



**HAL**  
open science

# Implication des enzymes de déubiquitination dans la progression et la réponse thérapeutique des mélanomes

Pierric Biber

► **To cite this version:**

Pierric Biber. Implication des enzymes de déubiquitination dans la progression et la réponse thérapeutique des mélanomes. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ6024 . tel-04225613

**HAL Id: tel-04225613**

**<https://theses.hal.science/tel-04225613v1>**

Submitted on 3 Oct 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE DE DOCTORAT

## Implication des enzymes de déubiquitination dans la progression et la réponse thérapeutique des mélanomes

**Pierric BIBER**

Centre méditerranéen de médecine moléculaire (C3M), INSERM

**Présentée en vue de l'obtention  
du grade de docteur en Sciences de la Vie  
et de la Santé  
D'université Côte d'Azur  
Dirigée par : Marcel DECKERT  
Soutenue le : 1 décembre 2022**

**Devant le jury, composé de :**  
Pr Marie-Dominique GALIBERT, DR CNRS,  
Université de Rennes  
Dr Franck VERRECCHIA, DR INSERM,  
Université de Nantes  
Dr Corinne BOUSQUET, DR INSERM,  
Université Paul Sabatier  
Dr Marcel DECKERT, DR INSERM,  
Université Côte d'Azur

# Implication des enzymes de déubiquitination dans la progression et la réponse thérapeutique des mélanomes

## Composition du jury :

### **Président du jury et examinatrice :**

Pr Marie-Dominique GALIBERT, Directrice de Recherche CNRS, Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR), Université de Rennes, Rennes, France.

### **Rapporteurs :**

Dr Franck VERRECCHIA, Directeur de Recherche INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers (CRCI2NA), Université de Nantes, Nantes, France.

Dr Corinne BOUSQUET, Directrice de Recherche INSERM, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université Paul Sabatier, Toulouse, France

### **Directeur de thèse :**

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

# Résumé

Le mélanome est la cause majoritaire de décès associés aux cancers de la peau. Sa forte hétérogénéité, son haut potentiel métastatique et sa capacité de résistance au traitement expliquent cette agressivité. Malgré l'apparition des thérapies ciblées inhibant la voie oncogénique BRAF/MEK et des immunothérapies dont les résultats sont impressionnants à court-terme, de nombreux patients sont en échec thérapeutique. En effet la plasticité des cellules de mélanome est responsable de la mise en place rapide de programmes d'adaptation au traitement. Parmi eux, se trouve la capacité de rigidifier la matrice extracellulaire (MEC) qui est lue par la cellule à l'aide du mécanosenseur YAP. Celui-ci engage un programme transcriptionnel renforçant cette rigidification. Par conséquent, une boucle d'amplification positive s'installe ce qui aboutit à un échappement thérapeutique mécano-dépendant des cellules de mélanome. L'identification de nouveaux acteurs de cette boucle et leur ciblage pourrait constituer une nouvelle approche pour lutter contre la résistance thérapeutique. L'activation aberrante de voies oncogéniques ou de résistance au traitement implique la surexpression de protéines et déstabilise ainsi l'homéostasie protéique. Cette dernière est assurée par l'activité protéolytique du système ubiquitine protéasome. En opposition, les déubiquitinasés (DUBs) clivent le signal ubiquitine d'adressage à la dégradation pour stabiliser leur substrat. Dans de nombreux cancers, ces enzymes sont détournées afin de moduler des voies oncogéniques impliquées dans la prolifération, l'invasion et/ou la résistance au traitement. Dans ce contexte, les DUBs sont des candidates idéales pour trouver de nouveaux acteurs de la mécanorésistance du mélanome.

Pour les identifier, nous avons couplé une culture de cellules de mélanome sur des matrices de collagène de différentes rigidités avec une technique biochimique d'étiquetage de l'activité des DUBs. En y associant la protéomique quantitative nous avons identifié USP9X dont l'activité est augmentée avec la rigidification de la matrice. Des analyses *in silico* additionnelles révèlent que YAP appartient à l'interactome de USP9X et montrent une corrélation entre l'expression de USP9X et la signature transcriptionnelle de YAP dans le mélanome. Nous avons donc fait l'hypothèse que l'activité DUB de USP9X stabilise YAP dans le mélanome. En accord avec celle-ci, nous avons montré que la déplétion et le ciblage pharmacologique de USP9X diminuent l'expression de YAP au niveau protéique sans impacter son message. A l'inverse, la déplétion de l'E3 ligase  $\beta$ TRCP augmente le niveau protéique de YAP. De plus à l'aide d'une technique biochimique nous avons observé une accumulation de la forme polyubiquitinée de YAP sous inhibition combinée de USP9X et du protéasome. Ceci indique que l'activité de USP9X empêche la dégradation de YAP par le protéasome. Nous avons aussi observé que le ciblage de USP9X empêche la mise en place de programmes induits par la rigidification de la matrice comme la translocation nucléaire de YAP, la migration cellulaire et l'invasion. Nous avons généralisé ces observations dans d'autres types de cellules tumorales et dans les fibroblastes associés au cancer, suggérant une large action de USP9X dans la régulation des voies de mécanotransduction tumorale via YAP. Enfin, dans un modèle de mélanome murin syngénique, nous avons montré que le ciblage de USP9X améliore l'efficacité des inhibiteurs de BRAF/MEK, contrecarre le remodelage du collagène induit par les médicaments et retarde la récurrence tumorale.

Ces travaux révèlent que la mécano-activation de USP9X stabilise l'oncoprotéine YAP, permettant ainsi la mise en place de la boucle d'amplification positive entre YAP et la rigidification de la MEC et donc l'échappement thérapeutique du mélanome. Par conséquent nous proposons que USP9X constitue une «mécano-DUB» ainsi qu'une cible thérapeutique pertinente dans le mélanome métastatique réfractaire.

Mots clés : mélanome cutané, mécanotransduction, USP9X, YAP, migration

# Abstract

Melanoma is the deadliest skin cancer due to its heterogeneity, high metastatic potential and propensity to form resistance. Despite the current therapies, including targeted therapies against BRAF/MEK oncogenic pathway and immunotherapies, most of patients are still prone to therapeutic failure. Melanoma cell high plasticity is to blame for the rapid onset of therapeutic resistance through adaptation programs. One such program is the ability of melanoma cells to induce extracellular matrix (ECM) stiffening. This ECM remodeling will then be converted into a transcriptional program by the YAP mechanosensor that will promote a feed-forward mechanical loop leading to increase stiffness and therapy resistance. Identification and targeting of new actors of this loop of mechanoresistance can represent new opportunities to fight treatment resistance. Abnormal activation of such oncogenic pathway implicated in resistance often result in protein overexpression leading to proteostasis imbalance. To prevent this, cancer cells rely on the proteolytic activity of the ubiquitin-proteasome system on one hand. On the other hand, deubiquitinases (DUBs) contribute to proteostasis by removing ubiquitin from proteasome's substrates thus stabilizing them. In cancers, DUBs can be hijacked to modulate oncogenic pathways, enhancing cell proliferation and/or invasion. In this context DUBs can be ideal candidate to find new actors of melanoma mechanoresistance.

To identify DUBs involved in melanoma mechanotransduction, we used cell lines cultivated on collagen matrices with various stiffnesses combined with an activity-based ubiquitin probe for profiling DUB activity. Using this approach and quantitative proteomic, we identified USP9X as a DUB whose activity is increased by collagen stiffness. In silico analysis further revealed that YAP belongs to the USP9X interactome and showed a correlation between USP9X expression and YAP transcriptional signature in melanoma. We thus hypothesized that USP9X regulates YAP levels in melanoma cells through its DUB activity. Consistently, siRNA-mediated depletion and pharmacological inhibition of USP9X decreased YAP expression at protein but not mRNA levels. Conversely knockdown of the YAP E3 ligase  $\beta$ TRCP increased YAP protein expression. A GST-TUBE pulldown approach revealed that combined USP9X and proteasome inhibition increased YAP poly-ubiquitination, indicating that USP9X deubiquitinates YAP to prevent its proteasomal degradation. In line with a role of USP9X in mechanotransduction upstream of YAP, USP9X targeting was found to impair stiffness-induced responses including YAP nuclear translocation and transcriptional activity, cell migration and invasion. Interestingly, we also show that the relationship between YAP and USP9X can be found in other tumor cell types, as well as in cancer-associated fibroblasts (CAFs), suggesting a broad action of USP9X in regulating tumorigenic mechanical pathways through YAP stabilization. Finally, in a melanoma syngeneic mouse model, targeting USP9X enhances BRAF/MEK inhibitor efficacy, counteracts drug-induced collagen remodeling and delays tumor relapse.

Overall, our results reveal an original role of USP9X in melanoma invasiveness and mechanoresistance through stiffness-dependent stabilization of YAP. We therefore propose USP9X as a “mechano-DUB” as well as a promising therapeutic target in refractory metastatic melanoma.

Keywords : Cutaneous melanoma, Mechanotransduction, USP9X, YAP, migration

# Remerciements



Tout d'abord, je souhaite remercier les membres de mon jury, le Pr Marie-Dominique GALIBERT, le Dr Franck VERRECCHIA et le Dr Corinne BOUSQUET d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je remercie également la fondation ARC de m'avoir permis de continuer ce travail au cours d'une quatrième de thèse qu'ils ont financé.

En toute logique, la première personne qui me vient en tête lorsque que je pense à ces remerciements, c'est mon directeur de thèse : le Dr Marcel DECKERT. Je me souviens de nos premières discussions avant même de commencer mon stage de master 2 où tu m'as fait pour la première fois découvrir ces DUBs qui me suivront pendant plus de quatre années. J'ai beaucoup appris avec toi, j'ai appris la patience, la persévérance, comment gérer les déceptions expérimentales mais aussi les petites victoires du quotidien. Je suis très fier du travail que nous avons accompli ensemble et j'ai hâte de voir ce que tu vas faire de la thématique des « mécano-DUBs » que nous avons ouverte ensemble.

J'en profite également pour remercier le Dr Sophie TARTARE-DECKERT, qui a toujours su se montrer de bon conseil. C'est en partie grâce à toi que j'ai pu rendre claire de nombreuses slides de présentation sur lesquelles je butais et ainsi obtenir des prix que je n'aurais jamais pu obtenir sans tes conseils.

Avant de me lancer dans la longue liste de remerciements qui va suivre je veux adresser des remerciements particuliers au Dr Christophe Girard sans qui je ne serais même pas dans cette équipe. Chris, tu as toujours cru en moi, même dans les moments où moi je n'y croyais plus. Tu m'as soutenu, conseillé et même quelque fois poussé quand il le fallait et si à l'avenir je réussis dans cette voie que j'ai choisie c'est en partie grâce à toi. J'espère que tu continueras le vélo quand je ne serais plus là. J'espère aussi que j'aurais le droit de faire des avions en papier pour mon pot de départ ! Merci pour tout Chris, tu as fait bien plus que ce que tu n'aurais dû : tu as été un mentor pour moi.

C'est maintenant le tour de l'équipe 11, Et je vais commencer par toi, Alexandrine. Je te remercie pour tout, pour les années que nous avons passées ensemble pour ton soutien indéfectible malgré les circonstances que ça soit dans ma vie privée ou professionnelle. Tu as été ma plus belle rencontre de ces 4 dernières années et je te souhaite tout le bonheur du monde, j'aimerais en écrire plus mais les circonstances font que c'est difficile pour moi, et j'en suis désolé. PS : tu mérites amplement ta seconde place sur mon papier sans toi beaucoup de choses seraient manquantes et je t'en suis éternellement reconnaissant.

Wala, mon souffre-douleur préféré, sans toi beaucoup de ce qui est dans ce manuscrit n'existerait simplement pas. C'est grâce à toi que j'ai pu écrire en toute quiétude sachant que tu comblais les derniers petits trous qu'il manquait dans les figures. Je n'oublierais jamais ma toute première étudiante et si un jour tu as besoin de moi je serais toujours disponible pour te rendre la pareille. D'ailleurs je me demandais est-ce que je t'ai déjà raconté l'histoire tragique de Dark Plagueis le sage ?

Professeur Larbret, depuis le jour où tu as supprimé mes données de FACS sans faire exprès j'ai su qu'on s'entendrait. Grâce à toi j'ai appris tout ce que je sais de la cytométrie en flux mais également de la natation. J'espère un jour pouvoir être plus rapide que toi au crawl, ça sera un grand accomplissement sportif pour moi ! Je te souhaite une bonne continuation et n'oublie pas de bizuter les nouveaux étudiants au FACS pour moi !

Mickaël, avec toi j'ai découvert les pauses café durant lesquels j'ai eu certaines des discussions qui m'ont permis d'aller de l'avant dans le projet. Si Robin m'a tout appris durant mon master 2, toi tu as cristallisé mes connaissances et mes compétences afin de me permettre de prendre mon envol pour

la suite de la thèse. Savoir que tu travaillais sur la même thématique à été comme un filet de sécurité, je te remercie pour tout ce que tu m'as appris, notamment qu'au commencement il y avait PSMD14...

Océane, quand tu es arrivée, tu as pris la place de quelqu'un de bien difficile à remplacer. MAIS tu t'en sors avec brio ! Tu as amené une bonne humeur et une bienveillance incontestable dans l'équipe 11 et je te souhaite de rester telle que tu es ! Tu as un beau projet et je compte sur toi pour le concrétiser : Soft/Stiff forever !

Je remercie également Virginie pour toutes les discussions scientifiques ou non qu'on a eues, pour tous les ampoules de YUMM1.7 que tu m'as données et tous les protocoles et petites astuces notamment pour les immunophénotypages que j'ai pu faire en première année.

Enfin, la Petite Mira, la petite dernière, je compte sur toi pour prendre la relève, je te rappelle que je te lègue ma paillasse alors tu va devoir en prendre soin et faire énormément de manips pour la rentabiliser ! j'ai été très heureux de te connaître et qu'on se soit soutenus dans un moment qui fût difficile pour nous deux ! Tu mérites ta place chez nous alors maintenant dégomme tout ! Et surtout comme on m'a chargé de le faire pour Serena, je te charge de prendre soin d'Alexandrine.

En ce qui concerne les anciens de l'équipe 11, je suis plus ou moins obligé de commencer par Robin, l'homme qui m'a tout appris avant de devenir dentiste. C'est grâce à toi que je maîtrise toutes les techniques utilisées au cours de ce travail de thèse ! Je te remercie pour tout et je te souhaite à toi et ta petite famille un bel avenir ! PS : j'ai pris soin de Serena comme tu me l'as demandé dans les remerciements de ta thèse.

Serena, je n'aurais jamais cru en arrivant en master 2 que quand tu partirais tu me manquerais autant. Quand tu es partie, une partie de l'âme de l'équipe 11 est partie avec toi. Je me souviendrai toute ma vie des blagues sur riviera radio pendant qu'on grattait nos protéines le vendredi après-midi. Je te promets que quand tout cela sera fini je viendrais visiter avec toi la « Poubelle à ciel ouvert » et que cette fois-ci je tiendrais ma promesse. En attendant je regarde « Little Jon » sur mon étagère pour qu'il me donne le courage de finir. Et toi j'espère que tu n'oublieras pas le « Petit Con » qui n'as pas voulu écouter le transfert liquide pour aller manger.

PETIT CHRISTOPHER, si Serena est partie avec une partie de l'âme de l'équipe 11, toi tu es parti avec l'autre. Le labo est carrément vide sans toi. Tu es l'un des esprits les plus imaginatif et les plus rêveurs qu'il m'a été donné de rencontrer ! Tu feras un scientifique hors du commun et j'espère de tout mon cœur que ton post-doc à Marseille démarre déjà sur les chapeaux de roues ! Bonne chance !

Petite Margaux, c'est grâce à toi que j'ai pu m'intégrer socialement à l'équipe durant mon master 2 et je t'en suis reconnaissant. Le fait que nos thématiques de travail se soient autant rapprochées a également été pour moi une source de soulagement. Grâce à cela je savais que tu pouvais m'apporter conseil sur la mécanotransduction et YAP ! Je te souhaite une belle carrière en Italie !

Célya, la deuxième étudiante que j'ai pu prendre sous mon aile ! je te souhaite une belle carrière et j'espère avoir le temps d'enfin faire cette rando avec toi et ton copain maintenant que mon manuscrit est écrit !

