colorectal Cancer Cell Proliferation, Migration and Invasion via Inhibition of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway.” *Oncology Letters* 11 (5): 3075–80.

<https://doi.org/10.3892/ol.2016.4331>.

Yan, Xiaohui, Miao Qi, Pengfei Li, Yihong Zhan, and Huanjie Shao. 2017. “Apigenin in Cancer Therapy: Anti - Cancer Effects and Mechanisms of Action.” *Cell & Bioscience*, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0179-x>.

Zhang, Shu, Chunhua Qin, and Stephen H. Safe. 2003. “Flavonoids as Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists/Antagonists: Effects of Structure and Cell Context.” *Environmental Health Perspectives* 111 (16): 1877–82. <https://doi.org/10.1289/ehp.6322>.

Zhao, G., Han, X., Cheng, W., Ni, J., Zhang, Y., Lin, J., Song. 2017. “Apigenin Inhibits Proliferation and Invasion, and Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Melanoma Cells.” *Oncology Reports* 37 (4): 2277–85. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5450>.

### **Acknowledgements**

The authors thank the Gene Expression and Oncogenesis team for helpful discussions; the CNRS UMR6290; the Rennes FHU CAMIn team. The authors acknowledge the SFR Biosit core facilities of Rennes University with the cell imaging ImpACcell (Rémy Le Guevel), Microscopy Rennes Imaging Center (MRIC) platforms.

This study received financial support from the following: AVIESAN plan Cancer (ENV201308 and ENV201603), Fondation ARC (N°PGA1\*20160203868), Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) Départements du Grand-Ouest; Association “Vaincre le Cancer”, FHU CAMIn-CHU Rennes, Région Bretagne; University of Rennes 1; CNRS, Inserm. N.T. is a recipient of a doctoral fellowship from ministère de la Recherche. A.P. is a recipient of INCa.

### **Author contributions**

Conceptualization, S.C.; Methodology, H.M.L.; N.T; A.P; and S.C. Investigation, H.M.L., N.T; A.P., L.B., A.S., and S.C. Formal Analysis, H.M.L. and S.C.; Writing - Original Draft, S.C. and M.-D.G.; Funding Acquisition, S.C.; and M.-D.G.; Supervision, S.C.; and M.-D.G.

### **Competing interests**

The authors declare no competing interests.

## FIGURE LEGENDS

### Table 1: Role of selected flavonoids in melanin synthesis and in melanoma

#### Figure 1: Flavonoids potentially bind to AhR to antagonize its canonical activity

**A**, Heat map representing hierarchical clustering of AhR ligands or different flavonoids and their putative interactions with amino-acids of PAS B domain of AhR. Several flavonoids clustered with AhR canonical ligands such as TCDD, FICZ, BaP or kynurenine while BRAFi clustered together in one different position of PAS B domain.

**B**, Chemical structure and proposed binding mode of natural flavonoids: Apigenin, Chrysin, Fisetin, Kaempferol, Resveratrol, Silibinin into the AhR PAS-B ligand binding domain homology model. Free binding energy is reported in Supplementary Table S2. The two predictive ligand binding pockets are indicated by ( $\alpha$ ) or ( $\beta$ ).

**C**, *CYP1A1* expression level in the 501Mel cells exposed to vehicle, flavonoids (1  $\mu$ M), BRAFi: Vemurafenib (Vem) and Dabrafenib (Dab) (1 $\mu$ M) or AhR ligands (TCDD) (10nM) (n=1) for 48 h. Heatmap focused on differentially expressed genes in function of treatment.

#### Figure 2: Flavonoids act as AhR antagonists for its canonical activity

**A-E**, Flavonoids antagonize AhR canonical activity induced by TCDD (dioxin).

**A**, Evaluation of AhR transcriptional activity related to AhR/ARNT binding sites (XRE) using p3XRE-luciferase constructs. 501mel cells were exposed to 10nM TCDD alone or in combination with flavonoids 10 $\mu$ M (pretreated for 2h) during 6h.

**B**, 501Mel cells have been transfected with p3XRE-luciferase construct and induced simultaneously with TCDD (10nM) and increasing doses of flavonoids or CH-223191 to compete with AhR agonist. The histogram represents the required concentration of flavonoids to inhibit 50% of XRE luciferase activity induced by TCDD (n=3).

**C**, MCF-7 cells were either untreated or treated with 10 nM TCDD or 10  $\mu$ M flavonoids for 6 h. Among flavonoids, Apigenin, Chrysin and Kaempferol are the more effective to prevent EROD activity induced by TCDD (n=3).

**D**, Flavonoids prevent *CYP1A1* mRNA expression induction by TCDD but not protein level **E**. 501Mel cells pretreated or not by flavonoids (10 $\mu$ M, 2h) were incubated or not with 10nM TCDD 15 h (n=3).

Data correspond to the mean +/- s.d. of three independent experiments. Statistical analysis was performed using an unpaired t-test (PRISM7.0<sup>®</sup>) \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

### **Figure 3: Flavonoids sensitize melanoma cells during BRAFi treatment**

**A**, 501MelR, SKMel28R (BRAFi-resistant) and HaCat keratinocytes cells were treated for 48h with increasing doses of flavonoids (0 to 100 $\mu$ M). Cell density was evaluated by methylene blue staining followed by quantification at 620 nm (n=2).

**B**, SKMel28R (BRAFi resistant) cells were treated or not by Vemurafenib (IC50 dose = 5 $\mu$ M) for 48 h in combination with increasing doses of flavonoids (0 to 100 $\mu$ M). At the end of the treatment, cells are stained by Hoechst33342 to evaluate the percentage of lived-cells.

**C**, SKMel28R (BRAFi resistant) cells were pretreated with flavonoids (10 $\mu$ M) for 48h and washed before treatment with Vemurafenib (5 $\mu$ M) for 4 days (every 2 days). Then, cell density was evaluated by methylene blue staining followed by quantification at 620 nm (n=3-5) Values, calculated with GraphPad PRISM represent mean  $\pm$  sem of cell density after Vem treatment alone (DMSO) or after pretreatment (48h) by the different flavonoids, unpaired *t*-tests with Sidak-Bonferroni method.

**D**, SKMel28R (BRAFi resistant) cells were pretreated with flavonoids (5 $\mu$ M) for 14 days and washed before treatment with increasing doses of Vemurafenib for 4 days (every 2 days) in order to establish IC50 for BRAFi alone compared to co-treatment with flavonoids. Values, calculated with GraphPad PRISM represent mean  $\pm$  sem IC50 of Vem for control cells (DMSO) or after treatment by the different flavonoids (n=3); unpaired *t*-tests with unpaired *t*-tests with Sidak-Bonferroni method.

**E**, Level of mRNA expression for resistant genes (*AXL*, *NRPI*, *LPAR1*) and *AhR* measured by RT-qPCR (n=3) in SKMel28R (BRAFi resistant) cells treated with flavonoids (5 $\mu$ M) for 14 days (Supplementary Table S3).

### **Figure 4: Flavonoids do not prevent pigmentation induced after BRAFi treatment**

**A**, Picture of 501Mel cell pellets treated with Vem (1 $\mu$ M) for 48h alone or in combination with 10 $\mu$ M of flavonoids.

**B**, Flavonoids do not inhibit the induction of pigmentation genes expression by Vem. 501Mel cells were treated with 1 $\mu$ M Vem for 48h in the presence or the absence of flavonoids (10 $\mu$ M). Expression of pigmentation genes (Supplementary Table S3) has been measured by RT-qPCR (n=3). For the different experiments, data are expressed in arbitrary units, comparatively with the value found in DMSO-treated cells (CTR), arbitrarily set to 1 and correspond to the means

± sem. of three independent experiments. Statistical analysis was performed using unpaired *t*-test (PRISM6.0<sup>®</sup>) \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

**Figure 5: Flavonoids prevent migration and invasion in BRAFi-resistant melanoma cells.**

**A**, Clonogenic assays have been performed to evaluate proliferation using SKMel28R cells exposed to flavonoids treatment (10 $\mu$ M) and cultivated for 12 days. The histogram represents the mean number ± sem. of colonies (n=3).

**B-C**, Wound healing assays have been performed using IBIDI<sup>®</sup> chambers to evaluate the role of flavonoids on cell migration. Pictures of the wound was photographed with an inverted microscope at X5 magnification Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss). The histogram represents the mean ± sem; wound closure determined by measuring the distance between the edges of the wound at time 0 and 15h (n=3-6), unpaired *t*-tests with unpaired *t*-tests with Sidak-Bonferroni method. **B**, SKMel 28 R cells have been pretreated O/N with 10 $\mu$ M flavonoids and treated with 10 $\mu$ M flavonoids during migration (0 to 15h) (short term). **C**, SKMel 28 R cells have been pretreated with 5 $\mu$ M flavonoids for 14 days (long term) before performing migration assay (0 to 15h) in the absence of treatment.

**D-E**, Spheroid formation assays have been performed in BRAFi-resistant SKmel28 cells to evaluate the role of flavonoids on cell migration. Pictures were taken at day 0 and 4 after spheroid implantation into collagen gel. Each histogram represents the mean ± sem; unpaired *t*-tests with unpaired *t*-tests with Sidak-Bonferroni method. **D**, SKMel 28 R cells have been treated with 20 $\mu$ M flavonoids after spheroid inclusion in extracellular matrix of collagen (0 to 4 days) (short term). **E**, SKMel 28 R cells have been pretreated with 5 $\mu$ M flavonoids for 10 days (long term) before spheroid formation and inclusion in extracellular matrix of collagen (long term).

**Supplemented Figure 1: Flavonoids sensitize melanoma cells during BRAFi treatment**

**A**, IC50 values corresponding to the required concentration of flavonoids to induce 50% of cell death of 501MelR, SKMel28R (BRAFi-resistant) and HaCat keratinocytes cells have been calculated with GraphPad PRISM and represented the mean ± sem IC50 of Vem after co-treatment by the different flavonoids (n=3).

**B**, SKMel28R (BRAFi resistant) cells were treated or not by Vemurafenib (IC50 dose = 5 $\mu$ M) for 48 h in combination with increasing doses of flavonoids (0 to 100 $\mu$ M). At the end of the treatment, cells are stained by Hoechst33342, Propidium iodure and YO-PRO<sup>®</sup>-1 to evaluate



by microscopy the percentage of apoptotic (represented in red) and necrotic (represented in blue) cells in function of total Hoechst positive cells.

**C**, 501MelR (BRAFi resistant) cells were pretreated with flavonoids (10 $\mu$ M) for 48h and washed before treatment with Vemurafenib (5 $\mu$ M) for 4 days (every 2 days). Then, cell density was evaluated by methylene blue staining followed by quantification at 620 nm (n=3-5) Values, calculated with GraphPad PRISM represent mean  $\pm$  sem of cell density after Vem treatment alone (DMSO) or after pretreatment (48h) by the different flavonoids, unpaired *t*-tests with unpaired *t*-tests with Sidak-Bonferroni method.

**D**, SKMel28R (BRAFi resistant) cells were pretreated with flavonoids (10 $\mu$ M) for 48h and co-treated with Vemurafenib (5 $\mu$ M, every 2 days) and flavonoids (10 $\mu$ M, everyday) for 10 days. Values, calculated with GraphPad PRISM represent cell density of residual cells after treatment by Vem alone (DMSO) or after co-treatment with the different flavonoids (n=1).

**E**, SKMel28R (BRAFi resistant) cells were treated or not by Vemurafenib (IC50 dose = 5 $\mu$ M) for 14 days in combination or not with flavonoids (5 $\mu$ M). At the end of the treatment, cell density has been evaluated by optical microscopy and was quantified by methylene blue staining followed by quantification at 620 nm (n=2) at different times (4 to 11 days) to evaluate the ability of melanoma cells to relapse under BRAFi treatment alone or in combination with flavonoids.

### **Supplemented Figure 2: Flavonoids prevent migration and invasion in BRAFi-resistant melanoma cells.**

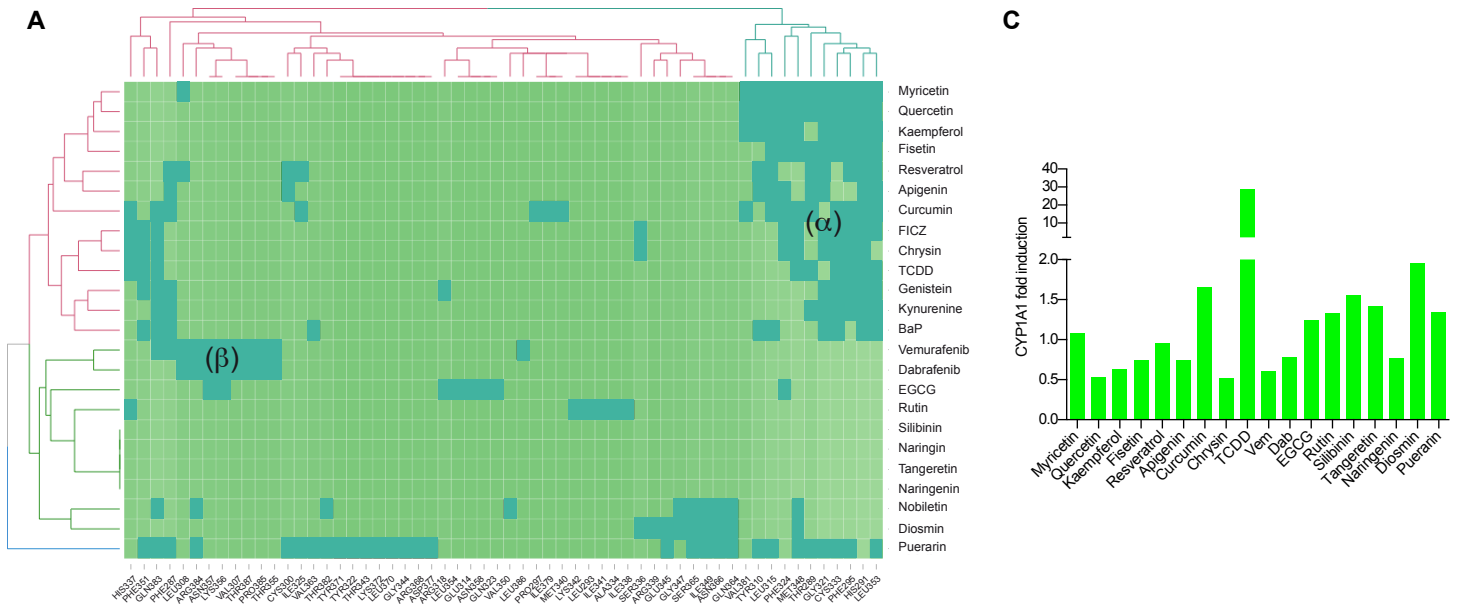
**A-B**, Wound healing assays have been performed using IBIDI® chambers to evaluate the role of flavonoids on cell migration. Pictures of the wound was photographed with an inverted microscope at X5 magnification Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss). **B**, SKMel 28 R cells have been pretreated O/N with 10 $\mu$ M flavonoids and treated with 10 $\mu$ M flavonoids during migration (0 to 15h) (short term). **C**, SKMel 28 R cells have been pretreated with 5 $\mu$ M flavonoids for 14 days (long term) before performing migration assay (0 to 15h) in the absence of treatment.

**C-D**, Spheroid formation assays have been performed in BRAFi-resistant SKmel28 cells to evaluate the role of flavonoids on cell migration. Pictures were taken at day 0 and 4 after spheroid implantation into collagen gel. **C**, SKMel 28 R cells have been treated with 20 $\mu$ M flavonoids after spheroid inclusion in extracellular matrix of collagen (0 to 4 days) (short term).

**D**, SKMel 28 R cells have been pretreated with 5 $\mu$ M flavonoids for 10 days (long term) before spheroid formation and inclusion in extracellular matrix of collagen (long term).