Je souhaite aussi remercier tous les autres, Ana, Ilona, Lauren, Estelle, Caroline, Cassandre, Maeva, Melissa et tous ceux que j'oublie pour les innombrables discussions, repas, sortie, manip et autre que nous avons vécu ensemble, vous allez tous me manquer.

C'est maintenant le tour de mes amis, Et je vais commencer avec toi Marina, c'est grâce à toi que j'ai pu continuer et que j'ai pu valider ce master 2. On s'est tous les deux trouvés durant une période

difficile et on a su en tirer le meilleur parti. Je te remercie pour tout, que ce soit le soutien professionnel ou le soutien personnel dans les périodes sombres. Sans toi je ne serais ni la personne, ni le scientifique que je suis maintenant. D'ailleurs, aujourd'hui si le destin s'aligne et que je valide mon doctorat je pourrai enfin dire que je suis arrivé premier puisque tu soutiens après moi. Quoi que tu choisisses pour ton avenir la personne qui t'emploiera aura gagné le jackpot ! Bonne chance pour ta soutenance !

Duv, c'est grâce à toi que j'ai pu remonter la pente cet été on le sait tous les deux. Comme j'ai pu te le dire tu es comme le frère que je n'ai jamais eu. Au moment où j'écris ces mots je ne pense qu'au prochain bivouac/rando avec mon meilleur ami. Pour tout ce que tu as fait durant ma thèse et spécialement cet été : Ce manuscrit de thèse s'incline devant le Duché.

Olive et Pageault, les gars merci, vous m'avez maintenu tous les deux la tête hors de l'eau lors de l'écriture de ce manuscrit. Nos petites soirées console m'ont permis de tenir le coup et de continuer à écrire jours après jours. Merci pour tout, ça aurait été bien plus désagréable sans votre soutien quotidien. Je vous revaudrais ça, ça va partir sur plusieurs bières, voir même une convocation de Johnnie.

François en plus du soutien moral, tu as corrigé les fautes d'une grande partie de cette thèse durant l'une de tes nuits de garde. Merci de m'avoir écouté les jours où je doutais, merci de m'avoir poussé quand je m'affaiblissais et merci de m'avoir insulté quand je le méritais ! Tu ne peux pas savoir comment je suis heureux de savoir que tu viens voir ma thèse en présentiel !

J'en profite ici pour remercier tous les gars (et la fille) de l'Ordre 48 ! Olive, Pageault, François, JB, Flo, Gary, Caro c'était une des meilleures semaines de ma vie on remet ça quand vous voulez ! La Lozère, un super endroit pour décompresser avant de commencer la rédaction de mon manuscrit de thèse.

MARIE, j'ai failli t'oublier ! je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apporté avec le microscope, les macros, les coupes de tumeurs ! Mais aussi pour toutes les bières pour le BDA pour le fait que ton bureau soit un havre de paix au sein d'un C3M tumultueux ! Aujourd'hui je suis fier de te remercier en tant qu'amie plutôt qu'en tant que collègue tu feras partie des personnes qui vont vraiment me manquer quand je partirais.

Aurelia, je sais qu'on s'est un peu perdu de vue durant nos thèses respectives. Mais je voulais quand même te remercier c'est aussi grâce à toi que j'ai survécu à la fac et que j'ai continué toujours plus loin. Je te souhaite une superbe soutenance de thèse et je ferais tout pour y être présent !

Paul, je te remercie pour toute l'aide que tu as pu m'apporter professionnellement, administrativement et sans aucune forme d'amitié. Plus sérieusement tu as toujours été là pour écouter mes mésaventures et j'ai rarement autant ris avec quelqu'un. Je te souhaite une belle continuation et surtout une belle soutenance ! PS : Tu n'existes que dans ma tête.

Nicolas, si les étoiles s'alignent, toi et moi on aura commencé notre vie universitaire ensemble en 2012 et terminé nos doctorats respectifs en 2022, soit 10 ans plus tard. Toi en médecine, moi en biologie je pense qu'on a tous les deux fait un chemin assez impressionnant depuis ce jour où je te trollais avec les neurones à la BU de Valrose. Le monde s'ouvre enfin à nous !

Je remercie également M. Gouy, mon professeur de SVT en terminale qui a su cristalliser mon goût pour la biologie et créer une vocation chez un petit lycéen paumé.

Je remercie également tous ceux que j'ai pu oublier Antho, Nigita, Théo, Frédéric Simon, Paul, Chihab, etc... Vous avez tous été super important pour mon parcours universitaire merci !

Enfin je remercie ma famille, tout d'abord ma mère pour m'avoir supporté durant les longues semaines de rédaction ! Ma sœur pour tous les moments où j'ai pu décompresser avec elle en faisant le clown mais aussi pour la table des figures qui n'existerais pas sans elle, et mon père pour le soutien moral qu'il m'a apporté durant toute ces années de thèse. Enfin je remercie Nyméria pour le soutien qu'elle a pu m'apporter bien malgré elle !

# Table des matières

RESUME .....	2
ABSTRACT .....	4
REMERCIEMENTS.....	6
TABLE DES MATIERES .....	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	15
ABRÉVIATIONS.....	17
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
<b>I. DU MELANOCYTE AU MELANOME .....</b>	<b>22</b>
<b>A. La peau .....</b>	<b>22</b>
1) Anatomie .....	22
2) Les autres types cellulaires de l'épiderme .....	23
<b>B. Biologie du mélanocyte .....</b>	<b>24</b>
1) Mélanogénèse.....	24
2) Rôle de la pigmentation .....	25
<b>C. Cancers de la peau et mélanome .....</b>	<b>25</b>
1) Les différents types de cancers non-mélanocytaires .....	25
2) Généralités sur le mélanome.....	25
<b>D. Facteurs de risque du mélanome.....</b>	<b>26</b>
1) Facteurs de risques intrinsèques .....	26
2) Facteurs de risques extrinsèques.....	26
<b>E. Progression du mélanome .....</b>	<b>27</b>
1) Phase horizontale de croissance .....	27
2) Phase verticale de croissance .....	27
3) Phase métastatique.....	28
<b>F. Mutations initiatrices et voies de signalisation altérées du mélanome .....</b>	<b>28</b>
1) Mutations impactant la voie des MAPK.....	28
2) Groupe des triples négatifs.....	30
3) Voie PI3K/AKT .....	31
4) Autres voies altérées .....	32
<b>G. L'hétérogénéité des cellules de mélanome.....</b>	<b>33</b>
1) Plasticité phénotypique.....	33
2) Facteurs d'induction de la plasticité phénotypique.....	34
<b>H. La prise en charge thérapeutique du mélanome .....</b>	<b>35</b>
1) Emergence des thérapies ciblées.....	36

2) La combothérapie .....	36
3) L'immunothérapie.....	37
<b>I. Les mécanismes de résistance thérapeutique du mélanome .....</b>	<b>38</b>
1) Résistance thérapeutique intrinsèques aux thérapies ciblées .....	39
2) Résistance croisée entre thérapies ciblées et immunothérapies.....	40
3) Résistance extrinsèque aux thérapies ciblées conférées par les facteurs solubles .....	41
4) Résistance extrinsèque aux thérapies ciblées conférées par l'adhésion cellulaire.....	41
<b>II. MATRICE EXTRACELLULAIRE ET MECANOTRANSDUCTION .....</b>	<b>43</b>
<b>A. Microenvironnement et matrice extracellulaire .....</b>	<b>43</b>
1) Composants cellulaires du microenvironnement .....	43
2) Composants non cellulaires du microenvironnement .....	44
<b>B. Rôle de la matrice extracellulaire dans le cancer .....</b>	<b>47</b>
1) Rôle dans l'angiogenèse .....	48
2) Rôle dans la réponse immunitaire .....	48
3) Rôle dans la prolifération .....	49
4) Rôle dans la migration et l'invasion .....	49
<b>C. Introduction à la mécanotransduction .....</b>	<b>50</b>
1) Généralités.....	50
2) Différents types de forces .....	51
3) Mesure des forces .....	52
<b>D. Acteurs extracellulaires de la mécanotransduction .....</b>	<b>52</b>
1) Les intégrines .....	53
2) Les récepteurs à domaine discoïdine.....	54
3) Les canaux ioniques mécanosensibles .....	54
<b>E. Acteurs intracellulaires de la transduction des signaux mécanique .....</b>	<b>54</b>
1) Le cytosquelette.....	54
2) Les voies de signalisation de la mécanotransduction .....	57
<b>F. Rôle de la mécanotransduction dans le cancer .....</b>	<b>60</b>
1) Rôle dans l'angiogenèse .....	61
2) Rôle dans la réponse immunitaire .....	61
3) Rôle dans la prolifération .....	61
4) Rôle dans la migration et l'invasion .....	62
5) Rôle dans la résistance aux thérapies .....	62
<b>G. Conclusion .....</b>	<b>63</b>
<b>III. LE SYSTEME UBIQUITINE PROTEASOME .....</b>	<b>64</b>
<b>A. Ubiquitination : généralités .....</b>	<b>64</b>
<b>B. Les ubiquitines ligases .....</b>	<b>65</b>
1) Les enzymes activatrices E1.....	65
2) Les enzymes de conjugaison E2 .....	65
3) Les enzymes de liaison E3.....	66

<b>C. Le code de l'ubiquitine.....</b>	<b>67</b>
1) La molécule d'ubiquitine .....	67
2) Les « ubiquitin like proteins ».....	67
3) Le type de liaison à l'ubiquitine .....	68
4) Le mécanisme de reconnaissance des substrats .....	71
<b>D. Le système ubiquitine protéasome.....</b>	<b>73</b>
1) Généralités.....	73
2) La particule régulatrice 19S .....	73
3) La particule catalytique 20S.....	74
<b>E. Les enzymes de déubiquitination .....</b>	<b>75</b>
1) Généralités.....	75
2) Les métalloprotéases à zinc.....	76
3) Les protéases à cystéine.....	76
4) Spécificité enzymatique des déubiquitinases.....	78
5) Fonctions cellulaires régulées par les DUBs .....	79
<b>F. Les déubiquitinases dans le cancer .....</b>	<b>80</b>
1) Déubiquitinases et cancers : généralités.....	80
2) Déubiquitinases et mélanome.....	81
.....	81
<b>G. Conclusion : Déubiquitinase et mécanotransduction .....</b>	<b>83</b>
<b>CONTEXTE DE LA RECHERCHE.....</b>	<b>84</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>86</b>
<b>ARTICLE 1 : THE MECHANICALLY-ACTIVATED DEUBIQUITINASE USP9X CONTROLS MELANOMA INVASIVENESS AND DRUG RESPONSE THROUGH YAP STABILIZATION .....</b>	<b>86</b>
<b>DISCUSSION/PERSPECTIVES .....</b>	<b>122</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>135</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>160</b>
<b>Présentations .....</b>	<b>161</b>
<b>Posters .....</b>	<b>164</b>
<b>Evènements.....</b>	<b>164</b>
<b>Publications.....</b>	<b>164</b>



# Table des illustrations

FIGURE 1 : SCHEMA REPRESENTANT LA STRUCTURE DE LA PEAU ET DE L'EPIDERME .....	22
FIGURE 2 : SCHEMA REPRESENTANT LES ETAPES ET PROCESSUS MIS EN JEUX LORS DU DEVELOPPEMENT DU MELANOME.....	27
FIGURE 3 : SCHEMA ILLUSTRANT LA VOIE DES MAPK .....	29
FIGURE 4 : SCHEMA ILLUSTRANT LA VOIE PI3K/AKT .....	31
FIGURE 5 : LE SWITCH PHENOTYPIQUE .....	33
FIGURE 6 : TRAITEMENTS ACTUELS DU MELANOME EN FONCTION DU STATUT MUTATIONNEL .....	35
FIGURE 7 : SCHEMA ILLUSTRANT LES MECANISMES DE RESISTANCE INTRINSEQUES AUX THERAPIES CIBLEES ..	39
FIGURE 8 : MODELE DE LA REPROGRAMMATION BIOMECHANIQUE DES CELLULES DE MELANOME INDUITE PAR LES THERAPIES CIBLEES.....	42
FIGURE 9: SCHEMATISATION DU MICROENVIRONNEMENT PHYSIOLOGIQUE.....	43
FIGURE 10 : ROLE DE LA MEC DANS LES PROPRIETES DES CELLULES TUMORALES .....	48
FIGURE 11 : ECHELLE DE RIGIDITE DES TISSUS HUMAINS COMPARES A UNE BOITE DE PETRI .....	50
FIGURE 12 : LES DIFFERENTES FORCES MECANIQUES POUVANT S'APPLIQUER A LA CELLULE .....	51
FIGURE 13 : LIGANDS ET ORGANISATION DES DIFFERENTS DIMERES D'INTEGRINE .....	53
FIGURE 14 : EFFET DE L'ACTIVATION DES RHO GTPASE SUR LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE .....	55
FIGURE 15 : L'ACTIVATION DE MRTF DEPENDS DES SIGNAUX MECANIQUES ET DU REMODELAGE DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE .....	57
FIGURE 16 : ACTIVATION DE LA VOIE HIPPO.....	59
FIGURE 17 : L'ACTIVATION DE YAP ET TAZ EST CONTROLEE PAR LES SIGNAUX MECANIQUES.....	60
FIGURE 18 : SCHEMA DU MECANISME DE L'UBIQUITINATION.....	65
FIGURE 19 : REPRESENTATION DE LA STRUCTURE 3D D'UNE MOLECULE D'UBIQUITINE OU D'UBL.....	67
FIGURE 20 : SCHEMA REPRESENTANT LES DIFFERENTS TYPES D'UBIQUITINATION .....	68
FIGURE 21 : ILLUSTRATION DU FONCTIONNEMENT DU SYSTEME UBIQUITINE PROTEASOME .....	73
FIGURE 22 : DIAGRAMME REPRESENTATIF DE LA GRANDE FAMILLE DES DUBS .....	75
FIGURE 23 : MECANISME BIOCHIMIQUE DE LA DEUBIQUITINATION .....	76
FIGURE 24 : MULTIPLICITE DE FONCTION DE L'UBIQUITINATION ET DES DUBS ASSOCIEES.....	79
FIGURE 25 : SCHEMA RECAPITULANT LES DUBS IMPLIQUEE DANS LA BIOLOGIE DU MELANOME ET PUBLICATION ASSOCIEES .....	81
FIGURE 26 : LES CELLULES DE MELANOME DEDIFFERENCIEES SECRETENT DES FACTEUR PRO-INFLAMMATOIRE SUR UNE MATRICE DE COLLAGENE SOUPLE .....	126
FIGURE 27 : L'INHIBITION DE USP9X INHIBE L'EXPRESSION DE YAP ET L'ACTIVATION MYOFIBROBLASTIQUE DES CAFS .....	131

# Abréviations

**53BP1** : P53 binding protein

**ABP** : Actin Binding Protein

**Anti-PD1** : Anti-  
Programmed Death 1

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATP** : Adénosine  
triphosphate

**BAP1** : BRCA1 Associated  
Protein1

**BRAF*i*** : Inhibiteur de BRAF

**BRCA1** : Breast cancer type  
1 susceptibility protein

**BRCC3** : BRCA1/BRCA2-  
Containing Complex Subunit  
3

**BTZ** : Bortézomib

**CAF** : Cancer Associated  
Fibroblast

**CAM-DR** : Cell Adhesion-  
Mediated Drug Resistance

**CDK4** : Cyclin-Dependant  
Kinase 4

**CDKN2A** : Cyclin-Dependant  
Kinase Inhibitor 2A

**CHX** : Cycloheximide

**CIRC** : Centre international  
de recherche sur le cancer

**CTLA-4** : CytotoxicT-  
Lymphocyte Antigen 4

**DDR** : Récepteur à domaine  
discoïdine

**DUB** : Déubiquitinase

**E1** : Ubiquitin-activating  
enzyme

**E2** : Ubiquitin-conjugating  
enzyme

**E3** : Ubiquitin ligase E3

**EGFR** : Epidermal Growth  
Factor Receptor

**EM-DR** : Environnement-  
Médiated Drug Resistance

**ERAD** : Endoplasmic  
Reticulum-Associated  
Degradation

**ERK** : Extracellular signal-  
Regulated Kinase

**ESCRT** : Endosomal Sorting  
Complex Required for  
Transport

**FAK** : Focal adhesion kinase

**FAP** : Fibroblast activated  
protein

**FGF** : Fibroblast Growth  
Factor

**FI** : filaments intermédiaires

**FN1** : Fibronectine 1

**G9** : Inhibiteur de USP9X

**GAG** : glycosaminoglycane

**GAP** : GTPase-activating  
proteins

**GDP** : Guanosine  
diphosphate

**GEF** : Guanine nucleotide  
exchange factor

**GSK2118436** : dabrafénib

**GTP** : Guanosine  
triphosphate

**H2A** : histones

**H2A/B** : Histone 2A/B

**HA** : Hémagglutinine

**HECT** : homologus to the  
E6AP carboxyl terminus

**HGF** : hepatocyte growth  
factor

**IL-2** : Interleukine 2

**IL-6** : Interleukine 6

**INCA** : Institut national du  
cancer

**JNK** : Jun N-terminal Kinase

**K<sub>2</sub>P** : Canaux potassique à  
deux domaines pore

**LAIR** : Leucocyte-Associated  
Immunoglobulin-like  
Receptor

**LOX** : Lysyl oxydases

**LUBAC** : Linear Ubiquitin  
Chain Assembly Complex

**MAF** : Fibroblastes associés  
au mélanome

**MAPK** : Mitogen Activated  
Protein Kinase

**MC1R** : Melanocortin 1  
Receptor

**MDM2** : Mouse Double  
Minute 2

**MEC** : Matrice  
extracellulaire

**MEK1/2** : Mitogen-activated  
protein kinase kinase 1/2

**MINDY** : Motif Interacting  
with Ub-containing novel  
DUB family

**MITF** : Microphthalmia-  
Associated Factor

**MJD** : Machado-Josephin Disease

**MLANA** : Melan-A

**MM-DR** : Matrix Mediated Drug Resistance

**MMP** : Métalloprotéases matricielles

**MRTF-A/B** : Myocardin-Related Transcription Factor A/B

**NF - $\kappa$ B** : Nuclear factor-Kappa 1

**NF1** : Neurofibromine 1

**NHF** : fibroblastes normaux de peau

**OTU** : Ovarian Tumour Protease

**PANC1** : lignées cellulaires provenant du cancer du pancreas

**PD-1** : Programmed Death 1

**PDGFR** : Platelet Derived Growth Factor Receptor

**PDGFR $\alpha$**  : Platelet-Derived Growth Receptor  $\alpha$

**PD-L1** : CD274

**PD-L1/2** : Programmed Death Ligand 1/2

**PD-L2** : CD273

**PH** : Plekstrin Homology

**PI3K** : Phosphatidylinositol-3-kinase

**PIP2** : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

**PIP3** : phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate

**PLX4032** : Vémurafénib

**PR** : particule régulatrice

**PSMD14** : 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14

**PTEN** : Homologue de la phosphatase et de le tensine

**PTX3** : long pentraxin 3

**RAF** : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

**RAS** : Rat Sarcoma virus

**RBR** : RING-InBetweenRing-RING

**RCPG** : Récepteur couplés aux protéines G

**RGP** : Radial Grow Phase

**RING** : Really Interesting New Gene

**ROCK** : Rho associated protein kinase

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**RTK** : Récepteur Tyrosine Kinase

RTU: Redox control of Translation by Ub

**SDF-1** : Stromal cell Derivated Factor 1

**SFM-DR** : Soluble Factor-Mediated Drug Resistance

**SOX10** : SRY-Box 10

**SPARC** : Secreted Protein Acidic Rich in Cysteine

**SRF** : Serum Response Factor

**SUMO** : Small Ubiquitin-related Modifier

**SUP** : système ubiquitine proteasome

**TAZ** : Transcriptional CoActivator With PDZ - Binding Motif

**TCGA** : The Cancer Genome Atlas

**TEAD** : TEA domain transcription factor

**TFM** : Traction Force Microscopy

**TGCA** : The Cancer Genome Atlas

**TGF- $\beta$**  : Tumor Growth Factor  $\beta$

**THBS1** : Thrombospondine 1

**TNF** : Tumor Necrosis Factor

**TUBEs** : Tandem Ubiquitin Binding Entities

**TYR** : tyrosinase

**TYRP1** : tyrosinase-related protein 1

**TYRP2** : tyrosinase-related protein 2

**Ub** : Ubiquitine

**UBA** : Ub Associated domain

**UBA6** : Ubiquitin-Like Modifier-Activating Enzyme

**UBDs** : Ubiquitin Binding Domain

**Ubl** : Ubiquitin Like proteins

**Ubls** : ubiquitin like proteins

**UCH** : Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase

**UIM** : Ub Interacting Motif

**USP** : Ubiquitin-specific protease

**UV** : Ultraviolet

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

**VGP** : Vertical Grow Phase

**WT** : wild type

**YAP1** : Yes Associated Protein 1

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

**$\alpha$ SMA** :  $\alpha$ -smooth muscle actin

# Introduction bibliographique

# I. Du mélanocyte au mélanome

## A. La peau

### 1) Anatomie

Avec une surface de 3 à 6m<sup>2</sup>, la peau est l'organe le plus large du corps humain et représente environ 5% du poids d'un individu. C'est un organe flexible qui va recouvrir toute la partie extérieure du corps constituant ainsi une barrière efficace entre l'organisme et son environnement direct. Ainsi la peau va protéger l'individu d'un grand nombre d'atteintes extérieures comme les infections, les blessures les rayons ionisants (ultraviolets). Elle va également permettre la thermorégulation du corps notamment en dissipant le surplus de chaleur via des glandes spécialisées (glandes sudoripares). La peau est également considérée comme un organe de réserve qui va permettre de maintenir l'homéostasie hydrique mais aussi stocker les graisses. C'est également un organe sensoriel complexe qui va pouvoir communiquer de nombreuses informations au cerveau (sens du toucher, douleur, température etc...).

La peau se subdivise en trois couches qui sont de la plus profonde à la plus superficielle : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Boer et al., 2016) (Fig1).

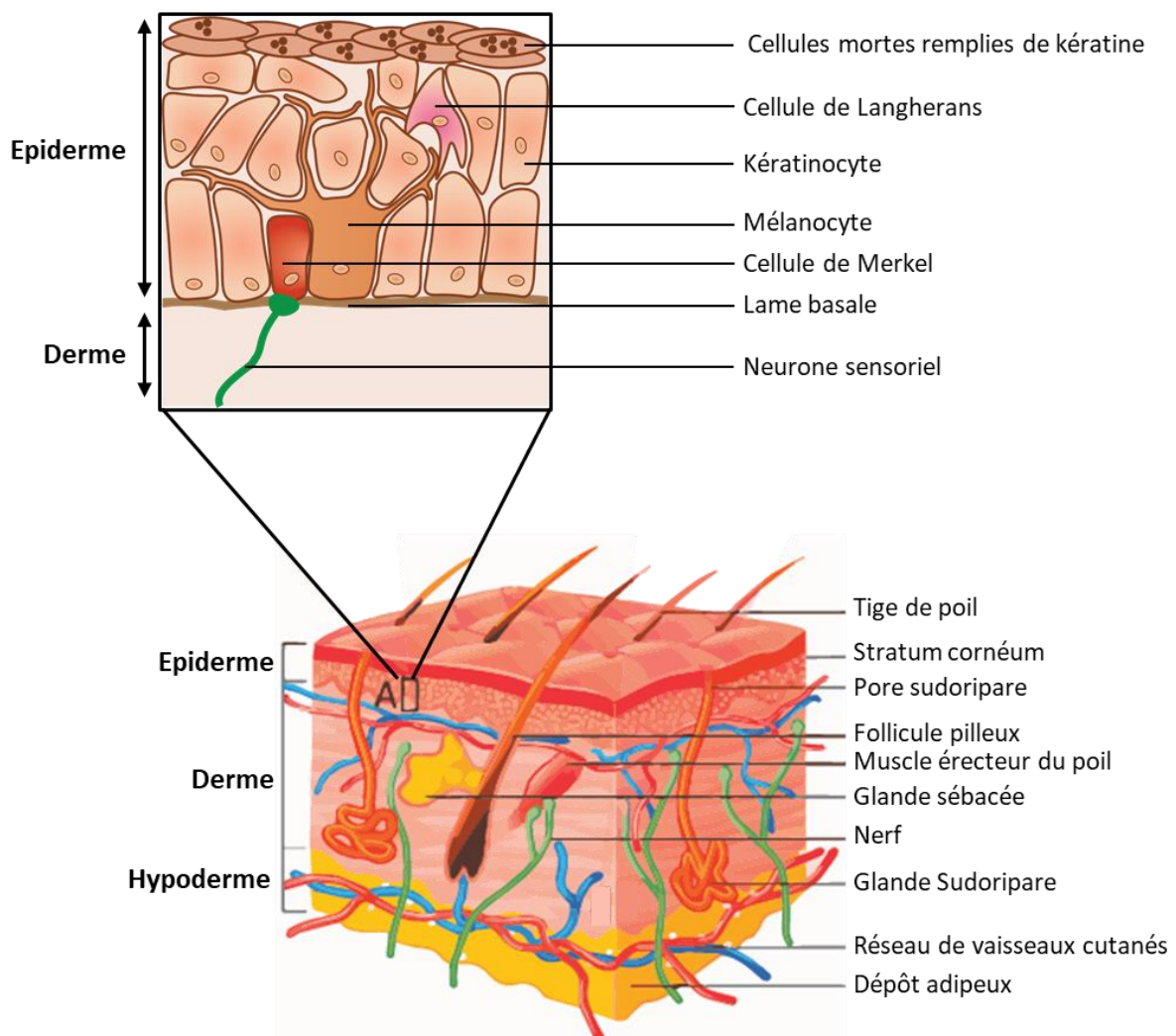


Figure 1 : Schéma représentant la structure de la peau et de l'épiderme  
Adapté de (Massella et al., 2019).



### *a) L'hypoderme*

L'hypoderme, constitue la couche la plus profonde de la peau. C'est un tissu conjonctif lâche et vascularisé d'origine mésoblastique. Ses propriétés mécaniques vont lui permettre de jouer un rôle d'amortisseur lors des chocs. Il va également servir de réserve graisseuse en raison des nombreuses cellules adipocytaires qui le composent. Cette caractéristique explique également son rôle d'isolant thermique.

### *b) Le derme*

Le derme est un tissu conjonctif plus dense qui va former la couche la plus épaisse de la peau (1 à 4mm). Cette couche correspond à la partie la plus vascularisée et innervée de la peau. Ainsi on va y trouver la plupart des terminaisons nerveuses qui vont être responsables des fonctions sensorielles tels que les différents corpuscules responsables du sens du toucher.

Le derme est composé en majorité par des fibroblastes qui vont produire la matrice extracellulaire (MEC) qui va jouer un rôle de charpente. Cette matrice est principalement composée de fibres de collagène, mais également de fibres d'élastine. Les types de collagène prédominants dans le derme sont les collagènes de type I et III. Cette matrice va jouer un rôle de charpente et donner au tissu son élasticité et sa solidité (Tobin, 2006).

### *c) L'épiderme*

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau et constitue la barrière de protection de l'organisme face à l'environnement extérieur. Cette couche repose sur la jonction dermo-épidermique ou membrane basale, une région acellulaire formée d'un réseau de fibre de collagène IV et de lamine. La membrane basale va jouer un rôle d'interface et de support entre le derme et l'épiderme (Yurchenco et al., 2004) (Fig1).

L'épiderme se divise en quatre couches, la première est formée par les cellules basales indifférenciées et prolifératives. Ces cellules vont donner naissance au type cellulaire majoritaire de l'épiderme : les kératinocytes (85% des cellules de l'épiderme) en se différenciant. Ensuite on va trouver le stratum spinosum contenant les kératinocytes connectés entre eux par des desmosomes. Ces cellules produisent la kératine, une protéine fibreuse conférant à l'épiderme sa qualité de barrière. On trouvera ensuite le stratum granulosum au sein duquel les kératinocytes poursuivent leur différenciation notamment en acquérant plus de kératine mais aussi en s'aplatissant. La dernière couche, le stratum cornéum qui va être formée principalement de kératinocytes ayant achevé leur processus de maturation appelé la kératinisation. Les kératinocytes présents dans cette couche sont dévitalisés, kératinisés et organisés et empilés verticalement sur 15 à 25 couches. Ils sont maintenus en place par un « ciment » riche en lipides.

## 2) Les autres types cellulaires de l'épiderme

### *a) Les cellules de Langherans*

Les cellules de Langherans (5% des cellules de l'épiderme) sont des cellules dendritiques ayant une fonction immunologique (Fig1). Elles sont dérivées des cellules souche hématopoïétique de la moelle osseuse. Elle constitue la première ligne de défense immunitaire de la peau face aux agressions extérieures. Ce sont des cellules présentatrices d'antigène très semblables aux macrophages tissulaires. Ainsi elles ont la capacité de phagocyter les pathogènes et d'en tirer des antigènes à

présenter au lymphocytes T mémoire de la peau ou de migrer au niveau des ganglions pour les présenter à des T naïfs.

#### *b) Les cellules de Merkel*

Les cellules de Merkel (2 à 5% des cellules de l'épiderme) sont localisées au niveau des cellules basales (Fig1). Leur propriété de mécanorécepteur explique leur forte présence au niveau des zones sensibles au toucher tels que les doigts ou les pieds (Boulais and Misery, 2007). Ces cellules sont également connectées aux kératinocytes via des jonctions desmosomes.

#### *c) Les mélanocytes*

Les mélanocytes sont les cellules responsables de la pigmentation de la peau. Ces cellules dérivent des mélanoblastes qui proviennent de cellules embryonnaires pluripotentes extrêmement migratrices de la crête neurale. Lors de la fermeture du tube neural, ces cellules vont migrer hors du tube neural et une fois la lame basale franchie, elles vont se différencier en mélanocyte. Les mélanocytes produisent les pigments mélaniques qui sont responsables de la couleur de la peau des yeux et des poils. Ces pigments vont également permettre de protéger l'organisme contre les rayonnements ionisants ultraviolets. Ce sont des cellules d'apparence dendritique, dont les dendrites vont s'étendre jusqu'au stratum spinosum servant ainsi de conduits pour distribuer les pigments aux kératinocytes (Fig1).

### B. Biologie du mélanocyte

#### 1) Mélanogénèse

Comme décrit précédemment, le mélanocyte est responsable de la pigmentation de la peau des poils et de la choroïde de l'œil via la production de mélanine. La mélanogénèse ou production de mélanine commence dans des organites spécialisés situés dans le cytoplasme des mélanocytes appelés mélanosomes. Le précurseur de la mélanine, la tyrosine va pouvoir être transformée en deux pigments mélaniques : l'eumélanine et la phéomélanine. Cette transformation va être catalysée au sein du mélanosome par trois enzymes clés : la tyrosinase (TYR), la tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) et la DOPchrome tautomérase/tyrosine related protein 2 (TYRP2). Dans un premier temps, TYR va catalyser la formation de DOPAquinone à partir de la tyrosine. L'action successive de la TYRP2 puis de TYRP1 va permettre de générer l'eumélanine à partir de la DOPAquinone. C'est l'eumélanogénèse qui va donner un pigment de couleur brun/noir. Quant à elle, la phéomélanine qui est plutôt de couleur rouge/jaune sera obtenue grâce à l'incorporation de soufre issu de la cystéine (Hearing, 2011). C'est le ratio entre ces deux pigments qui détermine le phototype cutané. L'exposition au soleil et plus précisément aux rayons UV va pouvoir stimuler la synthèse pigmentaire grâce au dialogue constant établi entre les mélanocytes et les kératinocytes. Lorsque ces derniers reçoivent des dommages à l'ADN à cause des UV, ils vont sécréter de l' $\alpha$ MSH ( $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone) de façon p53 dépendante. L' $\alpha$ MSH va être reconnu par son récepteur à la surface des mélanocytes : MC1R (Melanocortin 1 Receptor) ce qui va déclencher la synthèse de mélanine via l'expression du « master regulator » de la mélanogénèse : le facteur de transcription MITF (Microphthalmia-Associated Transcription Factor) (Shain and Bastian, 2016).

## 2) Rôle de la pigmentation

Les mélanosomes sont ensuite distribués aux kératinocytes via les dendrites des mélanocytes. Ce mouvement intracellulaire est rendu possible par la présence de microtubules et de filaments d'actine au niveau des extensions cytoplasmiques mélanocytaires (Cichorek et al., 2013). Les microtubules sont situés au centre des dendrites et servent au transport longue distance des mélanosomes tandis que les fibres d'actine permettent le transfert de ces derniers aux kératinocytes. En plus de leur rôle de pigments les propriétés physico-chimiques vont lui permettre de protéger la cellule des dommages induits par les rayons UV. En effet, une fois à l'intérieur du kératinocyte, les mélanosomes sont placés en position périnucléaire pour protéger le matériel génétique contre les rayonnements ionisants.