**Table 2: Benefic role of selected flavonoids against melanoma cells**

Figure 1



**B**

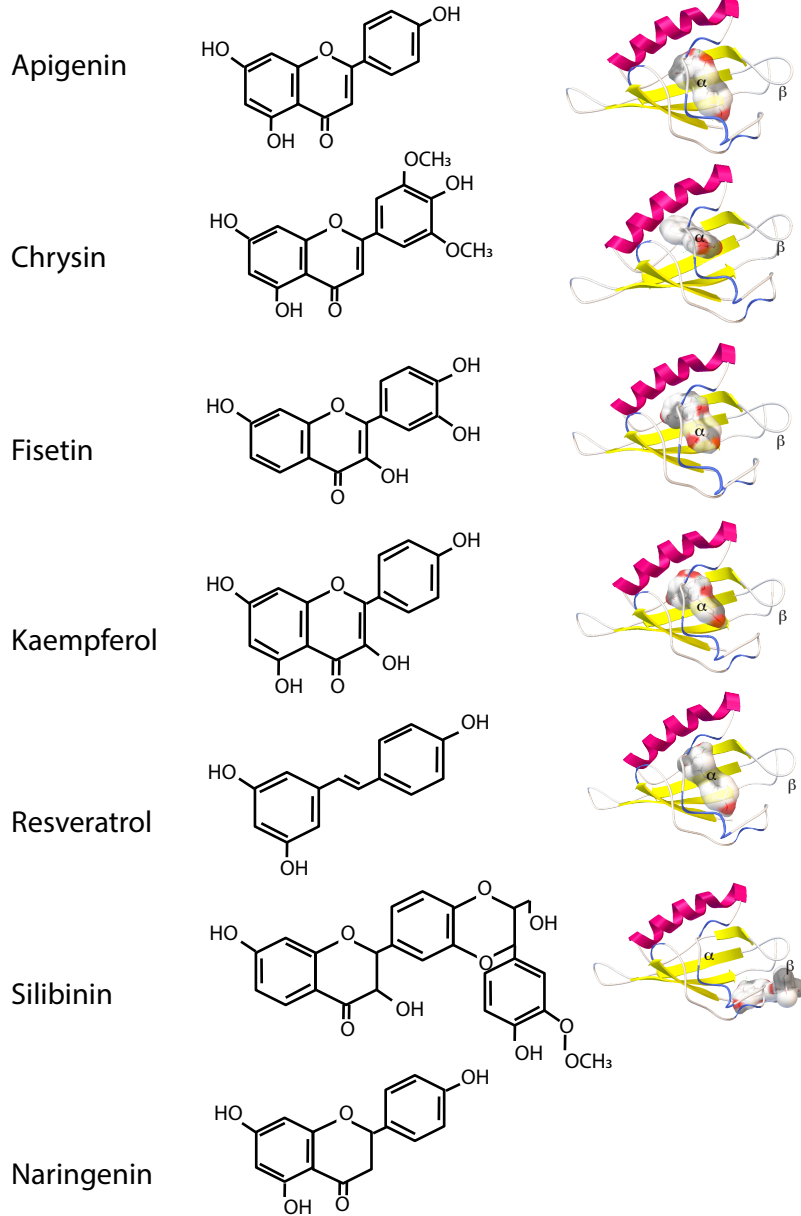


Figure 2

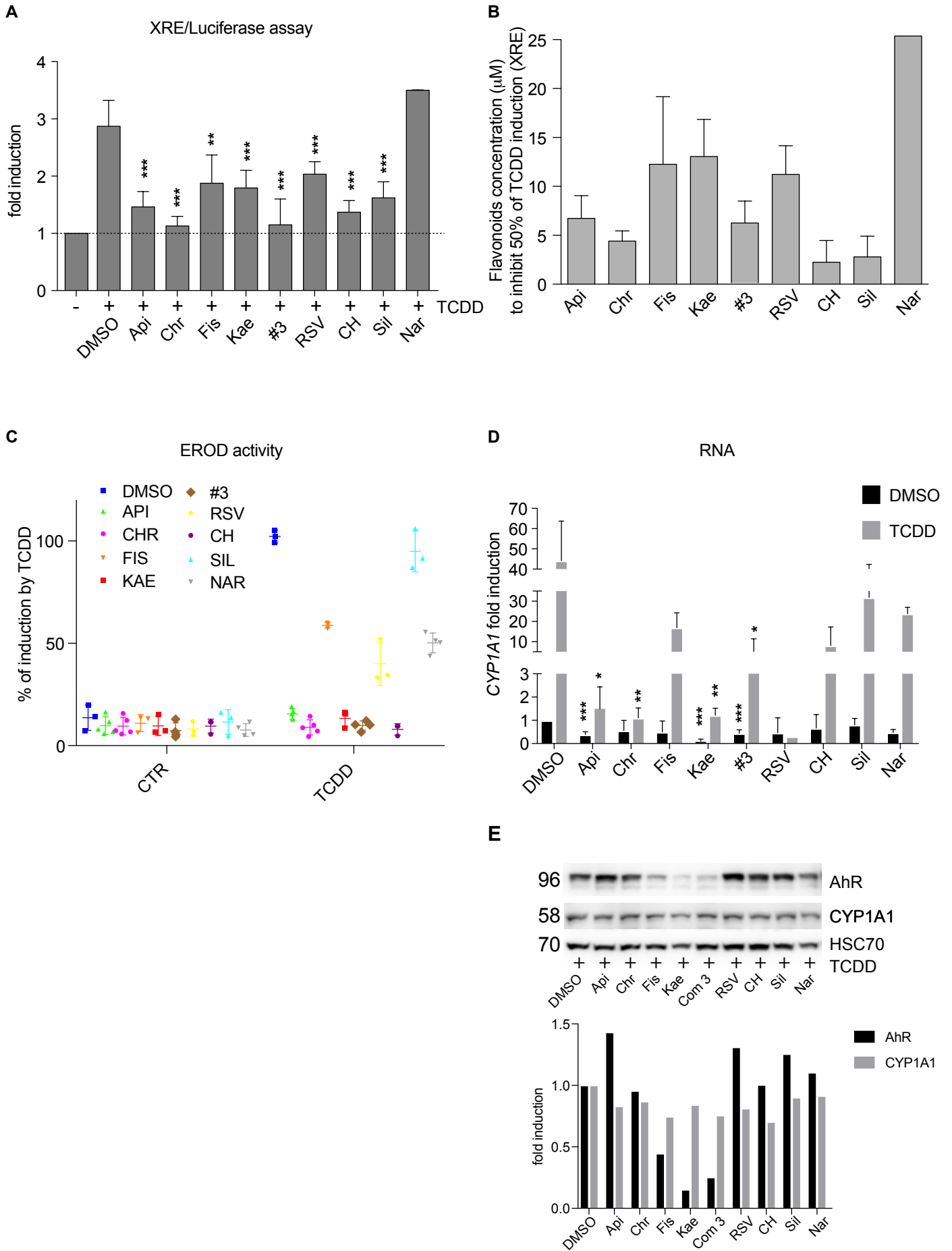
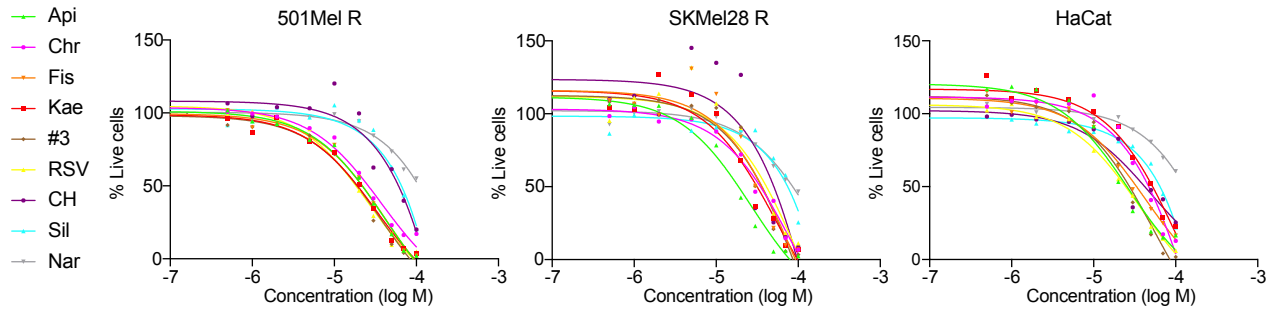
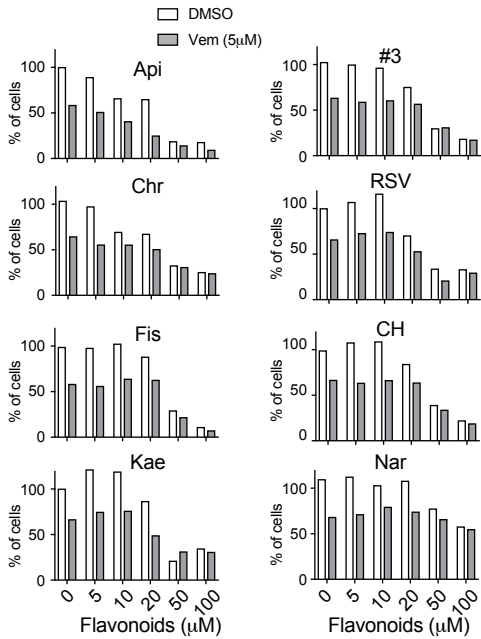


Figure 3

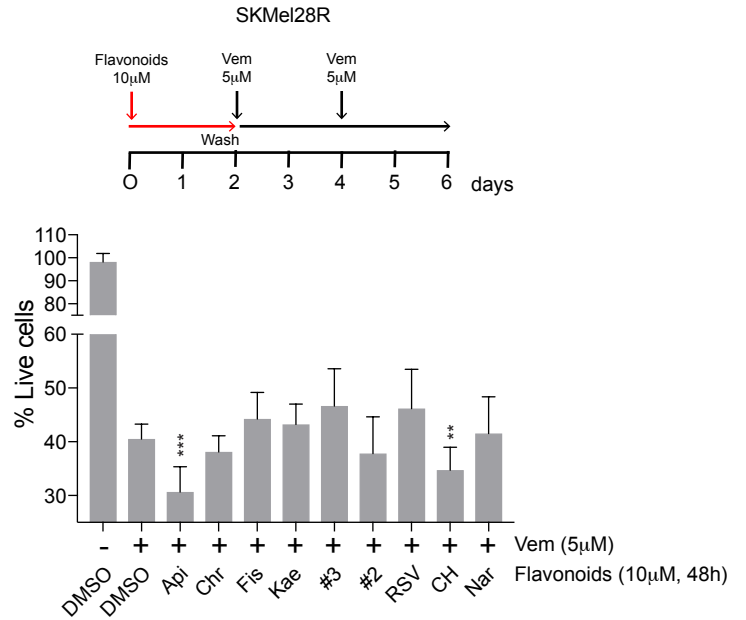
**A**



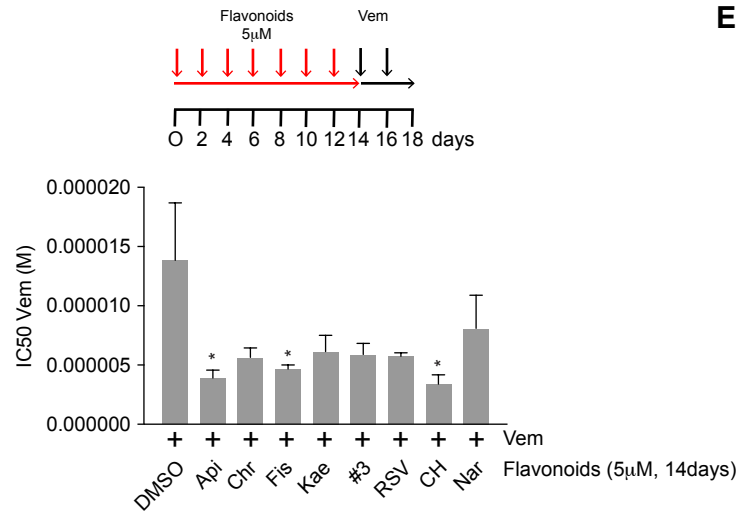
**B**



**C**



**D**



**E**

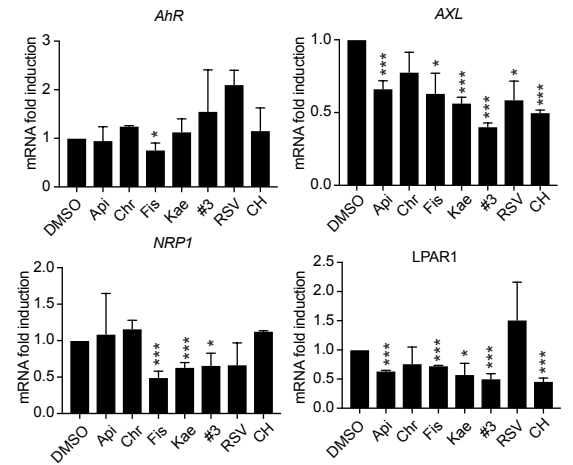
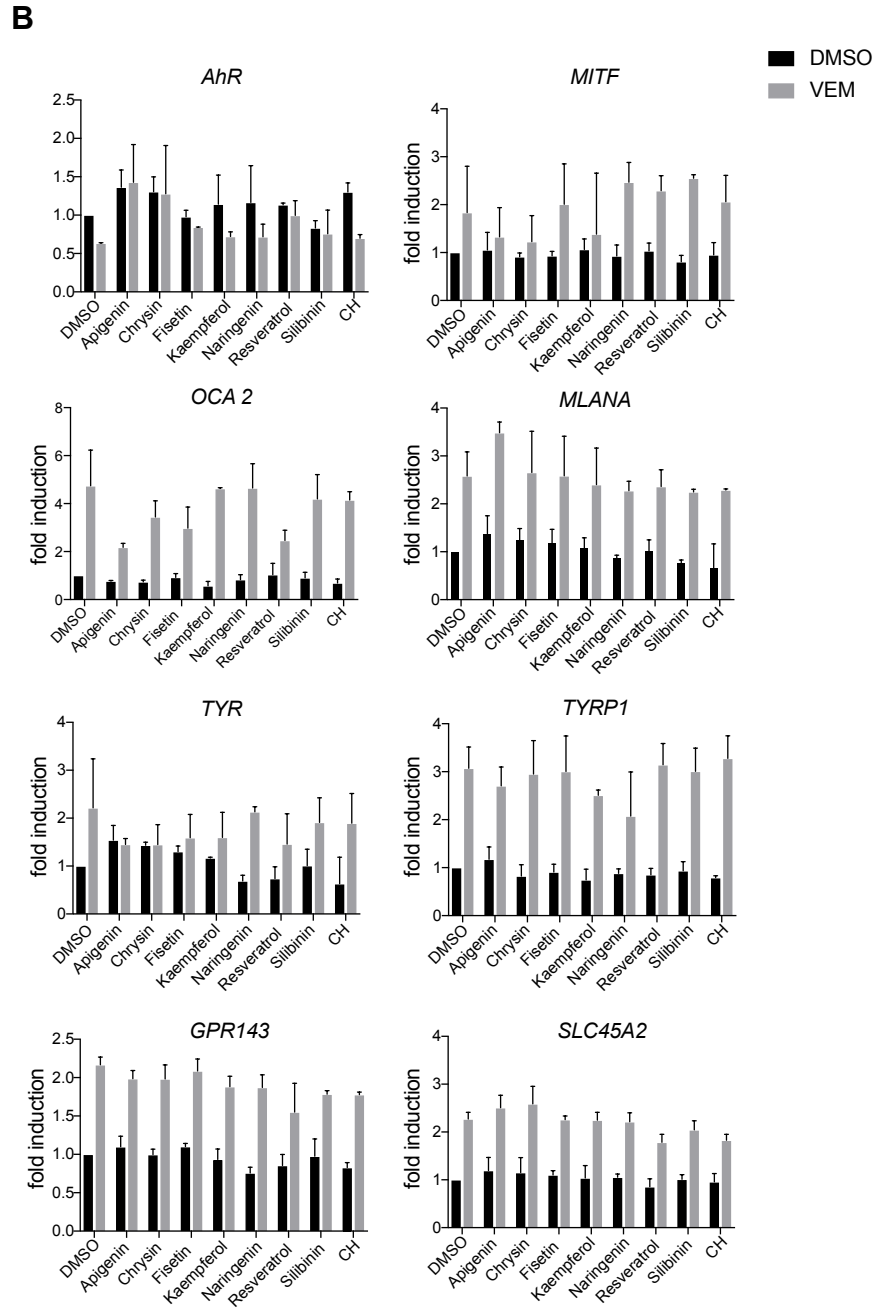
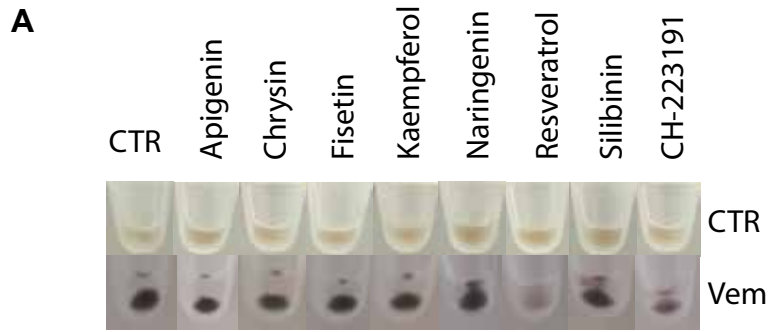
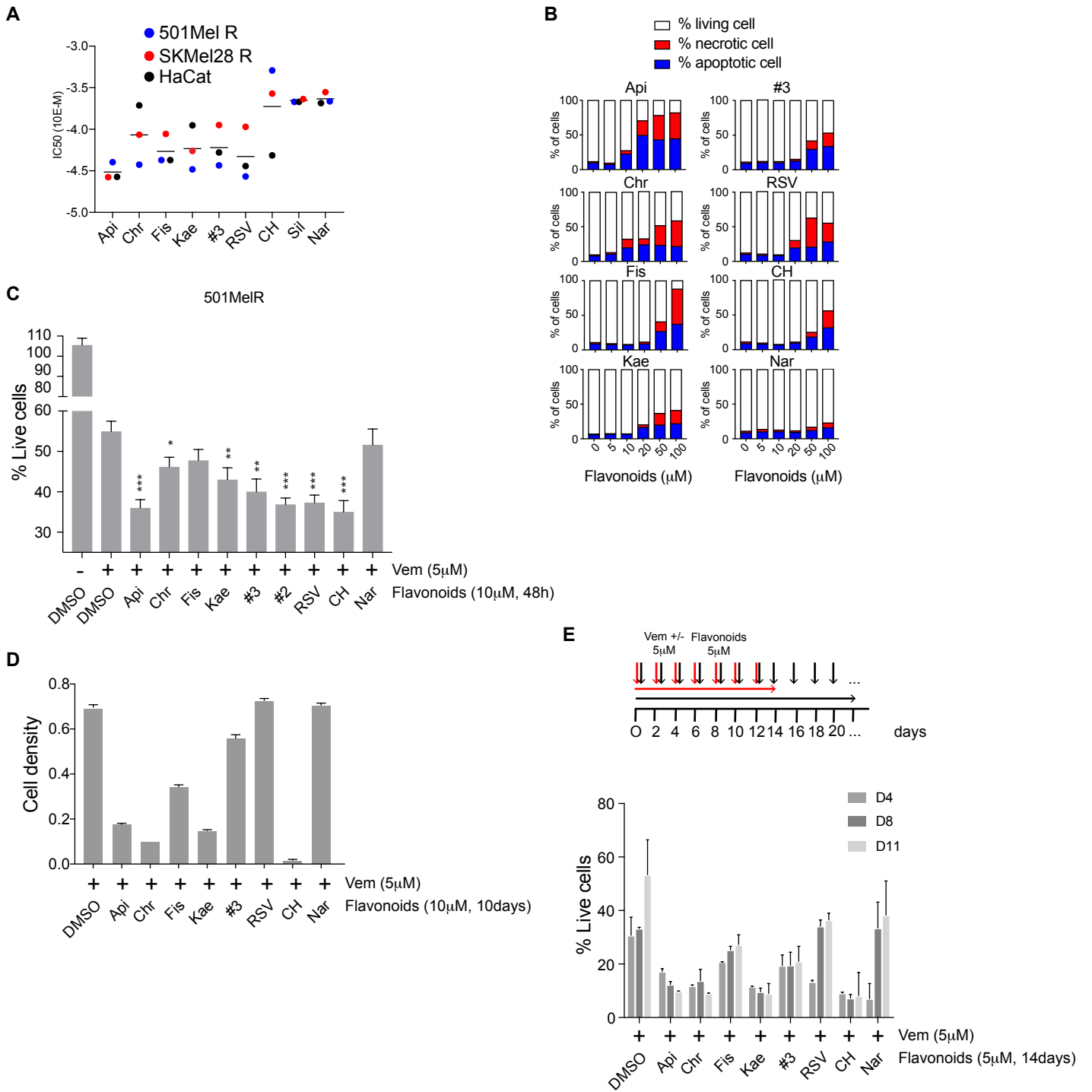