## C. Cancers de la peau et mélanome

La diversité cellulaire au sein de la peau va être à l'origine de divers cancers issus de la transformation maligne de ces cellules. Ces cancers peuvent être divisés en deux catégories, les non-mélanocytaires et les mélanocytaires.

### 1) Les différents types de cancers non-mélanocytaires

-Les carcinomes basocellulaires se développent à la suite de la transformation maligne des cellules basales de l'épiderme. C'est le cancer de la peau plus fréquent (environ 70% des cancers de la peau), mais aussi le moins grave grâce à son potentiel métastatique très faible. Le traitement se fait par exérèse chirurgicale.

-Les carcinomes épidermoïdes ou spinocellulaires se développent à partir des kératinocytes du stratum spinosum. Ils ne représentent qu'environ 20% des cancers de la peau. Ils se caractérisent par une croissance lente et peuvent développer un potentiel métastatique contrairement aux carcinomes basocellulaires.

-D'autres cancers, bien plus rares, peuvent se développer à partir des cellules de Merkel ou encore des annexes de la peau (glandes sudoripares, follicules pileux etc...).

### 2) Généralités sur le mélanome

Le mélanome est le seul cancer de la peau de type mélanocytaires, c'est aussi le plus agressif. En effet il est responsable d'environ 10% des cancers de la peau mais de 80% des décès qui y sont associés. Le mélanome peut se développer à partir d'un grain de beauté ou naevus dans 20 à 30% des cas, ce qui veut dire qu'il se développe plus fréquemment à partir d'un mélanocyte *de novo* (Cymerman et al., 2016). C'est un cancer qui va rapidement évoluer et utiliser le système lymphatique et/ou sanguin pour former des tumeurs secondaires. Ce cancer très hétérogène, est caractérisé par sa forte plasticité cellulaire à l'origine d'un fort potentiel métastatique et d'une propension à résister au traitement.

D'après le centre international de recherche sur le cancer (CIRC), en 2020, 325 000 diagnostics de mélanome ont été posés et 57 000 personnes sont mortes de la maladie. Une étude alarmante du CIRC prédit une augmentation de plus de 50% du nombre de nouveaux cas et de décès dus au mélanome d'ici 2050 (Arnold et al., 2022). En France l'institut national du cancer (INCA) dénombre 15 500 nouveaux cas pour 1980 décès durant l'année 2018. Ces chiffres sont en nette augmentation depuis 2010 avec une augmentation de l'incidence de 3,4% pour les hommes et de 2,4% pour les femmes.

Le mélanome cutané est en général de bon pronostic s'il est diagnostiqué et pris en charge rapidement. En effet sa localisation au niveau de la peau permet de le diagnostiquer facilement et de façon non

invasive. Pour faciliter la détection du mélanome, la règle ABCDE a été mise en place, chaque lettre correspondant à un signe caractéristique d'une lésion à risque. A pour asymétrie, B pour bords irréguliers, C pour apparition de couleurs différentes, D pour diamètre (<6mm) et E pour évolution. Ces critères permettent un auto-dépistage efficace d'une lésion problématique mais seule l'analyse histopathologique peut confirmer le diagnostic (Rastrelli et al., 2014).

Malgré cela, un dépistage tardif réduit drastiquement les chances de guérison à cause du fort potentiel métastatique du mélanome cutané.

#### D. Facteurs de risque du mélanome

Le mélanome est un cancer multifactoriel qui va résulter de différents facteurs de risques extrinsèques comme l'exposition aux rayonnements UVs et intrinsèques comme le phototype.

##### 1) Facteurs de risques intrinsèques

Ces sont les facteurs de risques qui sont constitutifs de l'individu. Comme décrit plus haut, 20 à 30% des mélanomes se développent à partir d'un naevus. Il y a donc une relation entre le nombre, la taille, le type de nævi et le risque de développer un mélanome. Ainsi la présence de plus de 50 nævi ou d'au moins 5 nævi atypique de grande taille, (<5mm de diamètre, bord irrégulier, multiple couleurs) peut multiplier par 5 le risque de développer la maladie (S et al., 2005).

Le phototype qui est une caractéristique génétique va influencer la susceptibilité au mélanome. En effet le phototype prédit la réaction de la peau à l'exposition solaire. Ainsi un phototype faible (peau claire, taches de rousseur, yeux clairs etc...à) est plus sensible aux effets délétères des rayonnements ionisants par exemple les américains d'origine caucasienne sont 20 fois plus sujets au développement d'un mélanome que les américains d'origine africaine (Gorantla and Kirkwood, 2014).

La prédisposition génétique est aussi un facteur de risque puisqu'approximativement 10% des mélanomes surviennent dans un contexte familial. Même si la majorité des altérations génétiques dans le mélanome se développent de façon somatique, la présence de certains gènes héréditaires de susceptibilité jouent un rôle dans l'apparition de la maladie. Ainsi certains gènes héréditaires à forte pénétrance jouant un rôle dans la prédisposition au mélanome ont pu être identifiés. Par exemple on retrouve CDKN2A (Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor 2A) ou encore CDK4 (Cyclin-Dependant Kinase 4), mais aussi BAP1 (BRCA1 Associated Protein 1) qui quant à lui est associé au mélanome de l'uvéa (Read et al., 2016; Tsao and Niendorf, 2004).

##### 2) Facteurs de risques extrinsèques

L'exposition aux rayonnements ultraviolets est le facteur de risque environnemental prédominant pour le développement du mélanome. Les données épidémiologiques lient l'apparition du mélanome à des coups de soleil répétés dans la petite enfance, mais aussi à l'âge adulte. En effet l'absorption par la peau des UV va s'accompagner de lésion cellulaire importante notamment au niveau de l'ADN. Mécanistiquement, les propriétés ionisantes des rayons UV peuvent entraîner la liaison covalente entre la cytosine et la thymine formant un dimère cyclobutinique. Ce dimère pyrimidique va bloquer la progression des ADN polymérase  $\delta/\epsilon$ . Les UV sont également capables de générer des espèces réactives de l'oxygène qui seront également responsables de dommages cellulaires (Ridley et al., 2009).

## E. Progression du mélanome

Le mélanome comme son nom l'indique provient de la transformation maligne du mélanocyte, c'est ce que l'on appelle la mélanomagénèse. Cette transformation va survenir via l'accumulation de mutations génétiques qui vont permettre l'acquisition de capacité proliférative, migratrice et d'échappement du système immunitaire. Lors de son développement, le mélanome va suivre plusieurs étapes qui sont décrites dans le modèle de Clark (Clark et al., 1969) (Fig2).

Stade	Naevus bénin	Naevus dysplasique	Phase de croissance radiale	Phase de croissance verticale	Mélanome métastatique
					Métastases aux poumons ou au cerveau
Phénotype	Bénin sénescence	Précancéreux Lésions pouvant régresser Atypies aléatoires	Différenciation diminuée Hyperplasie limitée Prolifération clonale	Formation de tumeur Prolifération Transition pseudo EMT Traversée de la lame basale Invasion	Dissociation de la tumeur primaire Intravasation Extravasation Formation de tumeurs secondaires
Signatures moléculaires	BRAF NRAS NF1	PTEN CDKN2A		E Cadhérine N Cadhérine Intégrine αV6 MMP2 Survivine	

Figure 2 : Schéma représentant les étapes et processus mis en jeu lors du développement du mélanome

Schéma illustrant les étapes de la progression du mélanome avec différentes altération génétique retrouvée à chaque étape. En rouge les gène muté ou surexprimés, en vert les gènes dont l'expression diminue ou qui présentent une mutation perte de fonction. (Miller and Mihm, 2006)

### 1) Phase horizontale de croissance

Tout d'abord le mélanome va se développer à partir d'un naevus préexistant ou *de novo* à partir d'un mélanocyte dans ce que ce modèle appelle la phase de croissance horizontale (Radial Growth phase ou RGP). Durant cette phase les cellules de mélanome acquièrent leur capacité proliférative et commencent à former une tumeur primaire au sein de l'épiderme. A cette étape les cellules n'ont pas encore acquis la capacité de traverser la jonction dermo-épidermique. Un mélanome en RGP est donc toujours un bon candidat pour une exérèse chirurgicale (Fig2).

### 2) Phase verticale de croissance

Les cellules de mélanome vont ensuite acquérir la capacité d'envahir le derme sous-jacent et entrer dans la phase verticale de croissance (Vertical Growth Phase ou VGP). Les cellules acquièrent ce phénotype invasif/dédifférentié via la réactivation d'un processus embryonnaire qui ressemble à la transition épithélio-mésenchymateuse (Caramel et al., 2013; Hoek et al., 2006). A terme, ce

mécanisme permet aux cellules d'atteindre le système lymphatique et le système vasculaire pour entrer en phase métastatique. Ce mécanisme augmente l'hétérogénéité intra-tumorale au sein de la tumeur primaire (Fig2).

### 3) Phase métastatique

Cette phase constitue la phase terminale de la maladie, à ce stade le pronostic est très mauvais pour le patient. Au cours de cette phase, les nutriments et l'oxygène commencent à manquer dans la tumeur primaire. Les cellules vont sécréter des facteurs solubles comme le VEGF pour promouvoir entre autres l'angiogenèse tumorale. A ce stade les cellules de mélanome peuvent également rejoindre le système lymphatique et la circulation sanguine afin de former des métastases (Liu et al., 2014). La littérature décrit un tropisme du mélanome pour les poumons, le foie, le cerveau, mais aussi les ganglions lymphatiques. A ce sujet, notre laboratoire a récemment montré que les cellules de mélanome présentant un phénotype dédifférencié/invasif sécrètent des facteurs solubles dont le rôle est de rendre plus permissif le ganglion. Ce mécanisme permet de produire une niche métastatique favorable à l'installation des cellules tumorales (Rovera et al., 2022) (Fig2).

## F. Mutations initiatrices et voies de signalisation altérées du mélanome

### 1) Mutations impactant la voie des MAPK

Lorsqu'il se transforme, le mélanocyte acquiert des propriétés prolifératives. Souvent cette transformation aboutit à la suractivation de la voie des MAPK. Cette voie est constituée de sérine/thréonine kinases conservées dans l'évolution. Elle va être importante dans de nombreux processus cellulaires tel que la prolifération, la motilité, la différenciation, la survie ou l'apoptose (Zhang and Liu, 2002). L'activation de la voie se fait par différents stimuli extracellulaires. Ces stimuli comprennent des facteurs de croissance, des facteurs mitogènes des cytokines ou encore des facteurs de stress. L'activation se traduit par une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation de facteurs de transcription spécifiques. La famille des MAPKs se compose de 3 cascades distinctes activant les kinases suivantes que l'on nomme les MAPK :

- Les ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinases)
- Les JNKs
- Les p38 kinases

Pour toutes les MAPK le mécanisme d'activation reste le même. Le stimulus extérieur se fixe sur des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (RTK) qui en retour vont activer une MAP3K ou MAP3Kinase. Cette kinase va phosphoryler une MAP2K ou MAP2Kinase qui en retour phosphorylera la MAPKinase qui est l'effecteur final de la voie.

C'est la voie qui va impliquer ERK-1/2 qui est la voie la plus impliquée dans la progression du mélanome. En temps normal une petite protéine G de la famille RAS, va recruter et activer une MAP3K de la famille RAF (A-RAF, B-RAF ou C-RAF) au niveau de son domaine de liaison à RAS/GTP. La kinase RAF va ensuite phosphoryler la MAP2K MEK1/2 qui va en retour phosphoryler ERK1/2. Il existe environ 160 substrats pour ERK qui vont notamment réguler la prolifération, la différenciation, la motilité et la progression dans le cycle cellulaire (Shaul and Seger, 2007; Yoon and Seger, 2006) (Fig3A).

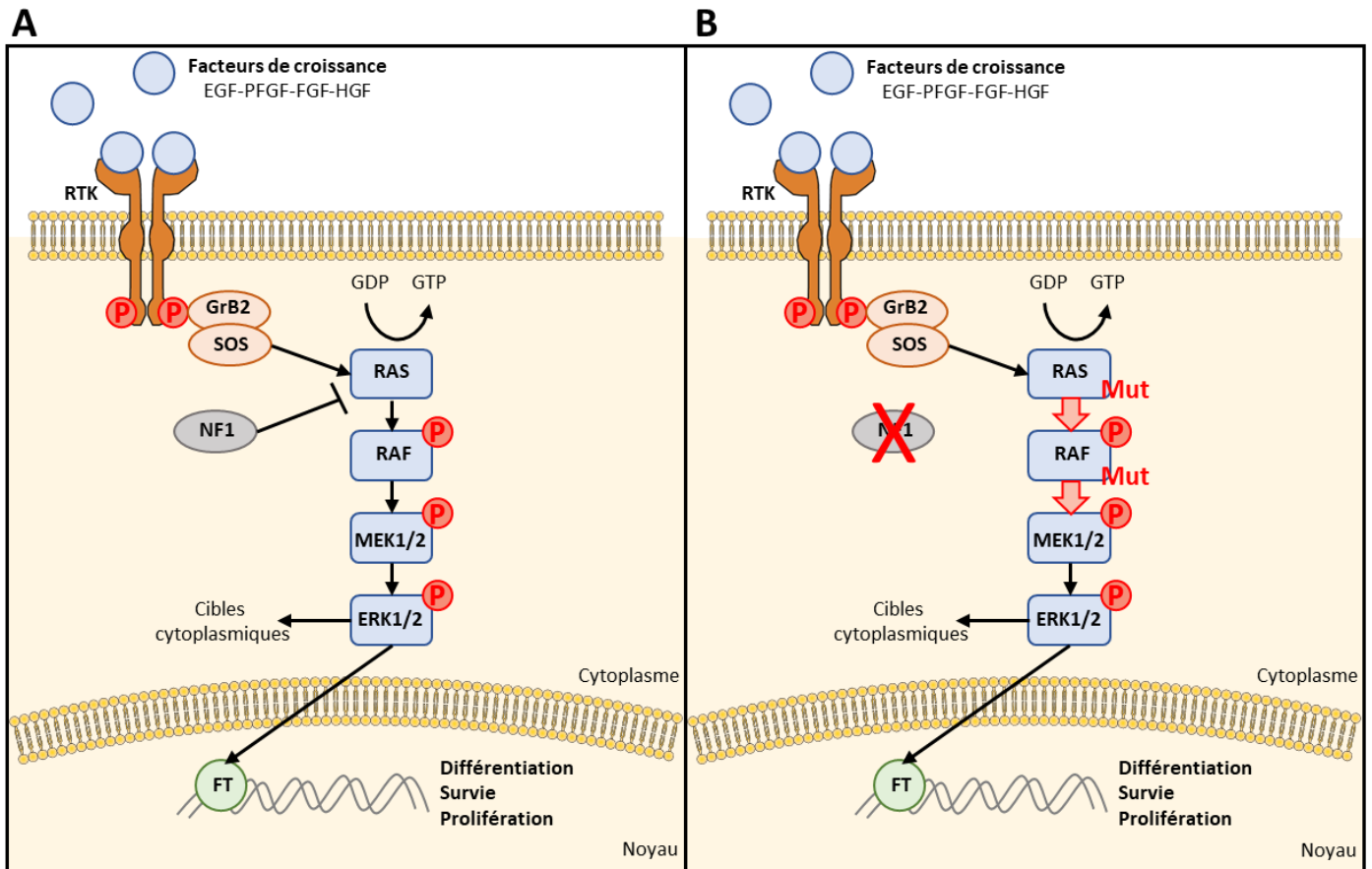


Figure 3 : Schéma illustrant la voie des MAPK

A. Voie des MAPK en conditions physiologique. B. Voie des MAPK dans le mélanome

Grâce aux données du TCGA (The Cancer Genome Atlas) le mélanome a été classé en 4 groupes distincts en fonction de la mutation retrouvée au sein des cellules de la tumeur (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Les trois premiers groupes représentent environ 80% des mélanomes et ont la caractéristique commune d'induire une activation constitutive de la voie des MAP-Kinases (MAPK = Mitogen Activated Protein Kinase). Ce sont les mélanomes mutés sur les gènes BRAF, NRAS et NF1. Le dernier groupe concerne les tumeurs qui ne portent aucune des trois mutations précédentes.