Figure 4



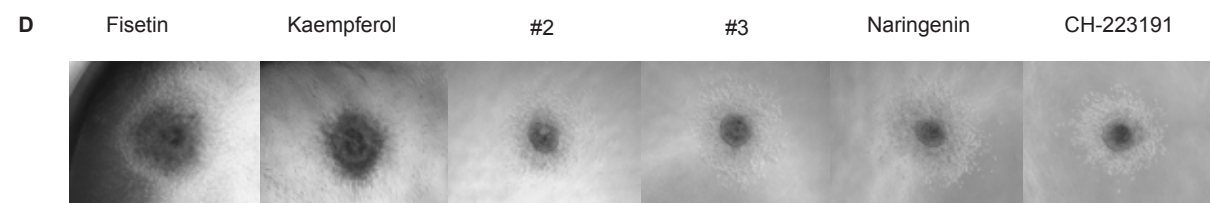
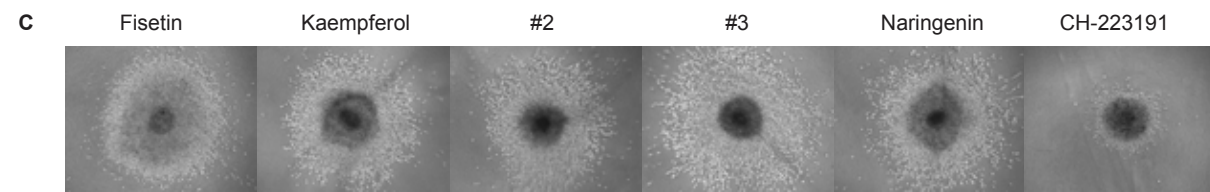
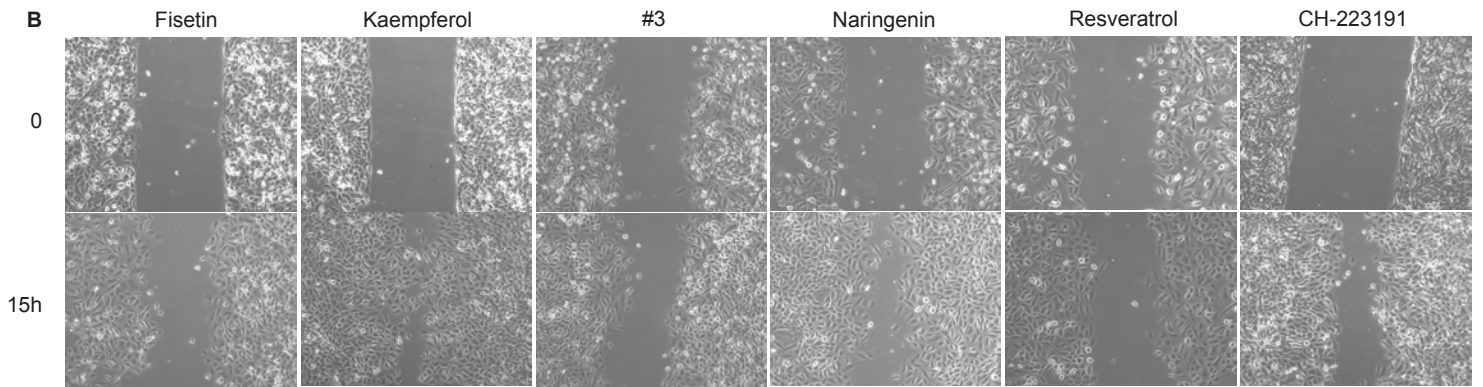
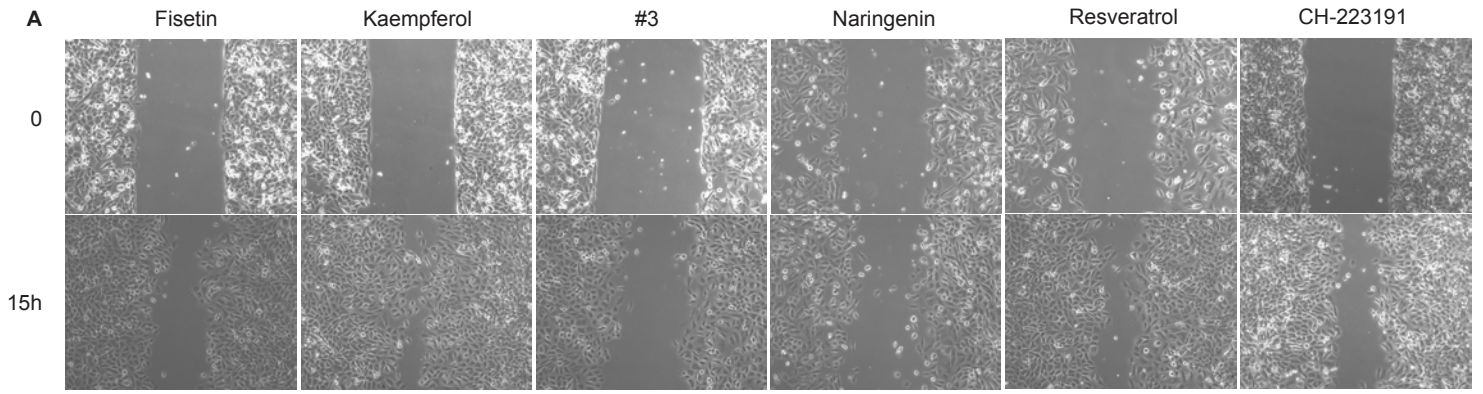


Supplemented Figure 1





# Supplemented Figure 2



Flavonoids	Class	Dietary source	References on melanoma	Role in pigmentation	Role in melanoma	Regulation of AhR activity
Apigenin	Flavones	parsley, celery, celeriac, and chamomile	48	Up (27)	Inhibition of proliferation and invasion and induction of apoptosis (1), suppression of PDL1 expression (2), inhibition of STAT3 (3)	Antagonist (4,5)
(+)-Epigallocatechin Gallate	Flavan-3-ol	tea	66	Dn (28)	Inhibition of proliferation and invasion by targeting YB1 (6), increase Sorafenib effect (7)	
Chrysin	5,7-dihydroxyflavone	honey, propolis, the passion flowers, Passiflora	15	Up (27) or Dn (29)	Synergical effect with IFNs on metastatic pulmonary melanoma (8)	Agonist (9)
Curcumin	Curcuminoid	ginger	158	Dn (30)	Inhibition of proliferation Wnt/beta Catenin pathway (10)	Antagonist (11)
Diosmin	Flavone	citrus family rutaceae	3			No effect on TCDD induction (4)
Fisetin	Flavonol	strawberries, apples, persimmons, onions and cucumbers	20	Up (27)	Inhibition of migration and invasion by inhibiting HGF/cMET (12)	Antagonist (13)
Genistein	Isoflavone	dyer's broom	80	Up (31)		Antagonist for TCDD induction (14)
Kaempferol	Flavonol	broccoli, brussels sprouts...	32	Up (27)	Inhibition of proliferation and invasion (15) an tumor growth (16)	Agonist (9)
Myricetin	Flavonol	fruits, nuts, berries, tea and in red wine	7	Dn (32)	Inhibition of proliferation and invasion by targeting FAK/paxillin and MAPK pathways (17)	Antagonist (4)
Naringenin	Flavanone	grapefruit, orange	19	Up (33)	Inhibition of proliferation by targeting TRAF6 (18), induction of autophagy (19)	Inhibitor of AhR via HSP90 (20)
Naringin	Flavanone	citrus fruit	6	Dn (34)		
Nobiletin	Flavone	citrus and tangerine peel	5	Dn (35)	Inhibition of proliferation (21) by targeting MEK1/2 and RSK2 (22)	
Puerarin	Isoflavone	pueraria, kudzu	0	Up (36)		
Quercetin	Flavonol	red onions and kale	120	Dn (37)	Inhibitor of glucose metabolism of melanoma cells by targeting c-SRC (23)	
Resveratrol	Stilbenoid	grapes, blueberries, raspberries, mulberries, and peanuts	111	Dn (38)	Inhibition of proliferation by inducing apoptosis (25), increase of BRAF sensitivity (26)	Antagonist (26)
Rutin	Flavonol	citrus fruit	26	Dn (34)		Antagonist (24)
Silibinin	Flavonolignans	Silybum marianum	14			
Tangeretin	Flavone	citrus and tangerine peel	5	Dn (39)		

Table 2 Role of the different flavonoids on melanoma cells

Flavonoids	Inhibition of AhR activity	Induction of pigmentation	Increase of BRAFi sensitivity	Inhibition of resistance	Inhibition of proliferation	Inhibition of migration	Inhibition of invasion
Apigenin	+++	+	+++	+	++	+++	+++
Chrysin	+++	+	++	+	++	+	++
Fisetin	+	+	++	-	-	+++	-
Kaempferol	+	+	++	+	-	-	-
Naringenin	-	+	-	-	-	+/-	+/-
Resveratrol	+	-	++	-	-	-	-
Silibinin	+/-	+	-				
CH-223191	+++	+	+++	+	-	-	+++

Table S1: References for the different flavonoids

References for natural flavonoids compounds from Selleckchem								
Catalog No.	Product Name	Reck Number	M.W.	CAS Number	Form	Max Solubility in DMSO (mg/mL)	Targets	Information
S2282	Apigenin	L1700-09	270.24	520-36-5	free base	54	P450 (e.g., CYP17)	Apigenin is a potent P450 inhibitor for CYP2C9 with IC50 of 23 $\mu$ M.
S2290	Epigallocatechin Gallate	L1700-09	456.37	989-51-5	free base	72	Others	(-)-Epigallocatechin Gallate is the main catechin extraction of green tea, which shows multiple bioactivity.
S2281	Chrysin	L1700-09	254.24	480-40-0	free base	51	Others	Chrysin is a naturally occurring flavone chemically extracted from the blue passion flower ( <i>Passiflora caerulea</i> ).
S1848	Curcumin	L1700-07	368.38	458-37-7	free base	74	Others	Curcumin is the principal curcuminoid of the popular Indian spice turmeric, which is a member of the ginger family ( <i>Zingiberaceae</i> ).
S2292	Diosmin	L1700-09	608.55	520-27-4	free base	6	Others	Diosmin is a semisynthetic phlebotropic agent and a member of the flavonoid family.
S2298	Fisetin	L1700-09	286.24	528-48-3	free base	57	Sirtuin	Fisetin (Fisetin) is a potent sirtuin activating compound (STAC) and an agent that modulates sirtuins.
S1342	Genistein	L1700-03	270.24	446-72-0	Free base	54	EGFR, Topoisomerase	Genistein, a phytoestrogen found in soy products, is a highly specific inhibitor of protein tyrosine kinase (PTK) which blocks the mitogenic effect mediated by EGF on NIH-3T3 cells with IC50 of 12 $\mu$ M or by insulin with IC50 of 19 $\mu$ M.
S2314	Kaempferol	L1700-10	286.23	520-18-3	free base	57	Others	Kaempferol is a natural flavonol, a type of flavonoid, that has been isolated from plant sources.
S2326	Myricetin	L1700-10	318.24	529-44-2	free base	63	Others	Myricetin (Cannabiscetin) is a flavonoid found in many grapes, berries, fruits, vegetables, herbs, as well as other plants, which has antioxidant and anti tumor properties.
S2384	Naringenin	L1700-10	272.25	480-41-1	free base	54	P450 (e.g., CYP17)	Naringenin is a natural predominant flavanone derived from plant food, which is considered to have a bioactive effect on human health as antioxidant, free radical scavenger, anti-inflammatory, carbohydrate metabolism promoter, and immune system modulator.
S2329	Naringin	L1700-10	580.53	10236-47-2	free base	116	P450 (e.g., CYP17)	Naringin is a flavanone glycoside, which exerts a variety of pharmacological effects such as antioxidant activity, blood lipid lowering, anticancer activity, and inhibition of cytochrome P450 enzymes.
S2333	Nobiletin	L1700-10	402.39	478-01-3	free base	81	MMP	Nobiletin, a citrus flavonoid isolated from citrus peels like in tangerine, which has anti-inflammatory and anti-tumor activities.
S2346	Puerarin	L1700-10	416.38	3681-99-0	free base	86	Others	Puerarin (Kakonein), an isoflavones found in the root of <i>Radix puerariae</i> , is a 5-HT2C receptor and benzodiazepine site antagonist.
S2391	Quercetin	L1700-10	302.24	117-39-5	free base	61	Sirtuin, PI3K, Src, PKC & mTOR	Quercetin is a natural flavonoid present in vegetables, fruit and wine and is a PI3K inhibitor with IC50 of 2.4 – 5.4 $\mu$ M.
S1386	Resveratrol	L1700-04	228.24	501-36-0	Salt	45	Sirtuin, Autophagy	Resveratrol is a phytoalexin produced naturally by several plants with anti-cancer, anti-inflammatory, blood-sugar-lowering and other beneficial cardiovascular effects.
S2350	Rutin	L1700-10	610.52	153-18-4	free base	122	Others	Rutin, a flavonol glycoside found in many plants including buckwheat, tobacco, Forsythia, hydrangea, viola, etc., which possesses toxicity effects for human.
S2357	Silibinin	L1700-10	482.44	22885-70-6	free base	96	Others	Silibinin, the main flavonoid extracted from the milk thistle <i>Silybum marianum</i> , displays hepatoprotective properties in acute and chronic liver injury.
S2383	Tangeretin	L1700-10	372.37	481-53-8	free base	8	Others	Tangeretin, a natural polymethoxylated flavone concentrated in the peel of citrus fruits, is known to have antiproliferative, antiinvasive, antiangiogenic, and antioxidant activities.