- **BRAF** est une kinase de la voie des MAPK dont la mutation est retrouvée dans 50% des mélanomes cutanés. Elle fait partie de la famille des RAF kinases (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) qui est composée de 2 autres membres : A-RAF et C-RAF. Dans le mélanome, la substitution de la valine 600 par un acide glutamique est la mutation la plus fréquente pour l'oncogène BRAF ( $BRAF^{V600E}$ ) qui est située dans le segment d'activation du domaine kinase. Cette substitution induit donc une activation constitutive de BRAF et de la voie des MAPK en aval (Davies et al., 2002). Il existe d'autres mutations de BRAF touchant la valine 600 comme  $BRAF^{V600K}$  et  $BRAF^{V600D}$  qui elles aussi augmentent l'activité de la kinase (Ad et al., 2013). Cependant la mutation  $BRAF^{V600E}$  n'est pas suffisante pour induire une transformation tumorale. Pour achever sa transformation, la cellule devra donc acquérir des mutations secondaires (Fig3B).
- **NRAS** fait partie de la super famille des petites GTPases comprenant les Ras, les Rho, les Rac les Ral et Cdc42. L'altération du codon 61 est la mutation la plus fréquente de NRAS retrouvée dans environ 20% des mélanomes (Q61R et Q61K) (Platz et al., 2008). Cette mutation va réduire l'activité GTPase intrinsèque et donc les activer constitutivement. Comme NRAS se

trouve en amont de RAF/MEK/ERK, sa mutation va conduire à l'activation constitutive de la voie. De plus on peut noter que la mutation NRAS est également un activateur de la voie des PI3K (Phosphoinositide-3 Kinase) (Fig3B).

- **NF1** code pour la neurofibromine qui fait partie de la famille des GAP (GTPase-activating proteins). Son rôle va être de catalyser l'hydrolyse de RAS-GTP en RAS-GDP, ce qui en fait un inhibiteur de l'activité des protéines RAS. Elle se place donc en amont de la voie des MAPK en régulant négativement son activation. Dans le mélanome les mutations touchant NF1 sont soit des mutations pertes de fonction, soit des délétions. Dans les deux cas elles vont entraîner une augmentation de l'activité de RAS et de ses effecteurs dans la voie des MAPK mais aussi de PI3K/AKT. Ces mutations se retrouvent dans environ 14% des mélanomes cutanés (Andersen et al., 1993).

## 2) Groupe des triples négatifs

Le groupe triple négatif ou triple WT (« wild type ») regroupe tous les mélanomes qui ne présentent pas de mutation sur BRAF, NRAS ou NF1. Dans ce groupe on trouve des mutations pouvant entraîner l'activation de la voie des PI3K/AKT comme des amplifications de PDGFR $\alpha$  (Platelet-Derived Growth Receptor  $\alpha$ ) et VEGFR2 (Vascular Endothelial Factor Receptor 2). Ou encore des amplifications de régulateurs du cycle cellulaire comme CDK4.



### 3) Voie PI3K/AKT

Cette voie joue un rôle essentiel dans la cellule en régulant entre autres la survie, la différenciation et la prolifération (Liu et al., 2009). La voie des PI3K permet la transduction du signal de nombreux stimuli extracellulaires (facteur de croissance, facteur de stress, cytokines) à l'aide RTK ou de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs vont catalyser une phosphorylation activatrice sur la PI3K qui en retour va s'hétérodimériser et phosphoryler le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> va permettre le recrutement d'AKT à la membrane qui sera activée par phosphorylation via PDK1 et PDK2. En aval, AKT va pouvoir activer directement ou indirectement des protéines responsables des nombreux processus cellulaires décrits ci-dessus. Dans de nombreux cancers incluant le mélanome, cette voie de signalisation est dérégulée (Madhunapantula et al., 2011) (Fig4).

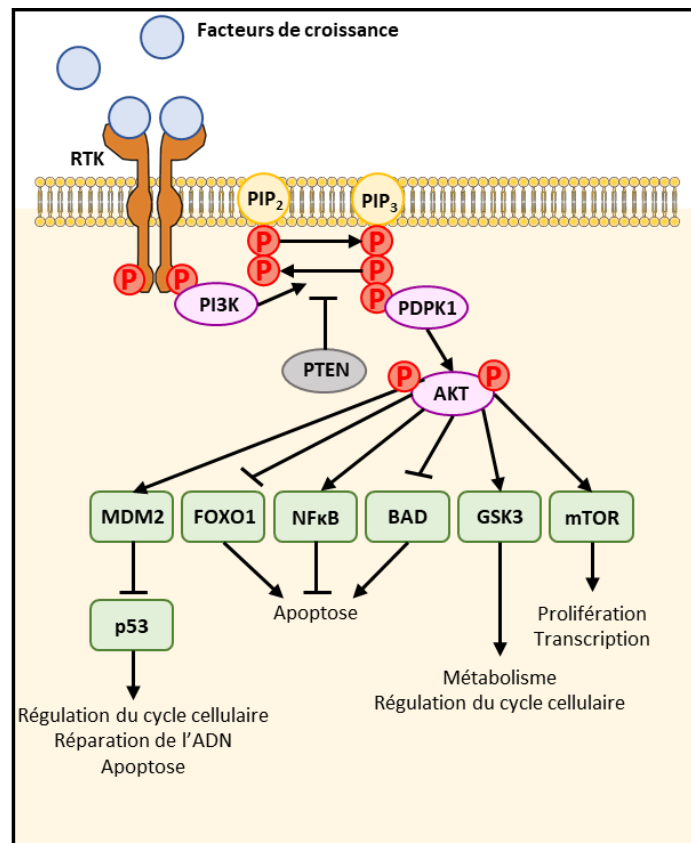


Figure 4 : Schéma illustrant la voie PI3K/AKT

Dans 10 à 30% des mélanomes on observe une perte de fonction de PTEN qui est un régulateur négatif de la voie des PI3K (Wu et al., 2003). Cette perte de fonction entraîne une activation constitutive de la voie dans le mélanome. Les altérations de PTEN sont majoritairement trouvées dans les mélanomes mutés BRAF (environ 20% des patients porteur de la mutation BRAF<sup>V600E</sup>).

Dans environ 50% des mélanomes, on retrouve une surexpression de l'isoforme AKT3 (Stahl et al., 2004). De plus la phosphorylation d'AKT3 est corrélée avec la progression du mélanome. En effet le mélanome métastatique présente un plus fort taux d'expression que les mélanomes primaires par exemple. Cette suractivation d'AKT3 est un mauvais pronostic dans le mélanome (Dai et al., 2005).

#### 4) Autres voies altérées

D'autres voies peuvent également être impliquées dans la progression du mélanome. Entre autres C'est notamment le cas de la voie en aval du gène CDKN2A qui régule la prolifération et l'entrée dans le cycle cellulaire. Ces mutations peuvent coopérer avec les mutations BRAF et NRAS sous forme de mutation secondaire pour achever la transformation maligne du mélanocyte (Kannan et al., 2003). Des mutations sur le gène CDK4 dans les mélanomes familiaux vont également affecter le cycle cellulaire (Rane et al., 2002).

Des travaux du laboratoire montrent que la voie NF-κB canonique peut être activée par la sécrétion de PTX3 (long pentraxin 3) (Rathore et al., 2019). Nous montrons également une régulation de la voie NF-κB non canonique par les récepteurs du collagène DDR (récepteur à domaine discoïdine)(Berestjuk et al., 2022).

## G. L'hétérogénéité des cellules de mélanome

Tout au long du développement tumoral, les cellules de mélanome font preuve d'une remarquable plasticité qui explique la grande hétérogénéité du mélanome. Premièrement, cette hétérogénéité s'observe entre les patients dont les tumeurs évolueront différemment en fonction du contexte environnemental et génétique. Deuxièmement, la tumeur en elle-même va présenter une très forte hétérogénéité. Elle sera également bien souvent différente des tumeurs secondaires qui auront changé leur programme transcriptionnel ou acquis de nouvelles mutations. La littérature nous montre que les profils transcriptomiques des cellules vont dépendre de la progression, du traitement et de la résistance des cellules.

### 1) Plasticité phénotypique

La plasticité cellulaire du mélanome permet l'acquisition de changements phénotypiques, fournissant des capacités de survie, de prolifération, de dissémination et d'adaptation aux cellules de mélanome. Ce phénomène appelé plasticité phénotypique permet aux cellules de transiter d'un phénotype à un autre en modifiant son programme transcriptionnel de façon réversible (Hoek et al., 2006). Les cellules de mélanome sont ainsi capables de passer d'un phénotype prolifératif vers un phénotype invasif afin de s'adapter au mieux à son environnement immédiat. Ce « switch phénotypique » présente des caractéristiques communes avec la transition épithélio-mésenchymateuse que peuvent subir les cellules de cancer épithéliaux. Cette capacité d'osciller entre les phénotypes et qui ne dépend pas du statut mutationnel est une belle illustration de la haute plasticité du mélanome (Fig5).

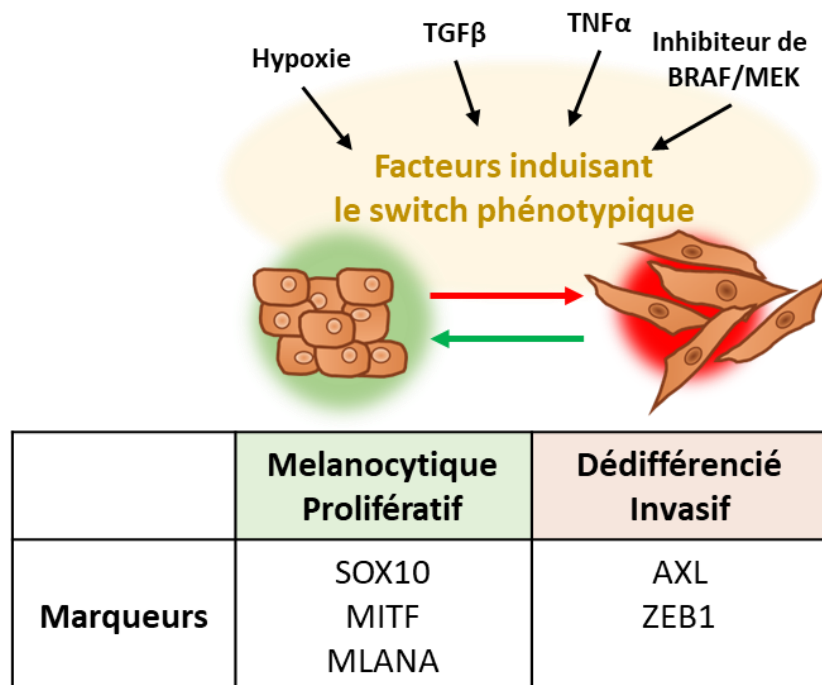


Figure 5 : Le Switch phénotypique

En haut illustration non exhaustive des facteurs pouvant induire le switch phénotypique. Au milieu, illustration des différences de morphologie entre les cellules mélanocytaires et les cellules dédifférenciées. En bas, tableau illustrant les marqueurs caractéristiques des deux populations

Cette hétérogénéité est marquée par une différence dans l'expression de certains gènes. Ainsi les cellules qui expriment fortement les facteurs de transcription MITF et SOX10 sont prolifératives, expriment des marqueurs de différenciation comme MLANA et sont peu invasives. Les cellules qui expriment ces marqueurs mélanocytaires sont fortement prolifératives, peu invasives et sont sensibles aux thérapies ciblées (Müller et al., 2014). On parle alors de cellules différenciées mélanocytiques (Fig5).

A l'inverse les cellules qui présentent une faible expression de MITF vont être caractérisées par un phénotype invasif/dédifférencié. Au contraire des cellules mélanocytiques, les cellules de mélanome présentant ce phénotype vont être peu prolifératives (Fallahi-Sichani et al., 2017). Cette capacité proliférative réduite les rend également moins sensibles à l'arrêt de prolifération provoqué par les thérapies ciblées. Elles vont exprimer des marqueurs mésenchymateux comme ZEB1, la Ncadhérine et AXL. Ces cellules seront également moins sensibles aux thérapies ciblées grâce à l'expression de AXL. En effet AXL permet d'activer la voie PI3K/AKT permettant à la cellule de contourner l'inhibition de la voie des MAPK (Müller et al., 2014; Verfaillie et al., 2015) (Fig5).

En 2018, une étude ajoute de la complexité à ce modèle binaire en mettant en évidence 4 populations de cellules de mélanome (Tsoi et al., 2018). La première population, C1, regroupe les cellules indifférenciées invasives et pro inflammatoires. La population C2 comprend les cellules exprimant des marqueurs communs avec leurs ancêtres embryonnaires de la crête neurale. La population C4 rassemble les cellules présentant le phénotype différencié le plus proche du mélanocyte et l'expression de marqueurs de pigmentation. La population C3 quant à elle se situe à l'interface entre la population C2 et C3. Ces populations sont caractérisées par une ouverture différentielle de leur chromatine qui les rend semblables aux mélanocytes pour les plus différenciés ou aux fibroblastes pour les moins différenciés (Verfaillie et al., 2015).

Récemment, 4 nouvelles sous-populations en réponse aux thérapies ciblées ont été identifiées par une approche de séquençage ARN sur cellule unique dans un modèle de xéno greffe de cellules de patients chez la souris (Rambow et al., 2018).

## 2) Facteurs d'induction de la plasticité phénotypique

Le switch phénotypique peut être contrôlé comme on vient de le voir par l'expression de certains gènes, mais il peut également être sous le contrôle du microenvironnement. Par exemple la présence de facteurs de croissance tel que le TGF $\beta$  produit par les fibroblastes associés au cancer (CAFs) est décrit pour induire la transition phénotypique des cellules de mélanome par exemple via la voie YAP/TAZ (Miskolczi et al., 2018). En plus des facteurs solubles le microenvironnement détermine également l'accès de la tumeur à l'oxygène et aux nutriments. En condition hypoxique la littérature décrit que les cellules de mélanome vont présenter un phénotype dédifférencié avec une diminution de l'expression de MITF ROS dépendante (Cheli et al., 2012) (Fig5).

Paradoxalement, les thérapies ciblées peuvent induire le passage d'un phénotype prolifératif sensible au traitement à un phénotype invasif et résistant au traitement. Ce phénomène est gouverné par une reprogrammation transcriptionnelle et sera transitoire sur des périodes de traitement courtes. Une étude récente de notre laboratoire montre que l'induction d'un cluster de mir par les inhibiteurs de BRAF et de MEK gouverne la transition phénotypique via l'expression de fascin1 (Diazi et al., 2022). Lorsque les cellules perdent l'expression de cette protéine elles transitionnent d'un phénotype mélanocytique sensible au traitement vers un phénotype invasif résistant et vice-versa (Fig5).

## H. La prise en charge thérapeutique du mélanome

Comme on a pu le voir le traitement du mélanome cutané va en grande partie dépendre de l'avancement de la pathologie. Tant que le mélanome n'a pas envahi le derme et n'est pas capable de métastaser, le pronostic reste très bon après exérèse chirurgicale de la tumeur primaire (Conic et al., 2018).

Malheureusement, une fois le mélanome passé en phase verticale de croissance avec l'envahissement du derme, le pronostic devient plus sérieux. Enfin lorsque le mélanome commence à former des métastases, le pronostic vital est engagé. En effet lorsqu'il est diagnostiqué à un stade métastatique tardif, le taux de survie à 5 ans des patients avoisine les 15%.

Avant la découverte de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> et la révolution des thérapies ciblées reposant sur des inhibiteurs spécifiques de cette kinase les traitements disponibles étaient peu efficaces. En effet jusqu'en 2010, les seuls traitements étaient des chimiothérapies avec notamment des agents alkylants de l'ADN ou l'utilisation d'interleukine-2 à forte dose. L'efficacité de ces traitements était relative avec un taux de réponse qui ne dépassait pas les 10% et aucune amélioration du taux de survie (Eggermont and Kirkwood, 2004).