Catalog No.	Product Name	Number of papers related to melanoma	Role in pigmentation	Role in melanoma	Regulation of aHR activity	Pathway	Number of papers related to melanoma
S2282	Apigenin	48	Up (27)	Inhibition of proliferation and invasion and induction of apoptosis (1), suppression of PDL1 expression (2), inhibition of STAT3 (3)	Antagonist for TCDD induction (4,5)	Metabolism	48
S2290	Epigallocatechin Gallate	66	Dn (28)	Inhibition of proliferation and invasion by targeting YB1 (6), increase Sorafenib effect (7)		Others	66
S2281	Chrysin	15	Up (27) or Dn (29)	Synergical effect with FNA on metastatic pulmonary melanoma (8)	Agonist (9)	Others	15
S1848	Curcumin	158	Dn (30)	Inhibition of proliferation via Wnt/beta Catenin pathway (10)	Antagonist (11)	Others	158
S2292	Diosmin	3		Inhibition of migration and invasion by inhibiting HGF/cMET (12)	No effect on TCDD induction (4)	Others	3
S2298	Fisetin	20	Up (27)		Antagonist (13)	Others	20
S1342	Genistein	80	Up (31)		Antagonist for TCDD induction (14)	Tyrosine Kinase	80
S2314	Kaempferol	32	Up (27)	Inhibition of proliferation and invasion (15) an tumor growth (16)	Agonist (9)	Others	32
S2326	Myricetin	7	Dn (32)	Inhibition of proliferation and invasion by targeting FAK/Src and MAPK pathways (17)	Antagonist (4)	Others	7
S2384	Naringenin	19	Up (33)	Inhibition of proliferation by targeting mTOR (18), induction of autophagy (19)	Inhibitor of aHR via HSP90 (20)	Metabolism	19
S2293	Naringin	6	Dn (34)			PI3K/Akt/mTOR	6
S2333	Nobiletin	5	Dn (35)	Inhibition of proliferation (21) by targeting MEK1/2 and ERK2 (22)		Others	5
S2346	Puerarin	0	Up (36)			Others	0
S2391	Quercetin	120	Dn (37)	Inhibitor of glucose metabolism of melanoma cells by targeting c-SRC (23)		Epigenetics	120
S1386	Resveratrol	26	Dn (38)	Inhibition of proliferation by inducing apoptosis (24), increase of BAX sensitivity (26)	Antagonist (26)	Epigenetics	26
S2357	Silibinin	14	Dn (34)		Antagonist (24)	Others	14
S2383	Tangeretin	5	Dn (39)		Others	Others	5

**Table S2 : Binding Energy of different ligands for PAS-B domain of AhR and AA close contact evaluated by docking experiments.**

<b>Chemicals</b>	<b>Binding Energy</b>	<b>H-Bond</b>	<b>Close Contact</b>
<b>TCDD</b>	<b>-7.68</b>		THR289 HIS291 PHE295 CYS333 HIS337 MET348 PHE351 LEU353 GLN383
<b>Apigenin</b>	<b>-6.97</b>	CYS300	CYS300 THR289 HIS291 LEU353 PHE287 TYR310 LEU315 GLY321 PHE324
<b>Chrysin</b>	<b>-7.14</b>		HIS291 PHE295 GLY321 PHE324 CYS333 SER336 HIS337 MET348 PHE351 GLN383
<b>Fisetin</b>	<b>-8.01</b>	THR289	THR289 HIS291 LEU353 LEU315 GLY321 PHE324 PHE295 CYS333 MET348
<b>Kaempferol</b>	<b>-6.56</b>		HIS291 PHE295 GLY321 PHE324 CYS333 MET348 TYR310 LEU315 LEU353 VAL381
<b>Resveratrol</b>	<b>-6.39</b>	CYS300 GLY321	PHE287 THR289 HIS291 PHE295 CYS300 LEU308 TYR310 LEU315 GLY321 ILE325 LEU353
<b>Silibin</b>	<b>0</b>		
<b>Naringenin</b>	<b>0</b>		

**Table S3: Primers sequences for RT-qPCR**

RT-qPCR primers				
Genes				
TYR	Forward	cctctagtcctcacaaggtctgca	Reverse	gtgggatacgagccaattcga
MLANA	Forward	gagaaaaactgtgaacctgtggt	Reverse	aagggtggtgactgttctg
MITF	Forward	atgctggaaatgctagaatataatcactac	Reverse	ggcctgctgtatggttacatg
SLC45A2	Forward	tccactaccatgccctcttc	Reverse	cccagtctatagcacccaaaa
GPR143	Forward	cactgatgcccatgaaaa	Reverse	tgtgctggcatcagaacc
TYRP1	Forward	ccagagggttctcatcatagtcaggag	Reverse	atatccagggcccggaca
OCA2	Forward	ggagttgaactgaccagga	Reverse	agttccgcagcctgaagt
AhR	Forward	accagcctcaggatgtgaac	Reverse	tcattatgctgtacaagtcactgtt
CYP1A1	Forward	acctccctgatcctgtga	Reverse	gatcttgagggtggctgct
NRP1	Forward	aataaccacattcacaagaagattg	Reverse	tcatcaatttaatttctgggtct
LPAR1	Forward	ccatcttactccatccctgtaa	Reverse	actcgtgtagaagcactgtgg
AXL	Forward	cgtaacctccacctgtctc	Reverse	tcccatcgtctgacagca

## Supplemented references

1. Zhao, G., Han, X., Cheng, W., Ni, J., Zhang, Y., Lin, J., S. Apigenin inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest in human melanoma cells. *Oncol. Rep.* **37**, 2277–2285 (2017).
2. Xu, L. *et al.* Apigenin suppresses PD-L1 expression in melanoma and host dendritic cells to elicit synergistic therapeutic effects. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 261 (2018).
3. Cao, H. H. *et al.* Inhibition of the STAT3 signaling pathway contributes to apigenin-mediated anti-metastatic effect in melanoma. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
4. Zhang, S., Qin, C. & Safe, S. H. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: Effects of structure and cell context. *Environ. Health Perspect.* **111**, 1877–1882 (2003).
5. Jin, U.-H. *et al.* Structure-Dependent Modulation of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Activities by Flavonoids. *Toxicol. Sci.* **164**, 205–217 (2018).
6. Sechi, M. *et al.* Fisetin targets YB-1/RSK axis independent of its effect on ERK signaling: insights from in vitro and in vivo melanoma models. *Sci. Rep.* **8**, 1–14 (2018).
7. Pal, H. C. *et al.* Fisetin, a dietary flavonoid, augments the anti-invasive and anti-metastatic potential of sorafenib in melanoma. *Oncotarget* **7**, (2016).
8. Álvarez, N., Vicente, V. & Martínez, C. Synergistic Effect of Diosmin and Interferon- $\alpha$  on Metastatic Pulmonary Melanoma. *Cancer Biother. Radiopharm.* **24**, 347–352 (2009).
9. Ciolino, H. P., Wang, T. T. Y. & Yeh, G. C. Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Res.* **58**, 2754–2760 (1998).
10. Srivastava, N. S. & Srivastava, R. A. K. Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells. *Phytomedicine* **52**, 117–128 (2019).
11. Fukuda, S., Kawase, M., Yamashita, Y. & Ashida, H. Curcumin and its derivatives inhibit 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin-induced expression of drug metabolizing enzymes through aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway AU - Nakai, Rika. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**, 616–628 (2018).
12. Cao, H. H. *et al.* Quercetin inhibits HGF/c-Met signaling and HGF-stimulated melanoma cell migration and invasion. *Mol. Cancer* **14**, 1–12 (2015).
13. Perepechaeva ML, Seredina TA, Sidorova YA, Pivovarova EN, Markel AL, Lyakhovich VV, G. A. Letter to the Editor Quercetin Attenuates Benzo (  $\alpha$  ) pyrene-induced. *Sci, Biomed Env.* **30**, 308–313 (2017).
14. MacPherson, L. & Matthews, J. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription by resveratrol or kaempferol is independent of estrogen receptor  $\alpha$  expression in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* **299**, 119–129 (2010).
15. Chen, H.-Y. *et al.* Chrysin inhibit human melanoma A375.S2 cell migration and invasion via affecting MAPK signaling and NF- $\kappa$ B signaling pathway in vitro. *Environ. Toxicol.* **0**, (2018).
16. Sassi, A. *et al.* Chrysin, a natural and biologically active flavonoid suppresses tumor growth of mouse B16F10 melanoma cells: In vitro and In vivo study. *Chem. Biol. Interact.* **283**, 10–19 (2018).
17. Cui, S. *et al.* Genistein inhibits the growth and regulates the migration and invasion abilities of melanoma cells via the FAK/paxillin and MAPK pathways. *Oncotarget* **8**, 21674–21691 (2017).
18. Zhang, J. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) suppresses melanoma cell growth and metastasis by targeting TRAF6 activity. *Oncotarget* **7**, 79557–79571 (2016).
19. Xie, J. *et al.* A novel ECG analog 4-(S)-(2,4,6-trimethylthiobenzyl)-epigallocatechin

- gallate selectively induces apoptosis of B16-F10 melanoma via activation of autophagy and ROS. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).
20. Palermo, C. M., Hernando, J. I. M., Dertinger, S. D., Kende, A. S. & Gasiewicz, T. A. Identification of Potential Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists in Green Tea. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 865–872 (2003).
  21. Makhmalzadeh, B. S. *et al.* Functionalized Caprolactone-Polyethylene Glycol Based Thermo-Responsive Hydrogels of Silibinin for the Treatment of Malignant Melanoma. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **21**, 143 (2018).
  22. Lee, M. H. *et al.* Direct targeting of MEK1/2 and RSK2 by silybin induces cell-cycle arrest and inhibits melanoma cell growth. *Cancer Prev. Res.* **6**, 455–465 (2013).
  23. Guo, B., Zhang, Y., Hui, Q., Wang, H. & Tao, K. Naringin suppresses the metabolism of A375 cells by inhibiting the phosphorylation of c-Src. *Tumor Biol.* **37**, 3841–3850 (2016).
  24. Hamada, M. *et al.* TCDD-Induced CYP1A1 Expression, an Index of Dioxin Toxicity, Is Suppressed by Flavonoids Permeating the Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8891–8898 (2006).
  25. Zhao, H. *et al.* Resveratrol induces apoptosis in human melanoma cell through negatively regulating Erk/PKM2/Bcl-2 axis. *Onco. Targets. Ther.* **11**, 8995–9006 (2018).
  26. Corre, S. *et al.* Sustained activation of the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) transcription factor promotes the resistance to BRAF inhibitors in melanoma. *Nat. Commun.* in press (2018).
  27. Liu-Smith, F., Meyskens, F., Irvine Hall, A. & Meyskens, F. L. Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma HHS Public Access. *J. Mol Nutr Food Res* **60**, 1264–1274 (2016).
  28. Kim, Y. C., Choi, S. Y. & Park, E. Y. Anti-melanogenic effects of black, green, and white tea extracts on immortalized melanocytes. *J. Vet. Sci.* **16**, 135–143 (2015).
  29. Kim, D.-C., Rho, S.-H., Shin, J.-C., Park, H. H. & Kim, D. Inhibition of melanogenesis by 5,7-dihydroxyflavone (chrysin) via blocking adenylyl cyclase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**, 121–125 (2011).
  30. Tu, C.-X. *et al.* Curcumin Inhibits Melanogenesis in Human Melanocytes. *Phyther. Res.* **26**, 174–179 (2012).
  31. Wang, H.-Z., Zhang, Y., Xie, L.-P., Yu, X.-Y. & Zhang, R.-Q. Effects of genistein and daidzein on the cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells11The abbreviations used are: BSA, bovine serum albumin; FBS, fetal bovine serum; ECM, extracellular matrix; DMSO, dimethyl sulfoxide; PTK, protein tyrosine kinase. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 421–426 (2002).
  32. Juang, L.-J. *et al.* Safety assessment, biological effects, and mechanisms of Myrica rubra fruit extract for anti-melanogenesis, anti-oxidation, and free radical scavenging abilities on melanoma cells. *J. Cosmet. Dermatol.* **18**, 322–332 (2019).
  33. Huang, Y.-C., Yang, C.-H. & Chiou, Y.-L. Citrus flavanone naringenin enhances melanogenesis through the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in mouse melanoma cells. *Phytomedicine* **18**, 1244–1249 (2011).
  34. Takekoshi, S., Nagata, H., Kitatani, K., Biology, C. & Defense, H. Flavonoids Enhance Melanogenesis in Human Melanoma Cells. **39**, 116–121 (2014).
  35. Kim, H. J., Yonezawa, T., Teruya, T., Woo, J.-T. & Cha, B.-Y. Nobiletin, a Polymethoxy Flavonoid, Reduced Endothelin-1 Plus SCF-Induced Pigmentation in Human Melanocytes. *Photochem. Photobiol.* **91**, 379–386 (2015).
  36. Ding, X. *et al.* Effect of puerarin on melanogenesis in human melanocytes and vitiligo mouse models and the underlying mechanism. *Phyther. Res.* **33**, 205–213 (2019).
  37. Fan, M., Zhang, G., Hu, X., Xu, X. & Gong, D. Quercetin as a tyrosinase inhibitor:



- Inhibitory activity, conformational change and mechanism. *Food Res. Int.* **100**, 226–233 (2017).
38. Newton, R. A., Cook, A. L., Roberts, D. W., Helen Leonard, J. & Sturm, R. A. Post-Transcriptional Regulation of Melanin Biosynthetic Enzymes by cAMP and Resveratrol in Human Melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 2216–2227 (2007).
  39. Yoshizaki, N., Hashizume, R. & Masaki, H. A polymethoxyflavone mixture extracted from orange peels, mainly containing nobiletin, 3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavone and tangeretin, suppresses melanogenesis through the acidification of cell organelles, including melanosomes. *J. Dermatol. Sci.* **88**, 78–84 (2017).

# DISCUSSION



# DISCUSSION

## État actuel de la prise en charge du mélanome métastatique

Le mélanome est la forme la plus mortelle des cancers cutanés. S'il est associé à un excellent pronostic lorsque la lésion est localisée, la dissémination des cellules tumorales induit une chute drastique du taux de survie des patients. L'identification de la mutation BRAF<sup>V600E</sup>, associée aux progrès dans la compréhension des mécanismes tumoraux, a conduit au début des années 2010 (Pratilas and Solit, 2010) au développement d'une nouvelle classe de molécules : les thérapies ciblées du mélanome ou inhibiteurs de BRAF (BRAFi). Ainsi, environ la moitié des patients atteints de mélanome (porteurs de la mutation) sont traités en première ligne par les BRAFi, combinés aux inhibiteurs de MEK (MEKi). Trois combinaisons de BRAFi+MEKi ont de nos jours été approuvées pour le traitement du mélanome muté BRAF<sup>V600E/K</sup> : Vemurafenib+Cobimetinib (Larkin, 2014), Dabrafenib+Trametinib (Daud et al., 2017; Robert et al., 2015; Salama and Kim, 2013), et plus récemment Encorafenib+Binimetinib (Dummer et al., 2018b; Shirley, 2018). Les premiers essais cliniques utilisant de telles molécules montrent des résultats exceptionnels et jamais atteints dans la prise en charge du mélanome. Malheureusement, les premières réponses sont quasi invariablement suivies de rechutes et seuls 5% des patients traités auront des réponses complètes et durables. Bien que l'acquisition de nouvelles mutations explique partiellement les résistances, il semble de plus en plus établi que la plasticité du transcriptome des cellules de mélanome y contribue aussi largement.

En effet plusieurs études importantes ces dernières années ont permis d'impliquer l'hétérogénéité tumorale et/ou la plasticité des cellules de mélanome comme facteurs importants du développement des résistances (Rambow et al., 2018; Shaffer et al., 2017; Tsoi et al., 2018). Ceci a notamment été permis par l'apparition de nouvelles technologies de pointe comme le single cell RNAseq (Rambow et al., 2018; Tirosh et al., 2016), les xénogreffes de tumeurs dérivées de patients (PDX) (Rambow et al., 2018) ou encore le RNA FISH (Shaffer et al., 2017). Cette plasticité phénotypique, permettant l'adaptation des cellules au traitement, permet l'émergence de sous-populations cellulaires.

La plasticité phénotypique des cellules de mélanome n'est pas seulement retrouvée lors des résistances aux thérapies mais est impliquée dans toutes les étapes du développement cancéreux. Elle joue également un rôle central dans l'initiation et la progression du mélanome, ainsi que pendant le développement et à la régénération tissulaire. Dans le contexte de la

progression du mélanome et de la résistance aux inhibiteurs de BRAF, le facteur de transcription Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) joue un rôle crucial dans l'adaptation phénotypique des cellules. Les premières études ayant étudié le switch phénotypique dépeignent deux phénotypes distincts et bien définis : un phénotype prolifératif MITF<sup>high</sup>, et un phénotype invasif MITF<sup>low</sup> (Hoek et al., 2008; Müller et al., 2014; Verfaillie et al., 2015). Le schéma est maintenant plus complexe et montre l'existence de plusieurs sous-populations cellulaires, formant un gradient de différenciation mélanocytaire. Il me paraît donc important de nos jours d'éviter la caractérisation trop simpliste en phénotypes 'prolifératif' ou 'invasif', et bien de prendre en compte l'ensemble des données d'expression pour essayer d'identifier de manière spécifique ces différentes sous-populations. L'émergence des nouvelles technologies comme le single cell RNAseq permet de caractériser de manière précise les changements phénotypiques et les trajectoires transcriptomiques qui interviennent au sein de la tumeur au cours du traitement du mélanome.