De nos jours, avec l'avènement des thérapies ciblées en 2012 rejointes en 2015 par les immunothérapies, le traitement va dépendre de la présence de l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> chez les patients présentant un mélanome au stade avancé et non résecable. Ainsi les patients porteurs de cet oncogène seront traités avec les thérapies ciblées qui sont des inhibiteurs de BRAF<sup>V600E</sup> et de MEK. Malgré l'efficacité du traitement l'apparition de résistances est presque systématique. Par conséquent les patients qui développent des résistances et les patients ne portant pas de mutation sur BRAF seront traités avec les immunothérapies qui sont de meilleur pronostic sur le long terme. Récemment ce dogme commence à changer et on pourra administrer des immunothérapies en première ligne sur des patients mutés BRAF présentant une progression tumorale lente pour bénéficier du pronostic à long terme plus avantageux de ce type de thérapies (Bai and Flaherty, 2021) (Fig6).

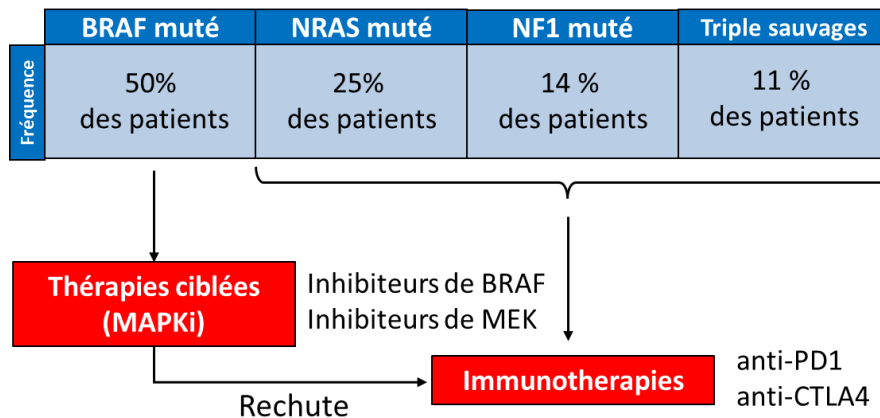


Figure 6 : Traitements actuels du mélanome en fonction du statut mutationnel

### 1) Emergence des thérapies ciblées

Avec l'identification de la mutation BRAF<sup>V600E</sup> le traitement du mélanome a connu une véritable révolution. En effet, cette découverte a entraîné le développement d'inhibiteurs agissant sur la forme mutée de BRAF. Ces inhibiteurs sont des antagonistes spécifiques et réversibles de la liaison de BRAF<sup>V600E</sup> à l'ATP inhibant au passage l'activité kinase (Waizenegger et al., 2016). Actuellement, il existe deux inhibiteurs de BRAF avec une autorisation de mise sur le marché : le PLX4032 ou Vémurafénib et le GSK2118436 ou dabrafénib. En 2010, de premières études avec le Vémurafénib montrent une augmentation significative de la survie des patients (de 1,6 à 6,9 mois) avec un taux de réponse de 70% (Chapman et al., 2011). Malgré l'avancée significative que constitue le Vémurafénib, il existe de nombreux effets secondaires avec notamment le risque de développer un carcinome épidermoïde (McArthur et al., 2014; Young et al., 2012). Le Dabrafénib quant à lui a reçu son AMM deux ans après le Vémurafénib et semble posséder un meilleur potentiel antitumoral avec moins d'effets secondaires cancérogènes (Hauschild et al., 2012).

Bien que l'efficacité de ces inhibiteurs soit impressionnantes chez les patients, la durée de la réponse reste limitée à cause de l'émergence de résistances 6 à 8 mois après le début du traitement (Finn et al., 2012).

### 2) La combothérapie

Il est fréquent d'observer une réactivation de la voie de MAPK en réponse aux inhibiteurs de BRAF. C'est la raison pour laquelle des inhibiteurs de l'effecteur direct BRAF : MEK ont été développés. Un premier essai clinique a pu déterminer que l'utilisation d'inhibiteurs de MEK seuls bien que montrant une efficacité accrue par rapport aux chimiothérapies classiques se révèle inférieur aux inhibiteurs de BRAF (Flaherty et al., 2012).

Ainsi la combinaison d'inhibiteurs de BRAF et de MEK a été envisagée pour contourner le problème de la réactivation de la voie de MAPK. Un premier essai clinique concluant combinant le Dabrafénib avec un inhibiteur de MEK : le Tramétinib montre une augmentation significative de la survie sans progression lorsque l'on compare la combothérapie au Dabrafénib seul (de 8,8 mois à 11 mois) (Long et al., 2015). La combinaison du Vémurafénib et d'un autre inhibiteur de MEK : le Cobimétinib donne des résultats similaires lorsqu'elle est comparée au Vémurafénib seul (de 6,2 à 9,9 mois). L'utilisation de la combothérapie améliore non seulement le taux de réponse des patients mais également leur qualité de vie puisqu'elle génère moins d'effets secondaires.

En 2018 un nouveau couple d'inhibiteurs de BRAF et de MEK : l'Encorafénib et le Binimétinib montre une efficacité encore accrue d'environ 33 mois pour 17 mois avec le Vémurafénib. De plus ce nouveau couple d'inhibiteur se révèle moins toxique en termes d'effets secondaires que les autres couples (Dummer et al., 2018).

De nos jours, ces trois couples d'inhibiteurs constituent le traitement de première ligne contre les patients porteurs de l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> et présentant des tumeurs à croissance rapide mettant en jeu le pronostic vital si elles ne sont pas rapidement arrêtées. Malgré cet état de fait, l'apparition de résistances constitue toujours un obstacle majeur à la guérison et les patients non porteurs de la mutation BRAF<sup>V600E+</sup> sont laissés de côté par ces thérapies.

### 3) L'immunothérapie

Le système immunitaire est essentiel dans la surveillance tumorale. En effet les cellules immunitaires sont censées reconnaître et détruire les cellules anormales ou tumorales. Malgré cela, l'échappement immunitaire est une caractéristique présente dans la plupart des cancers mélanome inclus (Hanahan and Weinberg, 2011). Ces cellules vont par exemple détourner à leur avantage certains mécanismes immunologiques pour diminuer l'infiltration de cellules tumorales au sein de la tumeur. Elles vont par exemple pouvoir produire des médiateurs immunosuppresseurs ou encore modifier la présentation des antigènes (Vinay et al., 2015). Mais de façon intéressante elles sont capables de prendre avantage de système de frein immunologique comme la voie CTLA-4 ou le couple ligand-récepteur PD-1/PD-L1 (Programmed Death Ligand 1) qui induisent l'inactivation du système immunitaire. On appelle ces voies les points de contrôle immunitaire ou « immune checkpoint ». Le rôle physiologique de ces voies de signalisation est d'éviter l'apparition de réactions auto-immunes ainsi que la perte de contrôle de la réaction immunitaire.

C'est dans l'idée d'empêcher les cellules tumorales de détourner ces systèmes de frein immunologique que l'immunothérapie a été développée. Dans le mélanome plus particulièrement ce sont des anticorps monoclonaux inhibiteurs de ces « immune checkpoint » qui sont utilisés : les anti-CTLA4 et les anti-PD1 (Furue et al., 2018). Les immunothérapies représentent le traitement de première ligne pour les patients qui ne portent pas de mutation sur BRAF. Elles sont également données en première ligne pour les patients portant la mutation BRAF<sup>V600E</sup> avec une croissance tumorale lente. Enfin elle sera donnée en seconde ligne pour les patients ayant développé des résistances aux thérapies ciblées.

- **Anti-CTLA4** : Les anti-CTLA4 sont des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur membranaire CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) des lymphocyte T. Le récepteur CTLA4 va empêcher l'activation des lymphocytes T lorsqu'il est lié à son ligand B7 (CD80 et CD86) à la surface des cellules présentatrices d'antigène. Les anti-CTLA4 vont prévenir cette interaction et ainsi empêcher la désactivation du lymphocyte T. Dans le cadre du mélanome l'anticorps utilisé est l'Ipilimumab et va améliorer la survie globale des patients (environ 11 mois) malgré un faible taux de réponse (15%). De plus un fort pourcentage de patients ayant répondu est encore vivant après deux à cinq ans (Hodi et al., 2010).
- **Anti-PD-1** : Le récepteur PD-1 se trouve à la surface des lymphocytes T, et lorsqu'il interagit avec son ligand PD-L1 (CD274) ou PD-L2 (CD273) il va inhiber l'activité du lymphocyte T. Les ligands de PD-1 sont exprimés en temps normal par les cellules présentatrices d'antigène comme les macrophages ou les cellules dendritiques mais peuvent également être exprimés par des cellules tumorales cherchant à échapper au système immunitaire. Les deux anticorps monoclonaux dirigés contre PD-1 utilisés dans le traitement du mélanome sont le Nivolumab et Pembrolizumab. Ils vont empêcher la formation du complexe ligand-récepteur et restaurer l'activité cytotoxique antitumorale des lymphocytes T. Les anti-PD-1 montrent un taux de réponse globalement plus élevé que les anti-CTLA4 avec 32% de réponse pour le Nivolumab et 38% de réponse pour le Pembrolizumab. Ce dernier présente d'ailleurs un taux de survie sans progression à 6 mois de 47,3% contre 26,5% pour l'Ipilimumab (Robert et al., 2015; Topalian et al., 2014). Depuis 2016 les anti-PD1 peuvent être utilisés en première intention quel que soit le statut mutationnel du patient.

Malgré des résultats prometteurs, les immunothérapies sont également responsables d'effets secondaires tel que des réactions auto-immunes. En partie pour résoudre ce problème, plusieurs études prometteuses sont en cours pour étudier la faisabilité d'une combinaison entre les immunothérapies et les thérapies ciblées pour les patients porteurs d'une mutation BRAF. Une de ces études : COMBI-i montre une réponse complète pour 44% des patients (Gutzmer et al., 2020).

Ces dernières années les avancées dans la prise en charge thérapeutique donnent espoir aux patients atteints de mélanome métastatique. Malheureusement la grande capacité d'adaptation aux thérapies du fait de sa grande plasticité fait du mélanome un cancer qui reste difficile à traiter.

### I. Les mécanismes de résistance thérapeutique du mélanome

Comme on vient de le voir, la réponse au traitement du mélanome ne reste que partielle et l'apparition de résistances est un frein pour la prise en charge thérapeutique durable des patients (Fig6). Les cellules de mélanome sont hétérogènes, exprimant une grande plasticité avec plusieurs sous-clone aux propriétés différentes. On alors va distinguer deux types de résistances. Premièrement la résistance innée se met en place par la sélection de sous-clone résistants préexistants à l'aide de la pression de sélection induite par la thérapie. Elle concerne 10% des patients pour les thérapies ciblées et 20% des patients pour les immunothérapies. Deuxièmement la résistance acquise se met en place au cours du traitement grâce à des mécanismes adaptatifs. On va distinguer les mécanismes de résistance intrinsèque résultant d'adaptation interne de la cellule et les mécanismes de résistance extrinsèque dépendant du microenvironnement.



### 1) Résistance thérapeutique intrinsèques aux thérapies ciblées

Le ciblage de l'oncogène BRAF<sup>V600E</sup> mène à la mise en place de mécanisme de résistance que l'on classe en deux groupes. Premièrement la résistance génétique qui se met en place grâce à l'acquisition de mutations secondaires pouvant réactiver la voie des MAPK ou activer d'autre voies oncogéniques (Fig7). Deuxièmement la résistance non génétique qui va se mettre en place via des changements du programme transcriptionnel et/ou des modifications épigénétiques.

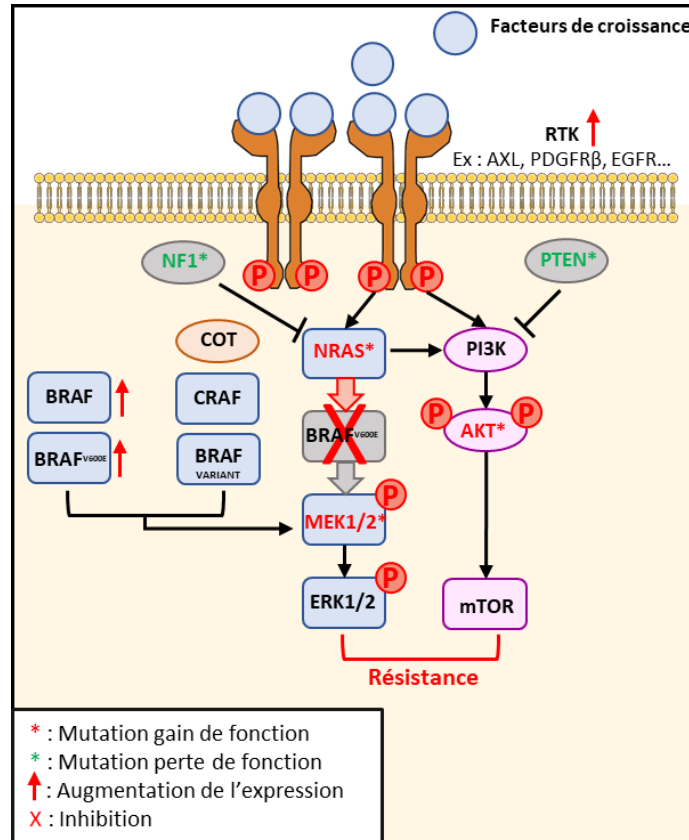


Figure 7 : Schéma illustrant les mécanismes de résistance intrinsèques aux thérapies ciblées

Adapté de (Kozar et al., 2019)

Dans la majorité des cas (80%) ces mécanismes de résistance vont aboutir à la réactivation de la voie des MAPK (Moriceau et al., 2015). Ces mécanismes vont permettre de passer outre l'inhibition de BRAF et de maintenir l'activation de MEK pour restaurer la signalisation dépendante de ERK. Ces altérations vont majoritairement toucher des protéines influant sur l'activité de la voie des MAPK telles que : NF1, NRAS, BRAF ou MEK (Fig7). Ainsi dans 20% des cas, une amplification de BRAF<sup>V600E</sup> est observée chez certains patients traités avec les inhibiteurs de BRAF permettant la réactivation de la voie des MAPK (Shi et al., 2012). L'épissage alternatif de BRAF<sup>V600E</sup> aboutit à la production d'une forme tronquée de la kinase qui permet à la cellule de résister au traitement (Poulikakos et al., 2011). En amont de BRAF l'apparition de mutations secondaires au niveau de NRAS similaires à celles des tumeurs primaires mutées NRAS (Q61K et Q61R). Ces mutations de NRAS contournent l'inhibition de BRAF en préférant passer par l'isoforme C-RAF réactivant ainsi la voie des MAPK (Nazarian et al., 2010). De la même façon, des mutations inactivatrices de NF1 permettent de lever son inhibition sur NRAS et entraîner une réactivation de la voie (Whittaker et al., 2013). En aval de BRAF des mutations de MEK peuvent également être responsables de la résistance aux thérapies ciblées (Villanueva et al., 2013). Enfin COT,

une kinase agoniste de la voie des MAPK peut restaurer l'activité de la voie via MEK en court-circuitant RAF (Johannessen et al., 2010) (Fig7).

Outre la réactivation de la voie des MAPK, les résistances intrinsèques peuvent également activer d'autres voies. L'autre voie la plus communément activée dans la résistance aux thérapies ciblées est la voie PI3K/AKT. Dans 10% des cas l'activation de la voie des PI3K provient d'une délétion ou d'une mutation inactivatrice sur le suppresseur de tumeur PTEN (Paraiso et al., 2011). La surexpression de certains récepteurs tyrosine kinase (RTK) peut également aboutir à l'activation de la voie PI3K. Cette voie permet de passer outre l'inhibition de la voie des MAPK en restaurant la prolifération et la survie des cellules de mélanome. De plus on sait que les cellules résistantes aux thérapies ciblées montrent une surexpression de AXL qui joue également dans l'activation de la voie PI3K/AKT comme mentionné précédemment (Boshuizen et al., 2018)(Fig7).

Une autre étude montre que la pression de sélection appliquée par les inhibiteurs de BRAF induit un enrichissement au sein de la tumeur d'une sous population cellulaire présentant une activation constitutive du facteur de transcription AhR (Aryl hydrocarbon Receptor). Ainsi l'inhibition d'AhR en combinaison avec les thérapies ciblées réduit le nombre de cellules résistantes et retarde la rechute (Corre et al., 2018). De façon intéressante, l'inhibition de AhR va diminuer l'expression de SMAD3 qui est un acteur clé de la résistance aux inhibiteurs de BRAF. Le niveau d'expression de SMAD3, mais aussi de BIRC3 et SLC9A5 est augmenté durant la phase d'acquisition de résistance aux inhibiteurs de BRAFs et promeut un phénotype mésenchymal (Gautron et al., 2021).