Les immunothérapies, autre grande classe de molécules utilisées dans la prise en charge du mélanome métastatique, sont aussi victimes de l'adaptation et la résistance des cellules tumorales. En effet si elles peuvent induire des réponses durables pour 20 à 40% des patients, 30% des patients présentant une réponse initiale développeront une résistance au traitement (Sharma et al., 2017). De façon intéressante, les patients résistants aux anti-PD1 présentent une signature transcriptomique mésenchymateuse, ainsi que l'expression de marqueurs de la résistance aux BRAFi comme *AXL* ou *WNT5A* (Arozarena and Wellbrock, 2019). Cela suggère que la plasticité et la dédifférenciation cellulaire comme mécanisme de résistance ne sont pas spécifiques des inhibiteurs de la voie des MAPK mais pourraient constituer un mécanisme plus global d'adaptation des cellules de mélanome. Alors que de plus en plus de patients reçoivent des immunothérapies, il est à mon avis indispensable de caractériser rapidement les résistances à ces traitements, que ce soit les résistances intrinsèques ou acquises. Les approches utilisées au cours de ce projet de thèse peuvent être facilement transposées pour la compréhension des mécanismes de résistances dans les mélanomes sous immunothérapies.

La compréhension de ces mécanismes et l'identification de facteurs de transcription clés a permis le développement de plusieurs thérapies dont l'objectif est une utilisation combinée aux thérapies ciblées (ex : *AXL* (Boshuizen et al., 2018), *SRC* (Ferguson et al., 2012) *PDGFR $\alpha$*  (Sabbatino et al., 2014)) de manière similaire à l'utilisation combinée des BRAFi/MEKi. Si ces molécules semblent présenter un intérêt thérapeutique et augmenteront potentiellement la

survie des patients, il semble difficile aujourd'hui d'imaginer une thérapie permettant l'éradication complète de toutes les populations de cellules tumorales, ne laissant aucune trace de maladie résiduelle. En effet si les études récentes ont décrit la diversité et la complexité des mélanomes, identifiant de nombreux états phénotypiques cellulaires pouvant coexister au sein d'une même tumeur, il est maintenant nécessaire d'intégrer ces résultats de façon globale. Ces études, même si elles ont largement contribué à l'amélioration récente de la compréhension des mécanismes cellulaires conduisant les résistances aux thérapies, présentent plusieurs défauts. D'une part, les études utilisant des modèles PDX ou analysant les données issues de patients sont souvent réalisées sur de petits effectifs, et ne sont donc pas représentatives de l'hétérogénéité existant entre les patients. D'autre part, la plupart de ces analyses se focalisent sur la quantification de l'expression des ARN messagers, or il est connu que cela ne reflète pas l'expression ou l'activité d'une protéine. C'est le cas pour le facteur de transcription impliqué durant ma thèse : le facteur de transcription AhR, pour qui le niveau d'expression ne corrèle pas avec son activité sachant qu'un ligand est nécessaire pour son activation. Ainsi, il me paraît nécessaire de coupler ces études à des analyses protéomiques de haut débit. L'intégration de toutes ces données permettra alors peut-être d'esquisser un schéma global de l'activité des cellules pendant la phase d'adaptation aux thérapies afin d'établir le meilleur traitement possible. On peut cependant supposer que les différents traitements conduiront probablement à des mécanismes de résistance plus ou moins rapides du fait de la plasticité et de l'adaptabilité des cellules de mélanomes.

Mais avant que cela ne soit possible, il reste important d'impliquer de nouveaux facteurs de transcription dans le contrôle de la plasticité cellulaire et plus précisément dans l'acquisition des propriétés invasives. C'est ce sur quoi se sont portés mes travaux de thèse, où j'ai cherché à impliquer le facteur de transcription AhR tout d'abord dans la régulation de gènes impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF, puis plus précisément dans la plasticité cellulaire et l'acquisition du phénotype invasif/indifférencié.

### AhR, nouveau régulateur des gènes de résistance

Le facteur de transcription AhR est un senseur environnemental appartenant à la famille des basic-helix-loop-helix (bHLH) / Per-Arnt-Sim (PAS). C'est le seul facteur de transcription de cette famille qui nécessite la fixation d'un ligand pour son activation. AhR peut ainsi être activé par un large spectre de molécules comme les polluants environnementaux exogènes (BaP, dioxines) mais aussi par des ligands endogènes (kynurenine, métabolites). En plus de ses nombreux rôles physiologiques participant à l'homéostasie cellulaire, AhR a dernièrement été

largement étudié pour son rôle dans la carcinogenèse, notamment dans le mélanome. L'objectif principal de ma thèse était donc de caractériser l'implication d'AhR dans le développement des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF, et plus précisément dans l'acquisition du phénotype invasif et indifférencié.

Si nous nous sommes intéressés au départ à ce facteur de transcription, c'est d'abord par l'observation de similitudes structurales entre les ligands caractérisés d'AhR et les BRAFi (structures majoritairement planes et aromatiques), ainsi que la ressemblance entre les effets cutanés induits par ces deux types de molécules, suggérant que les BRAFi pouvaient induire l'activation d'AhR. C'est ainsi que nous avons établi que les inhibiteurs de BRAF étaient en parallèle de leur rôle des ligands non canoniques d'AhR. L'activation d'AhR par un BRAFi induit l'expression d'un programme transcriptomique « pigmentation », associé à la sensibilité aux BRAFi. Ce résultat était surprenant, car nous attendions à ce qu'un tel effet off-target soit associé à une diminution de l'efficacité thérapeutique. Or nous montrons que c'est à l'inverse l'activation canonique d'AhR, similaire au programme induit par la TCDD (ligand agoniste), qui est associée à l'acquisition de la résistance aux BRAFi. Parmi les gènes que nous montrons être régulés par AhR, nous retrouvons des gènes clés comme *AXL*, *NRP1* et *EGFR*.

L'analyse de la signature transcriptomique canonique d'AhR (signature  $\alpha$ ) à partir de données de single cell démontre qu'AhR est exprimé et activé dans une petite sous-population de cellules avant traitement (Tirosh et al., 2016), ainsi que chez certains patients avant traitement (Akbari et al., 2015). Cette signature est également exprimée dans les lignées cellulaires « neural crest-like » et indifférenciées résistantes aux BRAFi (Tsoi et al., 2018). Ces résultats sont en accord avec les observations récentes selon lesquelles la signalisation AhR est impliquée dans la régulation de la population cellules souches, et notamment des cellules souches cancéreuses (Al-Dhfyhan et al., 2017; Liu et al., 2017; Tsai et al., 2015), population cellulaire hautement indifférenciée. Ainsi, l'activation canonique d'AhR pourrait favoriser l'acquisition d'un phénotype cellule souche, et donc une population NCSC qui d'après l'étude de Rambow et al. est responsable de l'émergence des cellules résistantes et donc des rechutes des patients (Rambow et al., 2018). Bien entendu, le mode d'activation précis d'AhR n'a pour l'instant pas clairement été établi du fait notamment de la très grande diversité de ligands. Le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans le contrôle transcriptionnel après induction des voies de signalisation activées par des facteurs extracellulaires. La voie du métabolisme du tryptophane (Trp) et de ses métabolites tels que la kynurénine (Kyn) peut représenter une source de ligand endogènes et canoniques d'AhR. La Kyn libérée via la tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO) par les cellules tumorales et l'environnement peut

favoriser la survie et le changement phénotypique des cellules tumorales après activation autocrine/paracrine d'AhR (Opitz et al., 2011). De plus, l'activation d'AhR par l'axe IDO/Kyn/AhR contribue à la dormance cellulaire des cellules « stem cell-like » dans le mélanome (Liu et al., 2018). La mélanine présente dans les cellules de mélanome ainsi que l'ensemble des intermédiaires de sa synthèse pourraient également constituer des ligands activateurs canoniques d'AhR. L'utilisation de modèles intégratifs tenant compte de l'environnement de la tumeur et des interactions cellulaires (kératinocytes, fibroblastes associés aux cellules cancéreuses (CAF), cellules immunitaires) devraient également permettre d'identifier quels sont les facteurs extracellulaires qui permettent l'activation d'AhR lors de l'acquisition de la résistance aux BRAFi.

Ces résultats nous ont initialement conduit à tester le potentiel thérapeutique de l'inhibition d'AhR. Nous avons testé de manière préliminaire les propriétés anti-tumorales d'un antagoniste d'AhR, le Resveratrol, dans un modèle de PDX. Malgré les bons résultats de cette expérience (le Resveratrol en combinaison avec BRAFi augmente la survie des souris PDX), les conditions expérimentales doivent être améliorées ainsi que testées en combinaison avec les thérapies actuelles BRAFi/MEKi. De plus, le choix du Resveratrol, bien que motivé par son utilisation clinique préalable, peut être discutable de par son manque de spécificité : bien qu'étant un antagoniste d'AhR reconnu (Casper et al., 1999; Revel et al., 2003), le Resveratrol ne lui est pas spécifique. Des études ont en effet démontré que les effets antinéoplasiques engendrés par le Resveratrol pouvaient être AhR-indépendants (Flores-Pérez and Elizondo, 2018) et passer notamment par la régulation de la voie PI3K/AKT (Chai et al., 2017; ZHANG et al., 2016).

Pour conclure, j'ai pu montrer dans la première partie de ma thèse (résultats I) que l'activation canonique d'AhR est impliquée dans l'établissement de la résistance par la régulation de l'expression d'un panel de gènes de résistance, et ce dans une sous-population cellulaire minoritaire émergente au cours du traitement par les BRAFi. Mais ce travail ne décrit que de manière statique un état moléculaire entre les cellules sensibles et résistantes aux BRAFi. Il ne permet donc pas de conclure sur le rôle d'AhR dans le contrôle du changement phénotypique et de la plasticité cellulaire du mélanome traité par les BRAFi (acquisition de la dédifférenciation). L'activation d'AhR est-elle une conséquence de l'émergence et l'enrichissement d'un clone résistant préexistant ou AhR participe-t-il activement à l'adaptation phénotypique des cellules vers un état de tolérance au traitement ? C'est ce à quoi nous nous sommes intéressés dans la seconde partie de la thèse (résultats II).



## AhR contrôle la plasticité phénotypique des cellules de mélanome

L'établissement de lignées cellulaires de mélanome humaines, sauvages ou invalidées pour AhR (CRISPR-Cas9), sensibles ou résistantes aux BRAFi, nous a permis de caractériser plus finement le rôle d'AhR dans l'acquisition de la résistance. Ainsi, l'absence d'expression d'AhR dans des lignées cellulaires résistantes aux BRAFi (donc indifférenciées et invasives) diminue de façon significative le potentiel invasif et migratoire des cellules, associé à un changement d'expression de programme transcriptomique.

De manière intéressante, nous démontrons également l'existence d'une balance d'expression entre les facteurs de transcription AhR et MITF. Ainsi, un niveau d'expression élevé d'AhR est associé à une faible expression de MITF et inversement. Cette balance entre les deux facteurs de transcription, respectivement associée au phénotype sensible ( $MITF^{high}/AhR^{low}$ ) ou au phénotype résistant ( $MITF^{low}/AhR^{high}$ ) est tout à fait comparable à celle communément établie entre MITF/AXL (Müller et al., 2014). La balance MITF/AhR pourrait cependant jouer un rôle plus large sur le changement phénotypique des cellules au sein de la tumeur, car l'expression d'AhR est moins restreinte que celle d'AXL qui n'est retrouvée que dans la sous-population invasive/dédifférenciée. Il serait intéressant de regarder si AXL n'est pas une cible directe des facteurs de transcription AhR et MITF et de voir si son niveau élevé pourrait être une conséquence de leur activité transcriptionnelle. D'autre part, nous avons pu montrer que l'inhibition chimique ou génétique d'AhR dans une lignée cellulaire résistante aux BRAFi restaure une expression forte de MITF, pouvant expliquer le retour à un état transcriptomique différencié et sensible. Un niveau d'expression faible d'AhR semble néanmoins nécessaire à la réactivation de MITF, alors que son absence totale dans les cellules SK28R KO ne permet pas la réactivation de son expression. Il nous reste à établir comment AhR influence le niveau protéique et l'activité de MITF. S'agit-il d'une régulation de l'expression (ARNm) de *MITF* par AhR ou bien d'une régulation post-traductionnelle ? En parallèle de son rôle de facteur de transcription, AhR joue un rôle dans la dégradation protéique des récepteurs aux stéroïdes par une activité d'E3 ligase (Ohtake et al., 2007). Dans la mesure où la stabilité de MITF est également régulée par le protéasome après différentes modifications post-traductionnelles (Hartman and Czyz, 2015), il est possible d'imaginer une telle régulation de la dégradation de MITF par AhR. Il serait également intéressant de voir quelles sont les conséquences transcriptionnelles de la perte de MITF à la fois dans les cellules résistantes avec un fort niveau d'AhR ou après invalidation d'AhR, dans le but d'identifier et de caractériser les cibles respectives des deux facteurs de transcription. En parallèle, une identification par

ChIPseq des cibles d'AhR devra être réalisée. Il est envisageable que les deux facteurs de transcription AhR et MITF partagent des cibles communes. Il est également possible qu'ils puissent partager les motifs de régulation de MITF (Mbox CATGTG) ou d'AhR (XRE GCGTG) comme précédemment montré pour le facteur de transcription USF1, de la même famille que MITF (Bacsi and Hankinson, 1996).

Notre étude ne nous permet pas en l'état de savoir si AhR favorise l'invasion et la dédifférenciation en régulant l'expression des gènes impliqués dans ces processus, ou bien si cette régulation transcriptomique est une conséquence de l'inhibition de l'expression de MITF en la présence d'AhR. Il faudrait également vérifier que l'augmentation de l'expression de MITF observée en absence d'AhR conduit à une reprogrammation des cellules vers un phénotypique différencié et prolifératif et donc sensible aux BRAFi.

### Le phénotype résistant/indifférencié est-il réversible ?

Le modèle d'acquisition de la résistance aux BRAFi exposé par Shaffer et al., soumet l'hypothèse de l'existence d'une population cellulaire « pré-résistante » exprimant un faible nombre de gènes de résistance/invasion. Cet état serait réversible du fait de la grande plasticité des cellules de mélanome. Au cours de la phase de tolérance au traitement, les cellules pré-résistantes s'adaptent en gagnant progressivement l'expression de nombreux gènes associés à la résistance et s'engageraient alors de façon définitive dans la dédifférenciation et l'invasion. On peut ainsi émettre l'hypothèse que l'expression et l'activation d'AhR dans un petit nombre de cellules avant traitement, entraînant l'expression de quelques gènes de la résistance, est un des paramètres définissant le stade de « pré-résistance ». Accompagnée de l'adaptation progressive et l'acquisition de l'expression d'autres marqueurs de l'invasion/dédifférenciation, cette activation constitutive d'AhR participe à l'acquisition de la résistance. Il serait donc intéressant de voir si l'induction de la signature AhR dans les cellules corrèle à la perte de la signature MITF. Ce point paraît particulièrement important dans la mesure où nous avons pu montrer que ce phénotype résistant/dédifférencié  $MITF^{low}/AhR^{high}$  est réversible en un phénotype sensible/différencié  $MITF^{high}/AhR^{low}$  après déplétion génétique (siRNA, CRISPR-Cas9) ou chimique (inhibiteur d'Hsp90) d'AhR.

Cette notion de réversibilité de l'état résistant est particulièrement importante. En effet avant traitement, certaines cellules seraient pré-résistantes. Si cet état est réversible, le traitement prolongé par les inhibiteurs de la voie des MAPK stabiliserait les cellules dans un état phénotypique résistant (Shaffer et al., 2017; Su et al., 2017) probablement par une

reprogrammation épigénétique. Ainsi, pouvoir prévoir et maîtriser cette réversibilité de l'état résistant des cellules tumorales est une priorité, afin de pouvoir adapter les thérapies par exemple avec un « drug holiday » (Das Thakur et al., 2013) ou congés médicamenteux (périodes de traitement entrecoupées de période sans thérapie). Ainsi, la modulation de l'activité d'AhR, en plus d'allonger la phase de tolérance au traitement, pourrait permettre dans un contexte de résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPK de ramener les cellules tumorales vers un état phénotypique plus différencié (MITF<sup>high</sup>) et plus sensible.

Au cours de ces deux études (résultats I et II), nous avons pu montrer l'intérêt d'inhiber soit l'activité transcriptionnelle d'AhR (antagoniste Resveratrol) ou de jouer sur son niveau protéique et sa biodisponibilité cellulaire (inhibiteur d'Hsp90) pour potentialiser la réponse aux BRAFi et empêcher l'émergence des cellules résistantes/invasives ou cour du traitement. Nous avons ensuite voulu évaluer le potentiel thérapeutique des flavonoïdes, molécules naturelles aux propriétés anti-oxydantes, pour leur rôle d'antagoniste d'AhR en combinaison des inhibiteurs de BRAF (résultats III).