## 2) Résistance croisée entre thérapies ciblées et immunothérapies

De plus en plus de données récentes de la littérature pointent vers des mécanismes de résistances croisées entre les thérapies ciblées et les immunothérapies. En 2020 une étude du groupe de Sanz Moreno montre l'importance de la voie ROCK/Myosine II dans la cross-résistance thérapies ciblées/immunothérapies (Orgaz et al., 2020). L'étude montre que les cellules résistantes aux thérapies ciblées présentent une augmentation de l'activation de cette voie qui en retour leur confère une résistance aux immunothérapies. Le ciblage de cette voie restaure la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de BRAF et de MEK via la production de R.O.S. endommageant l'ADN. En parallèle le ciblage de cette voie diminue l'activité immunosuppressive des cellules de mélanome via une diminution de la sécrétion du TGF- $\beta$ . Cette diminution induite par les inhibiteurs de ROCK semble restaurer l'activité antitumorale des anti-PD-1 (Orgaz et al., 2020).

Une autre étude récente de 2021 observe que la résistance aux thérapies ciblées influence la réponse du mélanome aux immunothérapies en manipulant le microenvironnement tumoral pour le rendre immunosuppresseur. L'étude montre une absence de cellules dendritiques actives (CD103+) dans le microenvironnement de tumeurs résistantes aux thérapies ciblées. Cette absence prévient la mise en place d'une réponse T antitumorale efficace (Haas et al., 2021).

L'apparition de résistances croisées entre les thérapies ciblées et les immunothérapies explique l'efficacité plus faible des immunothérapies lorsqu'elles sont données en seconde intention à des patients ayant développé une résistance aux thérapies ciblées. Cela souligne également l'importance du choix du traitement donné en première ligne pour les patients présentant une mutation BRAF et motive l'utilisation des deux traitements de façon séquentielle ou concomitante.

### 3) Résistance extrinsèque aux thérapies ciblées conférées par les facteurs solubles

La résistance peut également être induite par le microenvironnement tumoral. C'est ce qu'on appelle la résistance médiée par l'environnement ou EM-DR (Environnement-Médiated Drug Resistance). L'EM-DR est une forme de résistance non génétique qui va protéger les cellules contre les effets initiaux de différentes thérapies. Ce type de résistance peut être médiée par les facteurs solubles présents dans le microenvironnement dans ce cas on parle de SFM-DR (pour Soluble Factor-Mediated Drug Resistance). Ces facteurs solubles peuvent être des facteurs de croissance, des cytokines, ou encore des métabolites qui sont produits par les cellules stromales. Par exemple l'IL-6 et le SDF-1 sont connus de la littérature pour conférer une résistance à différents agents thérapeutiques de cancer hématologiques et épithéliaux (Frassanito et al., 2001; Hartmann et al., 2005). Dans le cadre du mélanome on peut citer l'exemple de la production de HGF (Facteur de croissance hépatocytaire) par les fibroblastes du microenvironnement tumoral. Le HGF va ensuite se fixer au récepteur MET à la surface des cellules de mélanome permettant une réactivation de la voie MEK/ERK mais aussi une activation de la voie PI3K/AKT (Fedorenko et al., 2015).

### 4) Résistance extrinsèque aux thérapies ciblées conférées par l'adhésion cellulaire

Il existe un second type de résistance médiée par le microenvironnement, plus spécifiquement par sa composante matricielle et cellulaire. Ce type de résistance est dépendante de l'adhésion des cellules tumorales à la MEC ou aux cellules stromales d'où l'appellation de CAM-DR (Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance). L'interaction entre les cellules tumorales et les cellules stromales est bien connue de la littérature pour influencer la réponse thérapeutique. Dans le cadre du mélanome l'ensemencement des cellules sur une monocouche de CAF augmente la survie des cellules tumorales en réponse à la chimiothérapie (Flach et al., 2011).

La résistance médiée par la matrice est également très bien décrite, en ce qui concerne le mélanome, une étude de 2015 montre que le traitement au Vémurafénib va stimuler la production de fibronectine par les fibroblastes (Hirata et al., 2015). Ce surplus de fibronectine dans le microenvironnement tumoral va permettre la réactivation de la voie ERK dans les cellules de mélanome via l'axe intégrine  $\beta$ 1-FAK-Src. Notre laboratoire a récemment montré que la matrice produite par les fibroblastes associés aux cancers protège les cellules de mélanome contre les thérapies ciblées. Cette protection s'explique par le « clustering » des récepteurs du collagène DDR1 et 2 à la membrane des cellules de mélanome en engageant la voie NF- $\kappa$ B non canonique. Ainsi le ciblage spécifique de ces récepteurs abroge la protection conférée par la matrice des CAF (Berestjuk et al., 2022).

Dans une seconde étude, notre laboratoire montre qu'en réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK les cellules de mélanome vont sécréter leur propre matrice extracellulaire. En effet les cellules de mélanome vont pouvoir s'adapter aux thérapies ciblées grâce à la mise en place d'une boucle d'amplification positive. Cette boucle va d'une part déclencher le remodelage et la rigidification autocrine de la MEC. D'autre part cette rigidification va être lue par la cellule au moyen des mécanosenseurs YAP (Yes Associated Protein) et MRTF (Myocardin-Related Transcription Factor) dans le cadre de la mécanotransduction. La mise en place de ces voies de mécanotransduction induit un programme transcriptionnel qui renforce la rigidification de la MEC créant ainsi une boucle. C'est la mise en place et l'amplification de ce phénomène qui va provoquer l'échappement thérapeutique du mélanome, on parle alors de mécanorésistance (Girard et al., 2020)(Fig8). Notre équipe propose donc que le ciblage de cette boucle d'amplification positive constitue une stratégie thérapeutique prometteuse contre l'apparition de résistances aux thérapies ciblées (Fig8).

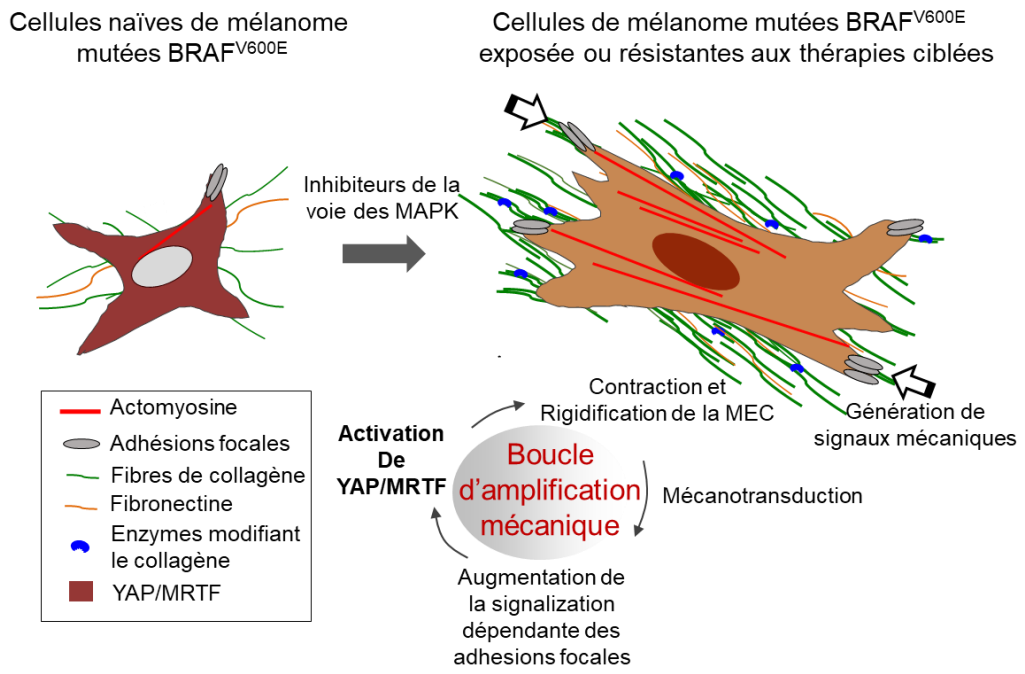


Figure 8 : Modèle de la reprogrammation biomécanique des cellules de mélanome induite par les thérapies ciblées  
 Adapté de (Girard et al., 2020).

## II. Matrice extracellulaire et mécanotransduction

### A. Microenvironnement et matrice extracellulaire

Dans un tissu sain, les cellules sont maintenues par un environnement permettant le maintien de leurs fonctions, c'est ce que l'on appelle le microenvironnement. Il est formé par des composants cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunitaires etc...) et des composants non cellulaires que l'on appelle la matrice extracellulaire (MEC).

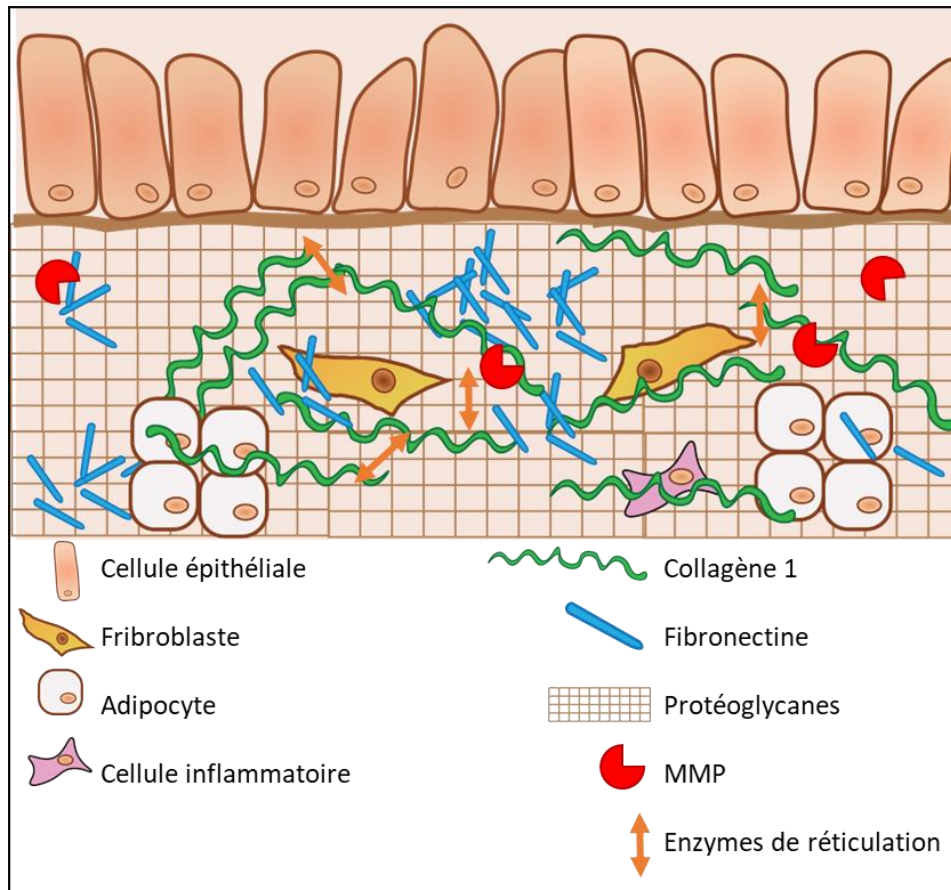


Figure 9: Schématisation du microenvironnement physiologique

Adapté de (Frantz et al., 2010).

#### 1) Composants cellulaires du microenvironnement

Au sein du microenvironnement, on va retrouver plusieurs types de cellules qui vont assurer l'immunité, l'intégrité l'innervation ainsi que la production de la matrice extracellulaire (MEC)(Fig9).

On va tout d'abord trouver les cellules de la lignée myéloïde comme les cellules dendritiques et les neutrophiles. Leur rôle va être de mettre en place la réponse immunitaire innée pour lutter contre les pathogènes. Dans un contexte tumoral, ces cellules peuvent être détournées pour soutenir la progression tumorale. C'est notamment le cas des macrophages qui présenteront un phénotype anti inflammatoire et pro-tumoral de type M2 dans le voisinage des tumeurs (Biswas et al., 2006).

On trouve ensuite les cellules de la lignée lymphoïde comme les lymphocytes T et les natural killer dont le rôle cette fois-ci sera de mettre en place la réponse immunitaire adaptative en coopérant notamment avec les cellules présentatrices d'antigènes. Dans le cadre du cancer, des mécanismes de freins immunologiques propres aux lymphocytes T sont souvent détournés à l'avantage des tumeurs.

C'est ce phénomène qui a permis le développement des immunothérapies dont nous avons parlé dans le chapitre I.

On trouve aussi un grand nombre de cellules mésenchymateuses dont le rôle sera de structurer le microenvironnement tumoral. Par exemple les péricytes et les cellules endothéliales sont d'origine mésenchymateuse et permettent la mise en place des vaisseaux sanguins au sein du microenvironnement. Dans le cadre du cancer, ces cellules sont détournées afin de vasculariser la tumeur pour lui apporter les nutriments dont elle a besoin et lui faciliter la dissémination métastatique (Carmeliet and Jain, 2011).

Enfin on trouve les fibroblastes qui vont être responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire et qui vont également participer à la cicatrisation des tissus. Les fibroblastes associés au cancer (CAFs) sont le type cellulaire qui est le plus fréquent au sein du microenvironnement tumoral. Elles sont recrutées par les cellules tumorales ce qui leur donne des caractéristiques pro-tumorales (Kalluri, 2016).

## 2) Composants non cellulaires du microenvironnement

Dans l'organisme, les cellules sont entourées par une structure tridimensionnelle complexe que l'on appelle la matrice extracellulaire. Cette matrice est composée d'un mélange de protéines, de glycoprotéines de protéoglycanes et de facteurs solubles (cytokines et facteurs de croissance). La MEC va à la fois fournir un support structurel et contextuel permettant à la cellule de réagir correctement (Koontongkaew, 2013). On verra également que la MEC peut être une source de signaux biophysiques qui sont lus et interprétés par la cellule au cours du processus de la mécanotransduction.

### a) Les facteurs solubles

Parmi les facteurs solubles, on trouve les facteurs de croissance dont le rôle est de promouvoir la communication entre les différents types cellulaires composant le microenvironnement. Pour ce faire ils se lient à leur récepteur spécifique à la surface des cellules. Ils sont capables de se lier aux protéines matricielles ce qui constituera un réservoir de facteur de croissance, c'est notamment le cas du FGF et du VEGF. La dégradation des protéines matricielles par des enzymes spécialisées permettra alors de libérer ces facteurs de croissance dans le milieu et leur permettre de jouer leur rôle (Hynes, 2009). Parmi ces facteurs solubles on trouve également des cytokines dont l'interaction avec des protéines matricielles comme les protéoglycanes modifie leur dynamique ligand-récepteur. C'est notamment le cas du TGF- $\beta$  (Schönherr and Hausser, 2000).

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

Tableau 1 : Les différents types de collagène

Adapté de (Mouw et al., 2014).

### b) Le collagène

Les collagènes représentent à eux seuls 30% des protéines chez l'humain ce qui en font le type majoritaire de protéines retrouvées dans la MEC (Theocharis et al., 2016). Ils sont principalement synthétisés et sécrétés par les fibroblastes. Les différents types de collagènes se forment par l'association homo ou hétérodimérique de 3 chaînes polypeptidiques en hélice  $\alpha$  selon le type de collagène. Il existe au minimum 46 de ces chaînes qui vont permettre de générer 28 types de collagènes différents (Tableau 1). Les collagènes fibrillaires représentent le type le plus fréquent et sont typiquement formés par l'autoassemblage de ces structures en triple hélice  $\alpha$ . Cet autoassemblage va permettre la formation de fibrilles plus ou moins épaisses (Kadler et al., 2007). Les collagènes

fibrillaires sont classés en 7 groupes (I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII) selon leur fonction, leur structure et leur homologie de domaine (Theocharis et al., 2016).

#### *c) Les glycoprotéines*

Les glycoprotéines ont pour fonction de renforcer le réseau en connectant entre elles les protéines de structure de la MEC. Pour ce faire, elles vont posséder des motifs de liaison pour les autres protéines matricielles, mais aussi pour les facteurs de croissance ou encore les récepteurs à la surface des cellules. Comme leur nom l'indique, les glycoprotéines vont être constituées de chaînes polypeptidiques liées à des sucres. La fibronectine et les laminines sont les glycoprotéines majoritaires de la MEC.