### Une nouvelle cible thérapeutique ?

Au cours de ma thèse, j'ai pu valider l'intérêt d'AhR comme cible thérapeutique pour le traitement du mélanome métastatique. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des flavonoïdes pour leur propriétés antagonistes d'AhR. Ces molécules sont depuis longtemps étudiées pour leurs propriétés anti-oxydantes (Ginwala et al., 2019) et la prévention de certains cancers (Neuhouser, 2004), et de nombreuses études démontrent également leur potentiel antiprolifératif dans plusieurs modèles comme le cancer du poumon, du sein ou encore le mélanome (Khan and Mukhtar, 2015; Venturelli et al., 2016; Xu et al., 2018). Je me suis particulièrement intéressée à l'effet de deux flavonoïdes : l'apigénine et la chrysin. Ces deux molécules potentialisent l'efficacité des BRAFi, et sont également capables de re-sensibiliser les cellules résistantes. La validation de l'effet thérapeutique de l'apigénine *in vivo* est actuellement en cours dans le modèle d'œuf de poulet (Inovotion™).

Bien que prometteuse, l'utilisation de telles molécules chez l'homme reste un challenge. En effet les flavonoïdes doivent être administrés à des doses importantes, et doivent donc bénéficier d'une méthode d'extraction rapide et efficace, ce qui n'est pas le cas : les procédures sont coûteuses et le rendement est faible (Amawi et al., 2017). De plus, les propriétés pharmacocinétiques de ces molécules ne sont pas optimales car elles sont peu solubles et peu stables. Des techniques se sont récemment développées afin de pallier au manque de stabilité

et à la toxicité des molécules anti-cancéreuses, comme l'administration des molécules encapsulées au sein de nano-vecteurs (Wei et al., 2015). Cette technologie semble efficace dans le cas des flavonoïdes, notamment dans le traitement du cancer colorectal (Santos et al., 2013) et du mélanome (Carletto et al., 2016). Ces dernières années, les entreprises pharmaceutiques ont connu un gain d'intérêt pour le développement de molécules modulant l'activation d'AhR, comme Kyn Therapeutic™, se concentrant exclusivement sur la modulation de l'axe IDO/Kyn/AhR, ou encore Hercules Pharmaceuticals™ et Phenex Pharmaceuticals™ développant des molécules antagonistes d'AhR.

### Difficultés associées à la modulation de l'activité d'AhR

Ainsi, si AhR est aujourd'hui considéré comme une cible thérapeutique hautement intéressante, son activité doit être modulée avec précaution. En effet, les effets induits par l'activation ou l'inhibition d'AhR sont extrêmement dépendant du contexte (type de cancer, modèle d'étude, concentrations des ligands agonistes ou antagonistes) et la modulation de cette activité pourra donc agir sur le développement tumoral de façon positive et négative. C'est par exemple le cas pour le mélanome, où certaines équipes démontrent un rôle anti-tumoral de l'activation d'AhR alors qu'à l'inverse nous l'impliquons dans la progression tumorale et la résistance aux thérapies. Il est cependant à noter que les divergences observées dans les études fonctionnelles d'AhR peuvent refléter les différences importantes entre la forme murine et la forme humaine du récepteur, ainsi qu'une différence d'expression endogène. En effet bien que relativement conservé au cours de l'évolution, des différences existent entre les formes murine et humaine, notamment pour l'affinité de liaison à l'Hsp90, donc la stabilité de la protéine, et la régulation différentielle des gènes cibles (Forgacs et al., 2013). La majorité des études démontrant un rôle anti-tumoral d'AhR dans le mélanome ont été réalisées chez la souris, avec xénogreffe de cellules tumorales murines, pouvant expliquer la divergence avec nos observations chez l'homme.

Il est également nécessaire de garder en mémoire le double rôle que peut avoir AhR : dans certaines pathologies cutanées, les antagonistes et agonistes d'AhR agissent dans le même sens pour améliorer le traitement de la maladie (Haarmann-Stemann et al., 2015). Cette notion ajoute encore un niveau de complexité à l'utilisation d'antagonistes d'AhR dans le traitement du mélanome. AhR étant un senseur environnemental, la présence de ligands d'AhR au sein de l'environnement des patients pourra également influencer son activité. Par exemple, les polluants environnementaux comme les HAH et HAP exogènes pourront potentiellement perturber la modulation d'AhR, tout comme la production de ligands endogènes induite par

exemple par l'exposition aux rayons UV. Il pourra ainsi être recommandé en cas de traitement par un antagoniste d'AhR d'éviter une exposition aux UV ainsi que la consommation d'aliments riches en agonistes d'AhR.

## Conclusions

Nos travaux démontrent donc l'importance d'étudier avec attention le rôle du facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor dans la progression tumorale mais également dans la résistance aux thérapies antinéoplasiques. Si nos travaux ont été réalisés dans le mélanome, il est tout à fait possible d'imaginer des mécanismes cellulaires identiques dans d'autres modèles, par exemple dans le foie où AhR est hautement exprimé et fonctionnel (dû au métabolisme des xénobiotiques) et où les cellules semblent présenter une plasticité cellulaire conduisant à l'hétérogénéité tumorale (Jayachandran et al., 2016; Matak et al., 2018). Dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC), AhR a récemment été associé à la résistance aux inhibiteurs d'EGFR en réactivant les voies MAPK et PI3K/AKT via l'activation de la kinase Src (Ye et al., 2018). Il semblerait donc intéressant de cribler les molécules pour leurs capacités à lier et activer le facteur de transcription AhR avant leur validation thérapeutique. En effet AhR peut fixer de nombreux ligands aux structures variées, et des molécules capables d'activer AhR pourront potentiellement activer un programme transcriptionnel de dédifférenciation cellulaire et d'invasion. Suivant la démarche inverse, il serait également intéressant de déterminer si les ligands d'AhR peuvent cibler d'autres facteurs cibles : si les BRAFi sont capables d'activer AhR, est ce que les ligands d'AhR sont capables d'activer BRAF ? Enfin, un criblage moléculaire à grande échelle permettrait d'identifier des antagonistes puissants d'AhR (plus puissants que les flavonoïdes) pouvant être utilisés en clinique.

Pour conclure, AhR représente une cible thérapeutique intéressante de par son implication dans les mécanismes d'invasion et de résistance aux thérapies. AhR est impliqué dans de nombreux processus biologique, notamment la régulation de la tolérance immunitaire et la détoxification des xénobiotiques, son activité doit donc être modulée avec attention. Malgré cela, l'activité d'AhR et l'utilisation d'antagonistes seront sûrement évaluées dans les années à venir pour leur potentiel pronostic et thérapeutique dans différents cancers. Mais la route est encore longue car aucun antagoniste d'AhR n'a de nos jours été testé cliniquement chez l'homme en combinaison d'autres thérapies antinéoplasiques. Enfin, les mécanismes cellulaires que nous avons mis en évidence dans le mélanome peuvent facilement être transposables à d'autres cancers.

# BIBLIOGRAPHIE



# BIBLIOGRAPHIE

- Akbani, R., Akdemir, K.C., Aksoy, B.A., Albert, M., Ally, A., Amin, S.B., Arachchi, H., Arora, A., Auman, J.T., Ayala, B., et al. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161, 1681–1696.
- Al-Dhfyhan, A., Alhoshani, A., and Korashy, H.M. (2017). Aryl hydrocarbon receptor/cytochrome P450 1A1 pathway mediates breast cancer stem cells expansion through PTEN inhibition and  $\beta$ -Catenin and Akt activation. *Mol. Cancer* 16, 14.
- Van Allen, E.M., Wagle, N., Sucker, A., Treacy, D.J., Johannessen, C.M., Goetz, E.M., Place, C.S., Taylor-Weiner, A., Whittaker, S., Kryukov, G. V., et al. (2014). The Genetic Landscape of Clinical Resistance to RAF Inhibition in Metastatic Melanoma. *Cancer Discov.* 4, 94–109.
- Amawi, H., Ashby, C.R., Jr., and Tiwari, A.K. (2017). Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting? *Chin. J. Cancer* 36.
- Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M.L., Pettersson, S., Hanberg, A., and Poellinger, L. (2002). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9990–9995.
- Aoude, L.G., Wadt, K.A.W., Pritchard, A.L., and Hayward, N.K. (2015). Genetics of familial melanoma: 20 years after *CDKN2A*. *Pigment Cell Melanoma Res.* 28, 148–160.
- Arozarena, I., and Wellbrock, C. (2017). Overcoming resistance to BRAF inhibitors. *Ann. Transl. Med.* 5, 387–387.
- Arozarena, I., and Wellbrock, C. (2019). Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer*.
- Avril, M.F., Aamdal, S., Grob, J.J., Hauschild, A., Mohr, P., Bonerandi, J.J., Weichenthal, M., Neuber, K., Bieber, T., Gilde, K., et al. (2004). Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J. Clin. Oncol.* 22, 1118–1125.
- Bacsi, S.G., and Hankinson, O. (1996). Functional characterization of DNA-binding domains of the subunits of the heterodimeric aryl hydrocarbon receptor complex imputing novel and canonical basic helix-loop-helix protein-DNA interactions. *J. Biol. Chem.* 271, 8843–8850.
- Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., et al. (2009). Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J. Clin. Oncol.* 27, 6199–6206.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehár, J., Kryukov, G. V., Sonkin, D., et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603–307.
- Basile, K.J., Abel, E. V, and Aplin, A.E. (2012). Adaptive upregulation of FOXD3 and resistance to PLX4032/4720-induced cell death in mutant B-RAF melanoma cells. *Oncogene* 31, 2471–2479.
- Bastian, B.C. (2014). The Molecular Pathology of Melanoma: An Integrated Taxonomy of Melanocytic Neoplasia. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 9, 239–271.
- Bauer, J., and Bastian, B.C. (2006). Distinguishing melanocytic nevi from melanoma by DNA copy number changes: comparative genomic hybridization as a research and diagnostic tool. *Dermatol. Ther.* 19, 40–49.



- Bersten, D.C., Sullivan, A.E., Peet, D.J., and Whitelaw, M.L. (2013). bHLH–PAS proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 827–841.
- Berwick, M., Buller, D.B., Cust, A.E., Gallagher, R., Lee, T.K., Meyskens, F.L., Pandey, S., Thomas, N.E., Veierød, M.B., and Ward, S. V. (2016). Melanoma Epidemiology and Prevention.
- Bessede, A., Gargaro, M., Pallotta, M.T., Matino, D., Servillo, G., Brunacci, C., Bicciato, S., Mazza, E.M.C., Macchiarulo, A., Vacca, C., et al. (2014). Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* *511*, 184–190.
- Birnberg, T., Kaye, J., Fowler, K., Weiner, B., Caballero, I., Barash, S., Raymond, E., Ben-Eliezer, I., Fishbein, I., Orbach, A., et al. (2017). Laquinimod targets the aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway in periphery and brains of naïve and EAE mice (P2.365). *Neurology* *88*.
- Bittner, M., Meltzer, P., Chen, Y., Jiang, Y., Seftor, E., Hendrix, M., Radmacher, M., Simon, R., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., et al. (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* *406*, 536–540.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P.N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Zhang, Y., Habets, G., et al. (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* *467*, 596–599.
- Bonner, T., O'Brien, S., Nash, W., Rapp, U., Morton, C., and Leder, P. (1984). The human homologs of the raf (mil) oncogene are located on human chromosomes 3 and 4. *Science* (80-). *223*, 71–74.
- Boshuizen, J., Koopman, L.A., Krijgsman, O., Shahrabi, A., van den Heuvel, E.G., Ligtenberg, M.A., Vredevoogd, D.W., Kemper, K., Kuilman, T., Song, J.-Y., et al. (2018). Cooperative targeting of melanoma heterogeneity with an AXL antibody-drug conjugate and BRAF/MEK inhibitors. *Nat. Med.* *24*, 203–212.
- Boussemart, L., Girault, I., Malka-Mahieu, H., Mateus, C., Routier, E., Rubington, M., Kamsu-Kom, N., Thomas, M., Tomasic, G., Agoussi, S., et al. (2016). Secondary tumors arising in patients undergoing BRAF inhibitor therapy exhibit increased BRAF-CRAF heterodimerization. *Cancer Res.* *76*, 1476–1485.
- Bucheit, A.D., Chen, G., Siroy, A., Tetzlaff, M., Broaddus, R., Milton, D., Fox, P., Bassett, R., Hwu, P., Gershenwald, J.E., et al. (2014). Complete loss of PTEN protein expression correlates with shorter time to brain metastasis and survival in stage IIIB/C melanoma patients with BRAFV600 mutations. *Clin. Cancer Res.* *20*, 5527–5536.
- Cadet, J., and Douki, T. (2018). Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochem. Photobiol. Sci.* *17*, 1816–1841.
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., et al. (2013). A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* *24*, 466–480.
- Carletto, B., Berton, J., Ferreira, T.N., Dalmolin, L.F., Paludo, K.S., Mainardes, R.M., Farago, P.V., and Favero, G.M. (2016). Resveratrol-loaded nanocapsules inhibit murine melanoma tumor growth. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* *144*, 65–72.
- Casper, R.F., Quesne, M., Rogers, I.M., Shirota, T., Jolivet, A., Milgrom, E., and Savouret, J.F. (1999). Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol. Pharmacol.* *56*, 784–790.

- Chai, R., Fu, H., Zheng, Z., Liu, T., Ji, S., and Li, G. (2017). Resveratrol inhibits proliferation and migration through SIRT1 mediated post-translational modification of PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Med. Rep.* *16*, 8037–8044.
- Chalmers, Z.R., Connelly, C.F., Fabrizio, D., Gay, L., Ali, S.M., Ennis, R., Schrock, A., Campbell, B., Shlien, A., Chmielecki, J., et al. (2017). Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* *9*, 34.
- Chapman, P.B., Einhorn, L.H., Meyers, M.L., Saxman, S., Destro, A.N., Panageas, K.S., Begg, C.B., Agarwala, S.S., Schuchter, L.M., Ernstoff, M.S., et al. (1999). Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* *17*, 2745–2751.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., et al. (2011a). Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.* *364*, 2507–2516.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., et al. (2011b). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* *364*, 2507–2516.
- Cheong, J.E., and Sun, L. (2018). Targeting the IDO1/TDO2–KYN–AhR Pathway for Cancer Immunotherapy – Challenges and Opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* *39*, 307–325.
- Cichorek, M., Wachulska, M., and Stasiewicz, A. (2013). Heterogeneity of neural crest-derived melanocytes. *Cent. Eur. J. Biol.* *8*, 315–330.
- Clark, W.H., Elder, D.E., and Van Horn, M. (1986). The biological forms of malignant melanoma. *Hum. Pathol.* *17*.
- Contador-Troca, M., Alvarez-Barrientos, A., Barrasa, E., Rico-Leo, E.M., Catalina-Fernández, I., Menacho-Márquez, M., Bustelo, X.R., García-Borrón, J.C., Gómez-Durán, A., Sáenz-Santamaría, J., et al. (2013). The dioxin receptor has tumor suppressor activity in melanoma growth and metastasis. *Carcinogenesis* *34*, 2683–2693.
- Contador-Troca, M., Alvarez-Barrientos, A., Merino, J.M., Morales-Hernández, A., Rodríguez, M.I., Rey-Barroso, J., Barrasa, E., Cerezo-Guisado, M.I., Catalina-Fernández, I., Sáenz-Santamaría, J., et al. (2015). Dioxin receptor regulates aldehyde dehydrogenase to block melanoma tumorigenesis and metastasis. *Mol. Cancer* *14*, 148.
- Corcoran, R.B., Dias-Santagata, D., Bergethon, K., Iafrate, A.J., Settleman, J., and Engelman, J.A. (2010). BRAF Gene Amplification Can Promote Acquired Resistance to MEK Inhibitors in Cancer Cells Harboring the BRAF V600E Mutation. *Sci. Signal.* *3*, ra84–ra84.
- Corcoran, R.B., André, T., Atreya, C.E., Schellens, J.H.M., Yoshino, T., Bendell, J.C., Hollebecque, A., McRee, A.J., Siena, S., Middleton, G., et al. (2018). Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with BRAFV600E-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* *8*, 428–443.
- Cui, R., Widlund, H.R., Feige, E., Lin, J.Y., Wilensky, D.L., Igras, V.E., D’Orazio, J., Fung, C.Y., Schanbacher, C.F., Granter, S.R., et al. (2007). Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation. *Cell* *128*, 853–864.
- D’Amato, N.C., Rogers, T.J., Gordon, M.A., Greene, L.I., Cochrane, D.R., Spoelstra, N.S., Nemkov, T.G., D’Alessandro, A., Hansen, K.C., and Richer, J.K. (2015). A TDO2-AhR Signaling Axis Facilitates Anoikis Resistance and Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* *75*, 4651–4664.

- Dang, D.T., Pevsner, J., and Yang, V.W. (2000). The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *32*, 1103–1121.
- Daud, A., Gill, J., Kamra, S., Chen, L., and Ahuja, A. (2017). Indirect treatment comparison of dabrafenib plus trametinib versus vemurafenib plus cobimetinib in previously untreated metastatic melanoma patients. *J. Hematol. Oncol.* *10*, 3.
- Davarinos, N.A., and Pollenz, R.S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J. Biol. Chem.* *274*, 28708–28715.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* *417*, 949–954.
- Denison, M.S., and Faber, S.C. (2017). And Now for Something Completely Different: Diversity in Ligand-Dependent Activation of Ah Receptor Responses. *Curr. Opin. Toxicol.* *2*, 124–131.
- Denison, M.S., and Heath-Pagliuso, S. (1998). The Ah receptor: a regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *61*, 557–568.
- Denison, M.S., and Nagy, S.R. (2003). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *43*, 309–334.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* *26*, 3279–3290.
- Dietrich, P., Kuphal, S., Spruss, T., Hellerbrand, C., and Bosserhoff, A.K. (2018). Wild-type KRAS is a novel therapeutic target for melanoma contributing to primary and acquired resistance to BRAF inhibition. *Oncogene* *37*, 897–911.
- Dong, B., Cheng, W., Li, W., Zheng, J., Wu, D., Matsumura, F., and Vogel, C.F.A. (2011). FRET analysis of protein tyrosine kinase c-Src activation mediated via aryl hydrocarbon receptor. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* *1810*, 427–431.
- Duan, Z., Li, Y., and Li, L. (2018). Promoting epithelial-to-mesenchymal transition by d-kynurenine via activating aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Cell. Biochem.* *448*, 165–173.
- Dummer, R., Ascierto, P.A., Gogas, H.J., Arance, A., Mandala, M., Liskay, G., Garbe, C., Schadendorf, D., Krajsova, I., Gutzmer, R., et al. (2018a). Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *19*, 1315–1327.
- Dummer, R., Ascierto, P.A., Gogas, H.J., Arance, A., Mandala, M., Liskay, G., Garbe, C., Schadendorf, D., Krajsova, I., Gutzmer, R., et al. (2018b). Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *19*, 603–615.
- Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 836–848.
- Dutton-Regester, K., Kakavand, H., Aoude, L.G., Stark, M.S., Gartside, M.G., Johansson, P., O'Connor, L., Lanagan, C., Tembe, V., Pupo, G.M., et al. (2013). Melanomas of unknown primary have a mutation profile consistent with cutaneous sun-exposed melanoma. *Pigment*

Cell Melanoma Res. 26, 852–860.

Eggermont, A.M., and Kirkwood, J.M. (2004). Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur. J. Cancer* 40, 1825–1836.

Emery, C.M., Vijayendran, K.G., Zipser, M.C., Sawyer, A.M., Niu, L., Kim, J.J., Hatton, C., Chopra, R., Oberholzer, P.A., Karpova, M.B., et al. (2009). MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 20411–20416.

Erlejman, A.G., Lagadari, M., Toneatto, J., Piwien-Pilipuk, G., and Galigniana, M.D. (2014). Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1839, 71–87.

Esser, C., Bargen, I., Weighardt, H., Haarmann-Stemmann, T., and Krutmann, J. (2013). Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Semin. Immunopathol.* 35, 677–691.

Fan, Y., Boivin, G.P., Knudsen, E.S., Nebert, D.W., Xia, Y., and Puga, A. (2010). The Aryl Hydrocarbon Receptor Functions as a Tumor Suppressor of Liver Carcinogenesis. *Cancer Res.* 70, 212–220.

Fedorenko, I. V, Wargo, J.A., Flaherty, K.T., Messina, J.L., and Smalley, K.S.M. (2015). BRAF Inhibition Generates a Host-Tumor Niche that Mediates Therapeutic Escape. *J. Invest. Dermatol.* 135, 3115–3124.

Ferguson, J., Arozarena, I., Ehrhardt, M., and Wellbrock, C. (2012). Combination of MEK and SRC inhibition suppresses melanoma cell growth and invasion. *Oncogene* 32, 86.

Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1996). Aryl-hydrocarbon Receptor-Deficient Mice Are Resistant to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Induced Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 173–179.

Flaherty, K.T., Redlinger, M., Schuchter, L.M., Lathia, C.D., Weber, B.L., and O'Dwyer, P.J. (2005). Phase I/II, pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of BAY 43–9006 alone in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 23, 3037–3037.

Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., et al. (2010). Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 809–819.

Flaherty, K.T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L. V., Hassel, J.C., Rutkowski, P., Mohr, P., et al. (2012). Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 367, 107–114.

Flaherty, K.T., Lee, S.J., Zhao, F., Schuchter, L.M., Flaherty, L., Kefford, R., Atkins, M.B., Leming, P., and Kirkwood, J.M. (2013). Phase III trial of carboplatin and paclitaxel with or without sorafenib in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 31, 373–379.

Flores-Pérez, A., and Elizondo, G. (2018). Apoptosis induction and inhibition of HeLa cell proliferation by alpha-naphthoflavone and resveratrol are aryl hydrocarbon receptor-independent. *Chem. Biol. Interact.* 281, 98–105.

Forgacs, A.L., Dere, E., Angrish, M.M., and Zacharewski, T.R. (2013). Comparative analysis of temporal and dose-dependent TCDD-elicited gene expression in human, mouse, and rat primary hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 133, 54–66.

Fox, R.I., Herrmann, M.L., Frangou, C.G., Wahl, G.M., Morris, R.E., Strand, V., and Kirschbaum, B.J. (1999). Mechanism of Action for Leflunomide in Rheumatoid Arthritis. *Clin. Immunol.* 93, 198–208.

- Fritz, W.A., Lin, T.-M., Cardiff, R.D., and Peterson, R.E. (2006). The aryl hydrocarbon receptor inhibits prostate carcinogenesis in TRAMP mice. *Carcinogenesis* 28, 497–505.
- Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S., and Hankinson, O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 29270–29278.
- Funatake, C.J., Marshall, N.B., Steppan, L.B., Mourich, D. V., and Kerkvliet, N.I. (2005). Cutting Edge: Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Generates a Population of CD4+CD25+ Cells with Characteristics of Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 175, 4184–4188.
- Gençler, B., and Gönül, M. (2016). Cutaneous side effects of BRAF inhibitors in advanced melanoma: Review of the literature. *Dermatol. Res. Pract.* 2016, 3–8.
- Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D.I., Jain, P., and Khan, Z.K. (2019). Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 8, 35.
- Girotti, M.R., and Marais, R. (2013). Déjà Vu: EGF Receptors Drive Resistance to BRAF Inhibitors. *Cancer Discov.* 3, 487–490.
- Goding, C.R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.* 14, 1712–1728.
- Goetz, E.M., Ghandi, M., Treacy, D.J., Wagle, N., and Garraway, L.A. (2014). ERK Mutations Confer Resistance to Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Inhibitors. *Cancer Res.* 74, 7079–7089.
- Gramatzki, D., Pantazis, G., Schittenhelm, J., Tabatabai, G., Köhle, C., Wick, W., Schwarz, M., Weller, M., and Tritzschler, I. (2009). Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene* 28, 2593–2605.
- Gu, Y.-Z., Hogenesch, J.B., and Bradfield, C.A. (2000). The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 519–561.
- Gutiérrez-Vázquez, C., and Quintana, F.J. (2018). Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* 48, 19–33.
- Haarmann-Stemann, T., Esser, C., and Krutmann, J. (2015). The Janus-Faced Role of Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling in the Skin: Consequences for Prevention and Treatment of Skin Disorders. *J. Invest. Dermatol.* 135, 2572–2576.
- Hartman, M.L., and Czyz, M. (2015). MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 1249–1260.
- Hauschild, A., Agarwala, S.S., Trefzer, U., Hogg, D., Robert, C., Hersey, P., Eggermont, A., Grabbe, S., Gonzalez, R., Gille, J., et al. (2009). Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 2823–2830.
- Hauschild, A., Grob, J.-J., Demidov, L. V, Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Miller, W.H., Kaempgen, E., et al. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 380, 358–365.
- Hodi, F.S., O’Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711–723.

- Hodi, F.S., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.-J., Rutkowski, P., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., et al. (2018). Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* *19*, 1480–1492.
- Hoek, K.S., Eichhoff, O.M., Schlegel, N.C., Dobbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., and Dummer, R. (2008). In vivo Switching of Human Melanoma Cells between Proliferative and Invasive States. *Cancer Res.* *68*, 650–656.
- Holderfield, M., Deuker, M.M., McCormick, F., and McMahon, M. (2014). Targeting RAF kinases for melanoma and beyond. *Nat. Publ. Gr.* *14*, 455–467.
- Huang, G., and Elferink, C.J. (2012). A Novel Nonconsensus Xenobiotic Response Element Capable of Mediating Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Gene Expression. *Mol. Pharmacol.* *65*, 461–469.
- Hugo, W., Shi, H., Sun, L., Piva, M., Song, C., Kong, X., Moriceau, G., Hong, A., Dahlman, K.B., Johnson, D.B., et al. (2015). Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell* *162*, 1271–1285.
- Ikuta, T., Kobayashi, Y., Kitazawa, M., Shiizaki, K., Itano, N., Noda, T., Pettersson, S., Poellinger, L., Fujii-Kuriyama, Y., Taniguchi, S., et al. (2013). ASC-associated inflammation promotes cecal tumorigenesis in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Carcinogenesis* *34*, 1620–1627.
- Jayachandran, A., Dhungel, B., and Steel, J.C. (2016). Epithelial-to-mesenchymal plasticity of cancer stem cells: therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. *J. Hematol. Oncol.* *9*, 74.
- Ji, Z., Erin Chen, Y., Kumar, R., Taylor, M., Jenny Njauw, C.N., Miao, B., Frederick, D.T., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., J?nsson, G., et al. (2015). MITF modulates therapeutic resistance through EGFR signaling. *J. Invest. Dermatol.* *135*, 1863–1872.
- Jin, U.-H., Lee, S.-O., Pfent, C., and Safe, S. (2014). The aryl hydrocarbon receptor ligand omeprazole inhibits breast cancer cell invasion and metastasis. *BMC Cancer* *14*, 498.
- Jin, U.-H., Kim, S.-B., and Safe, S. (2015). Omeprazole Inhibits Pancreatic Cancer Cell Invasion through a Nongenomic Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway. *Chem. Res. Toxicol.* *28*, 907–918.
- Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L.A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., et al. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* *468*, 968–972.
- Johannessen, C.M., Johnson, L.A., Piccioni, F., and Townes, A. (2013). A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *504*, 138–142.
- Karoulia, Z., Wu, Y., Ahmed, T.A., Xin, Q., Bollard, J., Krepler, C., Wu, X., Zhang, C., Bollag, G., Herlyn, M., et al. (2016). An integrated model of RAF inhibitor action predicts inhibitor activity against oncogenic BRAF signaling. *Cancer Cell* *30*, 485–498.
- Karoulia, Z., Gavathiotis, E., and Poulidakos, P.I. (2017). New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. *Nat. Rev. Cancer.*
- Kawajiri, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (2007). Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* *464*, 207–212.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., and Pongratz, I. (1999). Evidence That the Co-chaperone p23 Regulates Ligand Responsiveness of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor. *J. Biol. Chem.*

274, 13519–13524.

Kefford, R., Arkenau, H., Brown, M.P., Millward, M., Infante, J.R., Long, G. V., Ouellet, D., Curtis, M., Lebowitz, P.F., and Falchook, G.S. (2010). Phase I/II study of GSK2118436, a selective inhibitor of oncogenic mutant BRAF kinase, in patients with metastatic melanoma and other solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 28, 8503–8503.

Khan, N., and Mukhtar, H. (2015). Dietary agents for prevention and treatment of lung cancer. *Cancer Lett.* 359, 155–164.

Konieczkowski, D.J., Johannessen, C.M., Abudayyeh, O., Kim, J.W., Cooper, Z.A., Piris, A., Frederick, D.T., Barzily-Rokni, M., Straussman, R., Haq, R., et al. (2014). A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov.* 4, 816–827.

Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B.H., Evans, P., Bacchiocchi, A., Mccusker, J.P., Cheng, E., Davis, M.J., Goh, G., Choi, M., et al. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *44*.

Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., and Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim. Open* 7, 1–9.

Larkin, J. (2014). Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* 371, 1867–1876.

Larkin, J., Ascierto, P.A., Dréno, B., Atkinson, V., Liszkay, G., Maio, M., Mandalà, M., Demidov, L., Stroyakovskiy, D., Thomas, L., et al. (2014). Combined Vemurafenib and Cobimetinib in *BRAF* -Mutated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 371, 1867–1876.

Larue, L., Kumasaka, M., and Goding, C.R. (2003). B-Catenin in the Melanocyte Lineage. *Pigment Cell Res.* 16, 312–317.

Latonen, L., Taya, Y., and Laiho, M. (2001). UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene* 20, 6784–6793.

Li, F.Z., Dhillon, A.S., Anderson, R.L., McArthur, G., and Ferrao, P.T. (2015). Phenotype Switching in Melanoma: Implications for Progression and Therapy. *Front. Oncol.* 5, 1–7.

Lin, J.Y., and Fisher, D.E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445, 843–850.

Liu, Y., Liang, X., Yin, X., Lv, J., Tang, K., Ma, J., Ji, T., Zhang, H., Dong, W., Jin, X., et al. (2017). Blockade of IDO-kynurenine-AhR metabolic circuitry abrogates IFN- $\gamma$ -induced immunologic dormancy of tumor-repopulating cells. *Nat. Commun.* 8, 1–15.

Liu, Y., Lv, J., Liu, J., Liang, X., Jin, X., Xie, J., Zhang, L., Chen, D., Fiskesund, R., Tang, K., et al. (2018). STAT3/p53 pathway activation disrupts IFN- $\beta$ -induced dormancy in tumor-repopulating cells. *J. Clin. Invest.* 128, 1057–1073.

Loaiza-Pérez, A.I., Kenney, S., Boswell, J., Hollingshead, M., Alley, M.C., Hose, C., Ciolino, H.P., Yeh, G.C., Trepel, J.B., Vistica, D.T., et al. (2004). Aryl hydrocarbon receptor activation of an antitumor aminoflavone: Basis of selective toxicity for MCF-7 breast tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 3, 715–725.

Luecke, S., Backlund, M., Jux, B., Esser, C., Krutmann, J., and Rannug, A. (2010). The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23, 828–833.

- Lusska, A., Shen, E., and Whitlock, J.P. (1993). Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. Analysis of six bona fide DNA-binding sites for the liganded Ah receptor. *J. Biol. Chem.* *268*, 6575–6580.
- Lyons, J.F., Wilhelm, S., Hibner, B., and Bollag, G. (2001). Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocr. Relat. Cancer* *8*, 219–225.
- Matak, A., Lahiri, P., Ford, E., Pabst, D., Kashofer, K., Stellas, D., Thanos, D., and Zatloukal, K. (2018). Stochastic phenotype switching leads to intratumor heterogeneity in human liver cancer. *Hepatology* *68*, 933–948.
- McGuire, J., Okamoto, K., Whitelaw, M.L., Tanaka, H., and Poellinger, L. (2001). Definition of a Dioxin Receptor Mutant That Is a Constitutive Activator of Transcription. *J. Biol. Chem.* *276*, 41841–41849.
- Melero, I., Hervas-Stubbs, S., Glennie, M., Pardoll, D.M., and Chen, L. (2007). Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 95.
- Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Heuvel, J.P. Vanden, and Perdew, G.H. (1998). Hepatitis B Virus X-Associated Protein 2 Is a Subunit of the Unliganded Aryl Hydrocarbon Receptor Core Complex and Exhibits Transcriptional Enhancer Activity. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 978–988.
- Miao, B., Ji, Z., Tan, L., Taylor, M., Zhang, J., Choi, H.G., Frederick, D.T., Kumar, R., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., et al. (2015). EPHA2 Is a Mediator of Vemurafenib Resistance and a Novel Therapeutic Target in Melanoma. *Cancer Discov.* *5*, 274–287.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Majoor, M., Shay, J.W., Mooi, W.J., Kuilman, T., Horst, C.M.A.M. Van Der, and Peeper, D.S. (2005). BRAF E600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* *436*.
- Middleton, M.R., Grob, J.J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Seiter, S., Gore, M., Aamdal, S., Cebon, J., Coates, A., et al. (2000). Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* *18*, 158–166.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* *13*, 20–25.
- Mort, R.L., Jackson, I.J., and Patton, E.E. (2015). The melanocyte lineage in development and disease. *Development* *142*, 620–632.
- Müller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., Kong, X., Possik, P.A., Cornelissen-Steijger, P.D.M., Geukes Foppen, M.H., et al. (2014). Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat. Commun.* *5*, 5712.
- Murray, I.A., Patterson, A.D., and Perdew, G.H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 801–814.
- Nakamura, M., Ueda, Y., Hayashi, M., Kato, H., Furuhashi, T., and Morita, A. (2013). Tobacco smoke-induced skin pigmentation is mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Exp. Dermatol.* *22*, 556–558.
- Narasimhan, S., Stanford Zulick, E., Novikov, O., Parks, A.J., Schlezinger, J.J., Wang, Z., Laroche, F., Feng, H., Mulas, F., Monti, S., et al. (2018). Towards Resolving the Pro- and Anti-Tumor Effects of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.-K., Attar, N., Sazegar, H., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* *468*, 973–977.



- Neuhouser, M.L. (2004). Review: Dietary Flavonoids and Cancer Risk: Evidence From Human Population Studies. *Nutr. Cancer* 50, 1–7.
- Niedzwiecki, A., Roomi, M., Kalinovsky, T., and Rath, M. (2016). Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients* 8, 552.
- Novikov, O., Wang, Z., Stanford, E.A., Parks, A.J., Ramirez-Cardenas, A., Landesman, E., Laklouk, I., Sarita-Reyes, C., Gusenleitner, D., Li, A., et al. (2016). An Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Amplification Loop That Enforces Cell Migration in ER-/PR-/Her2-Human Breast Cancer Cells. *Mol. Pharmacol.* 90, 674–688.
- O'Donnell, E.F., Saili, K.S., Koch, D.C., Kopparapu, P.R., Farrer, D., Bisson, W.H., Mathew, L.K., Sengupta, S., Kerkvliet, N.I., Tanguay, R.L., et al. (2010). The Anti-Inflammatory Drug Leflunomide Is an Agonist of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *PLoS One* 5, e13128.
- O'Donnell, E.F., Kopparapu, P.R., Koch, D.C., Jang, H.S., Phillips, J.L., Tanguay, R.L., Kerkvliet, N.I., and Kolluri, S.K. (2012). The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Leflunomide-Induced Growth Inhibition of Melanoma Cells. *PLoS One* 7, e40926.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., et al. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550.
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., et al. (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562–566.
- Opitz, C.A., Litzemberger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., et al. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197–203.
- Pal, H.C., Hunt, K.M., Diamond, A., Elmets, C.A., and Afaq, F. (2016). Phytochemicals for the Management of Melanoma. *Mini Rev. Med. Chem.* 16, 953–979.
- Pearlman, R.L., Montes de Oca, M.K., Pal, H.C., and Afaq, F. (2017). Potential therapeutic targets of epithelial-mesenchymal transition in melanoma. *Cancer Lett.* 391, 125–140.
- Perdew, G.H. (1988). THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Association of the Ah Receptor with the 90-kDa Heat Shock Protein\*. 263, 13802–13806.
- Poland, A., Clover, E., Kende, A., DeCamp, M., and Giandomenico, C. (1976). 3,4,3',4'-Tetrachloro Azoxybenzene and Azobenzene: Potent Inducers of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase. *Science* (80-. ). 4–7.
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., et al. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* 33, 19–20.
- Poulikakos, P.I. (2012). Abnormal Splicing of Mutant BRAF Drives RAF Inhibitor Resistance. *Cancer Discov.* 2, 11.2-11.
- Poulikakos, P.I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K.M., and Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464, 427–430.
- Poynter, J.N., Elder, J.T., Fullen, D.R., Nair, R.P., Soengas, M.S., Johnson, T.M., Redman, B., Thomas, N.E., and Gruber, S.B. (2006). BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res.* 16, 267–273.

- Prahallad, A., Sun, C., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Salazar, R., Zecchin, D., Beijersbergen, R.L., Bardelli, A., and Bernards, R. (2012). Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483, 100–103.
- Pratilas, C.A., and Solit, D.B. (2010). Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway: Physiological Feedback and Drug Response. *Clin. Cancer Res.* 16, 3329–3334.
- Quevedo, W.C., Fitzpatrick, T.B., Pathak, M.A., and Jimbow, K. (1975). Role of light in human skin color variation. *Am. J. Phys. Anthropol.* 43, 393–408.
- Quintana, F.J., Basso, A.S., Iglesias, A.H., Korn, T., Farez, M.F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2008). Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65–71.
- Quintana, F.J., Murugaiyan, G., Farez, M.F., Mitsdoerffer, M., Tukpah, A.-M., Burns, E.J., and Weiner, H.L. (2010). An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 20768–20773.
- Rambow, F., Rogiers, A., Marin-Bejar, O., Aibar, S., Femel, J., Dewaele, M., Karras, P., Brown, D., Chang, Y.H., Debiec-Rychter, M., et al. (2018). Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* 1–13.
- Rapp, U.R., Goldsborough, M.D., Mark, G.E., Bonner, T.I., Groffen, J., Reynolds, F.H., and Stephenson, J.R. (1983). Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 4218–4222.
- Revel, A., Raanani, H., Younglai, E., Xu, J., Rogers, I., Han, R., Savouret, J.-F., and Casper, R.F. (2003). Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. *J. Appl. Toxicol.* 23, 255–261.
- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O’Day, S., Weber, J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.-F., Testori, A., Grob, J.-J., et al. (2011). Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 364, 2517–2526.
- Robert, C., Karaszewska, B., Schachter, J., Rutkowski, P., Mackiewicz, A., Stroiakovski, D., Lichinitser, M., Dummer, R., Grange, F., Mortier, L., et al. (2015). Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *N. Engl. J. Med.* 372, 30–39.
- Roh, M.R., Eliades, P., Gupta, S., and Tsao, H. (2015). Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res.* 28, 661–672.
- Rotte, A. (2019). Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38, 255.
- Sabbatino, F., Wang, Y., Wang, X., Flaherty, K.T., Yu, L., Pepin, D., Scognamiglio, G., Pepe, S., Kirkwood, J.M., Cooper, Z.A., et al. (2014). PDGFR $\alpha$  up-regulation mediated by sonic hedgehog pathway activation leads to BRAF inhibitor resistance in melanoma cells with BRAF mutation. *Oncotarget* 5, 1926–1941.
- Salama, A.K.S., and Kim, K.B. (2013). Trametinib (GSK1120212) in the treatment of melanoma. *Expert Opin. Pharmacother.* 14, 619–627.
- Santos, I.S., Ponte, B.M., Boonme, P., Silva, A.M., and Souto, E.B. (2013). Nanoencapsulation of polyphenols for protective effect against colon–rectal cancer. *Biotechnol. Adv.* 31, 514–523.
- Shaffer, S.M., Dunagin, M.C., Torborg, S.R., Torre, E.A., Emert, B., Krepler, C., Beqiri, M., Sproesser, K., Brafford, P.A., Xiao, M., et al. (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* 546, 431–435.

- Shain, A.H., and Bastian, B.C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer* 16, 345–358.
- Shain, A.H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., Dummer, R., North, J., Pincus, L., Ruben, B., et al. (2015). The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N. Engl. J. Med.* 373, 1926–1936.
- Shain, A.H., Joseph, N.M., Yu, R., Benhamida, J., Liu, S., Prow, T., Ruben, B., North, J., Pincus, L., Yeh, I., et al. (2018). Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Incremental Disruption of Key Signaling Pathways during Melanoma Evolution. *Cancer Cell* 34, 45-55.e4.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 707–723.
- Shi, H., Hugo, W., Kong, X., Hong, A., Koya, R.C., Moriceau, G., Chodon, T., Guo, R., Johnson, D.B., Dahlman, K.B., et al. (2014). Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov.* 4.
- Shirley, M. (2018). Encorafenib and Binimetinib: First Global Approvals. *Drugs* 78, 1277–1284.
- Sogawa, K., Numayama-Tsuruta, K., Takahashi, T., Matsushita, N., Miura, C., Nikawa, J., Gotoh, O., Kikuchi, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. (2004). A novel induction mechanism of the rat CYP1A2 gene mediated by Ah receptor–Arnt heterodimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 746–755.
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., et al. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487, 500–504.
- Su, F., Viros, A., Milagre, C., Trunzer, K., Bollag, G., Spleiss, O., Reis-Filho, J.S., Kong, X., Koya, R.C., Flaherty, K.T., et al. (2012). *RAS* Mutations in Cutaneous Squamous-Cell Carcinomas in Patients Treated with BRAF Inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 366, 207–215.
- Su, Y., Wei, W., Robert, L., Xue, M., Tsoi, J., Garcia-Diaz, A., Moreno, B.H., Kim, J., Ng, R.H., Lee, J.W., et al. (2017). Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G.J.J.E., Prahallad, A., Robert, C., Haanen, J., Blank, C., Wesseling, J., Willems, S.M., et al. (2014). Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508, 118–122.
- Teino, I., Kuuse, S., Ingerpuu, S., Maimets, T., and Tiido, T. (2012). The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Mouse Fshr Promoter Activity Through an E-Box Binding Site1. *Biol. Reprod.* 86.
- Das Thakur, M., Salangsang, F., Landman, A.S., Sellers, W.R., Pryer, N.K., Levesque, M.P., Dummer, R., McMahon, M., and Stuart, D.D. (2013). Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature* 494, 251–255.
- Thody, A.J., Higgins, E.M., Wakamatsu, K., Ito, S., Burchill, S.A., and Marks, J.M. (1991). Pheomelanin as well as Eumelanin Is Present in Human Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 97, 340–344.
- Tijet, N., Boutros, P.C., Moffat, I.D., Okey, A.B., Tuomisto, J., and Pohjanvirta, R. (2006).

Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Mol. Pharmacol.* *69*, 140–153.

Tirosch, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Ii, M.H.W., Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., et al. (2016). Dissecting the multicellular exosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* (80-. ). *352*, 189–196.

Trunzer, K., Pavlick, A.C., Schuchter, L., Gonzalez, R., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., Kim, K.B., Weber, J.S., et al. (2013). Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* *31*, 1767–1774.

Tsai, C.-F., Hsieh, T.-H., Lee, J.-N., Hsu, C.-Y., Wang, Y.-C., Kuo, K.-K., Wu, H.-L., Chiu, C.-C., Tsai, E.-M., and Kuo, P.-L. (2015). Curcumin Suppresses Phthalate-Induced Metastasis and the Proportion of Cancer Stem Cell (CSC)-like Cells via the Inhibition of AhR/ERK/SK1 Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *J. Agric. Food Chem.* *63*, 10388–10398.

Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K.M., Lay, J., Wong, D.J.L., Atefi, M., Shirazi, R., Wang, X., et al. (2018). Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* 1–15.

Venturelli, S., Burkard, M., Biendl, M., Lauer, U.M., Frank, J., and Busch, C. (2016). Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition* *32*, 1171–1178.

Verfaillie, A., Imrichova, H., Atak, Z.K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., Christiaens, V., Svetlichnyy, D., Luciani, F., Van den Mooter, L., et al. (2015). Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat. Commun.* *6*, 6683.

Villano, C.M., Murphy, K.A., Akintobi, A., and White, L.A. (2006). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *210*, 212–224.

Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., et al. (2010). Acquired Resistance to BRAF Inhibitors Mediated by a RAF Kinase Switch in Melanoma Can Be Overcome by Cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* *18*, 683–695.

Vogel, C.F.A., Sciallo, E., and Matsumura, F. (2007). Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of chemokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *363*, 722–726.

Wagle, N., Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., MacConaill, L.E., Hahn, W.C., et al. (2011). Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J. Clin. Oncol.* *29*, 3085–3096.

Wagle, N., Van Allen, E.M., Treacy, D.J., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., Taylor-Weiner, A., Rosenberg, M., Goetz, E.M., Sullivan, R.J., Farlow, D.N., et al. (2014). MAP Kinase Pathway Alterations in BRAF-Mutant Melanoma Patients with Acquired Resistance to Combined RAF/MEK Inhibition. *Cancer Discov.* *4*, 61–68.

Wang, J., Huang, S.K., Marzese, D.M., Hsu, S.C., Kawas, N.P., Chong, K.K., Long, G. V., Menzies, A.M., Scolyer, R.A., Izraely, S., et al. (2015). Epigenetic Changes of EGFR Have an Important Role in BRAF Inhibitor-Resistant Cutaneous Melanomas. *J. Invest. Dermatol.* *135*, 532–541.

- Wei, T., Chen, C., Liu, J., Liu, C., Posocco, P., Liu, X., Cheng, Q., Huo, S., Liang, Z., Fermeglia, M., et al. (2015). Anticancer drug nanomicelles formed by self-assembling amphiphilic dendrimer to combat cancer drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 2978–2983.
- Wilson, S.R., Joshi, A.D., Elferink, C.J., and Reiners, J.J. (2013). The tumor suppressor Kruppel-like factor 6 is a novel aryl hydrocarbon receptor DNA binding partner. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *345*, 419–429.
- Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., and Safe, S. (2003). The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 1843–1855.
- Wright, E.J., Pereira De Castro, K., Joshi, A.D., and Elferink, C.J. (2017). Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Curr. Opin. Toxicol.* *2*, 87–92.
- Xu, L., Zhang, Y., Tian, K., Chen, X., Zhang, R., Mu, X., Wu, Y., Wang, D., Wang, S., Liu, F., et al. (2018). Apigenin suppresses PD-L1 expression in melanoma and host dendritic cells to elicit synergistic therapeutic effects. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *37*, 261.
- Yao, Z., Gao, Y., Su, W., Yaeger, R., Tao, J., Na, N., Zhang, Y., Zhang, C., Rymar, A., Tao, A., et al. (2019). RAF inhibitor PLX8394 selectively disrupts BRAF dimers and RAS-independent BRAF-mutant-driven signaling. *Nat. Med.* *25*, 284–291.
- Ye, M., Zhang, Y., Gao, H., Xu, Y., Jing, P., Wu, J., Zhang, X., Xiong, J., Dong, C., Yao, L., et al. (2018). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Leads to Resistance to EGFR TKIs in Non-Small-Cell Lung Cancer by Activating Src-Mediated Bypass Signaling. *Clin. Cancer Res.*
- Yentz, S., and Smith, D. (2018). Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibition as a Strategy to Augment Cancer Immunotherapy. *BioDrugs* *32*, 311–317.
- Zalaudek, I., Schmid, K., Marghoob, A.A., Scope, A., Manzo, M., Moscarella, E., Malvey, J., Puig, S., Pellacani, G., Thomas, L., et al. (2011). Frequency of Dermoscopic Nevus Subtypes by Age and Body Site. *Arch. Dermatol.* *147*, 663.
- Zeng, H., Jorapur, A., Shain, A.H., Lang, U.E., Torres, R., Zhang, Y., McNeal, A.S., Botton, T., Lin, J., Donne, M., et al. (2018). Bi-allelic Loss of CDKN2A Initiates Melanoma Invasion via BRN2 Activation. *Cancer Cell* *34*, 56-68.e9.
- Zhang, C., Spevak, W., Zhang, Y., Burton, E.A., Ma, Y., Habets, G., Zhang, J., Lin, J., Ewing, T., Matusow, B., et al. (2015). RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature* *526*, 583–586.
- Zhang, J., Yang, P.L., and Gray, N.S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 28–39.
- Zhang, L., Nichols, R.G., and Patterson, A.D. (2017). The aryl hydrocarbon receptor as a moderator of host-microbiota communication. *Curr. Opin. Toxicol.* *2*, 30–35.
- ZHANG, H., SUN, Q., XU, T., HONG, L., FU, R., WU, J., and DING, J. (2016). Resveratrol attenuates the progress of liver fibrosis via the Akt/nuclear factor- $\kappa$ B pathways. *Mol. Med. Rep.* *13*, 224–230.
- Zhou, L. (2016). AHR Function in Lymphocytes: Emerging Concepts. *Trends Immunol.* *37*, 17–31.

**Titre :** Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées du mélanome métastatique : implication du facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor

**Mots clés :** mélanome, thérapie ciblée, résistance, AhR

**Résumé :** Le mélanome est la forme la plus mortelle de cancer cutané. La moitié des patients portent la mutation V600E de la kinase BRAF (BRAF<sup>V600E</sup>), induisant l'activation constitutive de la voie des MAPK. Les inhibiteurs de BRAF (BRAFi) ciblant spécifiquement la kinase mutée engendrent d'excellentes réponses chez les patients, malheureusement suivies par le développement de mécanismes de résistance systématique conduisant à la rechute. L'hétérogénéité intra-tumorale et le contrôle de la plasticité phénotypique, impliquant la régulation du programme d'expression génétique, participent à l'émergence de cellules résistantes conduisant à la rechute.

L'activation constitutive du facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) induit l'expression de gènes associés à l'acquisition de la résistance aux BRAFi. AhR participe également à l'acquisition du phénotype invasif/dédifférencié des cellules de mélanomes. A l'inverse, son inhibition permet de réengager les cellules vers un programme de sensibilité aux BRAFi.

L'utilisation thérapeutique des antagonistes d'AhR tels les flavonoïdes, en combinaison avec les BRAFi, permettent de potentialiser l'efficacité du traitement et de retarder le développement des résistances et potentiellement la rechute des patients.

**Title :** Resistant mechanisms of targeted therapies in the treatment of melanoma : implication of the transcription factor Aryl hydrocarbon Receptor

**Keywords :** melanoma, targeted therapy, resistance, AhR

**Abstract :** Melanoma is the deadliest form of skin cancer. Half of the patients carry the V600E mutation of the BRAF kinase (BRAF<sup>V600E</sup>), inducing the constitutive activation of the MAPK pathway. BRAF inhibitors (BRAFi), specifically targeting the mutated kinase, generate impressive responses in patients unfortunately followed by the systematic development of resistance mechanisms leading to the relapse. Intra-tumor heterogeneity and control of phenotypic plasticity through the regulation of the gene expression program contribute to the emergence of resistant cells leading to relapse.

Constitutive activation of the Aryl hydrocarbon Receptor transcription factor (AhR) induces the expression of genes associated with the acquisition of BRAFi resistance. It also participates in the acquisition of the invasive/dedifferentiated phenotype of melanoma cells. Conversely, its inhibition allows the cells to switch to a BRAFi sensitivity program. The use of therapeutic strategies using AhR antagonists such as flavonoids, in combination with the BRAFi, makes it possible to potentiate the effectiveness of the treatment and to prevent the development of resistance and potentially the relapse of the patients.