Les laminines sont de larges glycoprotéines hétéromériques en forme de croix. Chaque hétéromère consiste en l'assemblage d'une chaîne  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  chacune codée par un seul gène. Il existe 5 chaînes  $\alpha$ , 3 chaînes  $\beta$  et 3 chaînes  $\gamma$  qui peuvent s'organiser en 16 configurations différentes (Mouw et al., 2014). Les laminines représentent les constituants majeurs de la lame basale qui sépare l'épiderme du derme. Elles jouent principalement un rôle structural dans la MEC, mais sont également capables d'influencer les cellules notamment par leur interaction avec les intégrines.

La fibronectine est composée de deux sous-unités liées par un pont disulfure en Cterm (Pankov and Yamada, 2002). Elle est exprimée de manière ubiquitaire dans l'ECM produite par les divers types cellulaires. Les deux sous-unités qui la composent sont chacune formées de trois modules répétés nommés type I, type II et type III (Mouw et al., 2014; Schwarzbauer and DeSimone, 2011). Ces modules vont permettre la liaison avec différents composants de la MEC, mais aussi des protéines transmembranaires comme les intégrines. La fibronectine va donc servir d'intermédiaire entre les protéines matricielles et les cellules et ainsi conférer sa consistance à la MEC. Sans la fibronectine, le collagène n'est pas suffisant pour former une matrice ce qui en fait un régulateur critique de l'organisation de la MEC (Sottile and Hocking, 2002).

Il existe d'autres glycoprotéines dans la MEC comme l'élastine qui comme son nom l'indique sera responsable des propriétés élastiques de la matrice et des vaisseaux sanguins.

#### *d) Les protéoglycanes*

Ces protéines sont caractérisées par leur liaison covalente à des glycosaminoglycanes (GAG). Les propriétés biochimiques et hydrodynamiques sont assurées par la présence de ces GAGs qui peuvent se lier aux molécules d'eau (Laurent and Fraser, 1992; Mouw et al., 2014; Theocharis et al., 2010). Cela explique que les protéoglycanes assurent un rôle d'hydratation et de résistance à la compression des tissus. Ainsi ils sont plus abondants dans les cartilages ou la MEC des tissus neuraux. Les protéoglycanes se subdivisent en quatre familles en fonction de leur localisation : les protéoglycanes intracellulaires, les protéoglycanes à la surface de la cellule, les protéoglycanes péricellulaires et les protéoglycanes extracellulaires (Theocharis et al., 2016).

#### *e) Les protéines matricielles*

Les protéines matricielles se caractérisent par une absence de rôle structural au sein de la MEC. Elles vont servir de modulateur des fonctions cellulaires en facilitant l'interaction cellules-cellules et cellules-MEC (Theocharis et al., 2016). Elles existent sous des formes et structures variées mais possèdent des domaines de liaison à la MEC et des fonctions similaires. Ces protéines présentent une



expression modérée dans la MEC de tissus adulte. Leur expression augmente lors du développement normal d'un tissu ou en condition pathologique (Bornstein and Sage, 2002). L'expression des protéines matricielles est régulée par de multiples mécanismes dont les contraintes mécaniques de la matrice via la mécanotransduction (Asparuhova et al., 2011). De manière non exhaustive, les télescines, les thrombospondines et SPARC font partie des protéines matricielles. Ces protéines sont capables de lier une multitude de récepteurs, ainsi la plupart d'entre elles sont capables de lier différentes intégrines pour activer leur voie de signalisation respectives (Murphy-Ullrich and Sage, 2014). Elles peuvent également réguler les fonctions cellulaires en liant les facteurs solubles présents dans la MEC. C'est notamment le cas de SPARC qui est capable de moduler l'activité du TGF- $\beta$  ou de la thrombospondine 1 qui régule l'activation de la voie EGFR/ErB2 (Garg et al., 2011; Schiemann et al., 2003).

#### *f) Les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire*

Les métalloprotéases matricielles (MMP) sont les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire les plus communément retrouvées. On les classe en 6 groupes distincts basés sur la spécificité de substrat, leur homologie de séquence et l'organisation de leurs domaines : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les MT-MMP et les autres MMPs (Visse and Nagase, 2003). En condition normale, l'activité de ces enzymes est faible, mais elle augmente lorsque la matrice est endommagée, remodelée ou encore dans les tissus inflammés ou malade (fibrose, cancer) (Bonnans et al., 2014). La plupart des MMPs sont sécrétées sous forme de zymogène par différents types cellulaires tels que les fibroblastes ou les cellules épithéliales mais également les cellules tumorales (Vihinen and Kähäri, 2002). Leur activation se fait principalement par clivage protéolytique. Collectivement, les MMPs peuvent dégrader toutes les protéines de la matrice extracellulaire et jouent un rôle crucial dans l'organogenèse et la morphogénèse. Les MMPs peuvent également jouer un rôle dans l'immunité en générant des produits de dégradation appelés matrikines capables de stimuler l'invasion immunitaire (Wells et al., 2015).

La cascade enzymatique du plasminogène aboutit à l'activation des plasmines qui sont des sérines protéases qui vont jouer un rôle dans le remodelage de la MEC. Elles sont ainsi capables de dégrader la fibrine, la fibronectine et les laminines. Ces enzymes sont activées par des protéases qui convertissent le plasminogène en plasmine (Theocharis et al., 2016).

#### *g) Les enzymes de réticulation de la matrice extracellulaire*

Pour acquérir ses propriétés biophysiques et biochimiques spécifiques, le collagène fibrillaire doit subir des modifications qui vont conduire à sa réticulation. Cette réaction est catalysée par la famille des lysyl oxydases (LOX) dont le rôle est de désaminer les résidus lysine et hydroxylysine du collagène. Cette réaction va entraîner la formation d'un groupe aldéhyde réactif qui va permettre la réticulation covalente du collagène. Cette réticulation va être responsable des propriétés de tension ainsi que de la stabilité structurelle des tissus. Une augmentation de l'activité de ces enzymes est directement reliée à l'augmentation de la rigidité matricielle (Bonnans et al., 2014).

### **B. Rôle de la matrice extracellulaire dans le cancer**

Comme on a pu le voir, la matrice extracellulaire est responsable de la structure tissulaire et du contrôle de son développement. Ainsi la dérégulation de la MEC est souvent à l'origine de pathologie telles que la fibrose ou le cancer, ce qui s'explique par son importance dans la régulation du phénotype

des cellules qu'elle abrite (Lu et al., 2012). Malgré les mutations qui sont en général à l'origine de la tumorigénèse, les cellules tumorales évoluent dans cette MEC et engagent avec elle un dialogue complexe. En effet, les signaux biochimiques et biophysiques générés par la MEC sont capables d'influencer le développement tumoral via le développement vasculaire ou encore la réponse immunitaire. De plus ces signaux peuvent également moduler la croissance, la survie et la migration cellulaire (Pickup et al., 2014) (Fig10).

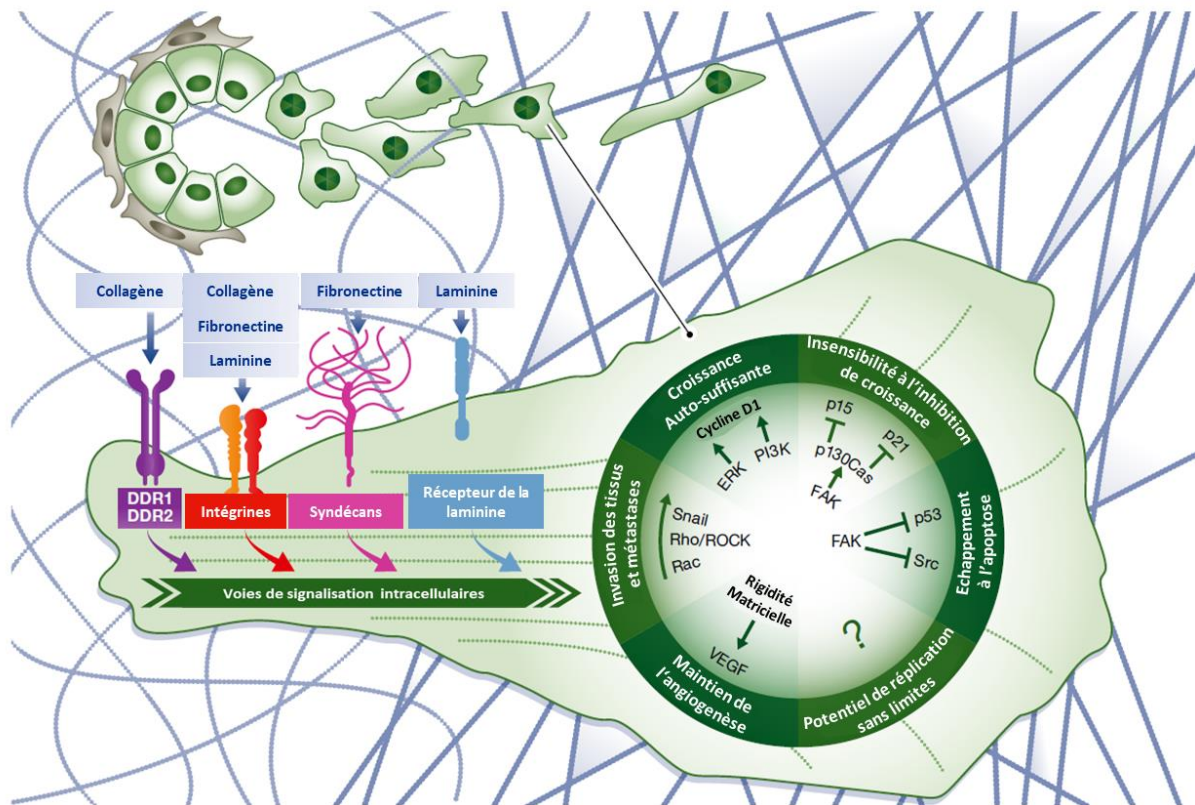


Figure 10 : Rôle de la MEC dans les propriétés des cellules tumorales  
Adapté de (Pickup et al., 2014).

### 1) Rôle dans l'angiogenèse

Bien souvent les tumeurs ont besoin de stimuler la néovascularisation afin d'éviter d'entrer en hypoxie et de garder un flux constant de nutriments pour soutenir leur métabolisme accru. L'angiogenèse est stimulée par des facteurs de croissance tels que le VEGF et le FGF qui vont stimuler la prolifération et la migration de cellules endothéliales pour former des vaisseaux sanguins au sein de la tumeur déprivée en oxygène et en nutriments (Fig10). La MEC qui entoure la tumeur sert donc de réservoir à ces facteurs pro- et anti-angiogéniques qui vont faciliter la mise en place de ce mécanisme en guidant les cellules endothéliales (Carmeliet and Jain, 2011).

### 2) Rôle dans la réponse immunitaire

La surveillance immunitaire réalisée par le système immunitaire adaptatif est une des premières lignes de défense de l'organisme contre la tumorigénèse. Elle repose sur la capacité des lymphocytes T à reconnaître les antigènes mutés présentés par les cellules transformées et à détruire ces dernières. La réponse immunitaire adaptative peut être à la fois facilitée ou compliquée par la MEC. La matrice extracellulaire peut faciliter la migration des cellules immunitaires en générant des fragments de matrice chimio-attractants à l'aide d'enzyme de clivage MMP (Wells et al., 2015). Cependant, la

matrice peut directement inhiber l'activation des cellules T via la liaison du collagène de type 1 au récepteur de surface LAIR (Leucocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor)(Frantz et al., 2010; Meyaard, 2008).

En général, l'inflammation chronique constitue un facteur de risque favorisant l'apparition de transformation maligne. On note que les tissus victimes d'inflammation chronique sont sujets à la fibrose via un mécanisme de dépôt accru de collagène et de fibronectine (Izbicki et al., 2002; Stramer et al., 2007). De plus l'installation de la fibrose diminue le recrutement des cellules du système immunitaire inné. C'est par exemple le cas des macrophages via l'expression de la protéine matricellaire SPARC (Sorokin, 2010). La composition de la MEC peut aussi influencer l'activation des cellules du système immunitaire inné déjà recrutées au sein de la tumeur. La littérature nous apprend qu'une MEC riche en collagène va promouvoir la prolifération et l'activation des macrophages mais également leur polarisation vers un phénotype M2 pro-tumoral (Wesley et al., 1998). A l'inverse une MEC riche en fibronectine va promouvoir la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 antitumoral (Perri et al., 1982).

### 3) Rôle dans la prolifération

Pour que la tumeur puisse se former, la cellule transformée va devoir acquérir des capacités prolifératives. La progression dans le cycle cellulaire est fortement contrôlée par le passage du point de contrôle G1/S (Pickup et al., 2014). L'adhésion à la MEC peut faciliter cette transition notamment via l'activation de la signalisation dépendante de ERK. Cette activation est dépendante de l'activation de Ras par les facteurs de croissance présents dans la MEC. L'adhésion à la MEC peut également promouvoir l'activation de la voie PI3K via la phosphorylation de FAK. L'activation de ces deux voies va permettre la translocation nucléaire de ERK et l'induction de la cycline D1 permettant à la cellule de poursuivre le cycle (Assoian and Schwartz, 2001; Keely, 2011; Pylayeva et al., 2009)(Fig10).

### 4) Rôle dans la migration et l'invasion

Pour pouvoir envahir d'autres tissus et former des métastases, les cellules tumorales ont besoin d'acquérir un phénotype plus motile et invasif. Pour développer ce phénotype, les cellules tumorales ont besoin de structures spécialisées appelées invadopodes qui sont des protrusions riches en actine. Pour permettre le déplacement des cellules, les invadopodes ont besoin d'adhérer à la MEC via l'expression de récepteur du collagène (intégrines, DDRs) et la formation d'adhésion focale (Parekh et al., 2011) (Fig10). Ainsi la formation d'une matrice extracellulaire plus dense et rigide aide à la formation de ces invadopodes et facilite l'invasion des cellules grâce au MMP présente dans ces structures (Beaty and Condeelis, 2014; Wang and McNiven, 2012). Ces dernières vont aider à dégrader la MEC entourant la tumeur permettant ainsi aux cellules de s'échapper et de rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique (Celià-Terrassa et al., 2012). A terme ce sont ces cellules qui permettront la formation de métastases. Au contraire, une matrice constituée d'un réseau moins dense et moins rigide de collagène semble impacter négativement la capacité migratoire des cellules tumorales (Bondareva et al., 2009).

## C. Introduction à la mécanotransduction

### 1) Généralités

Pour qu'une cellule fonctionne correctement au sein d'un organisme multicellulaire, elle doit être capable d'intégrer de nombreux signaux biochimiques, mais aussi biophysiques provenant des cellules et de la matrice extracellulaire qui l'entoure. D'un côté, ces contraintes mécaniques sont fondamentales au bon développement de l'embryon, de la régénération des tissus etc... D'un autre côté elles jouent un rôle crucial dans certaines situations pathologiques comme le cancer. La cellule est donc capable de convertir ces signaux biomécaniques en signaux biochimiques par un processus appelé mécanotransduction. Les premières études de la mécanobiologie se sont intéressées à la façon dont les cellules sensorielles peuvent transmettre les signaux qu'elles captent à l'organisme (toucher, onde sonore, pression etc...). En effet ces cellules spécialisées vont subir des changements de potentiel de membrane permettant la génération de potentiel d'action et donc la transmission du signal sensoriel au système nerveux. Dans les cellules ciliées de l'oreille interne ce mécanisme est rendu possible par la déformation mécanique de structure appelée stéréocils. Cette déformation va induire l'ouverture de canaux ioniques présents sur le stéréocil ce qui va modifier l'équilibre ionique entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire. Cette modification sera à l'origine de potentiel d'action permettant la transduction du signal (Eberl et al., 2000; Vollrath et al., 2007).

Toutes les cellules sont exposées à ces contraintes mécaniques plus ou moins forte en fonction de leur environnement, ce qui va en partie dicter la morphologie et la physiologie de tous les tissus de l'organisme. La rigidité du substrat va jouer un rôle déterminant dans la différenciation cellulaire au cours de l'embryogenèse. Par exemple un support dont la rigidité se rapproche de celle des os, les cellules souches mésenchymateuses vont se différencier en ostéoblastes (Sun et al., 2018). On peut ainsi les classer sur une échelle de rigidité en utilisant le module de Young qui est le coefficient d'élasticité d'un tissu et qui se mesure en Pascal (Pa)(Fig11).

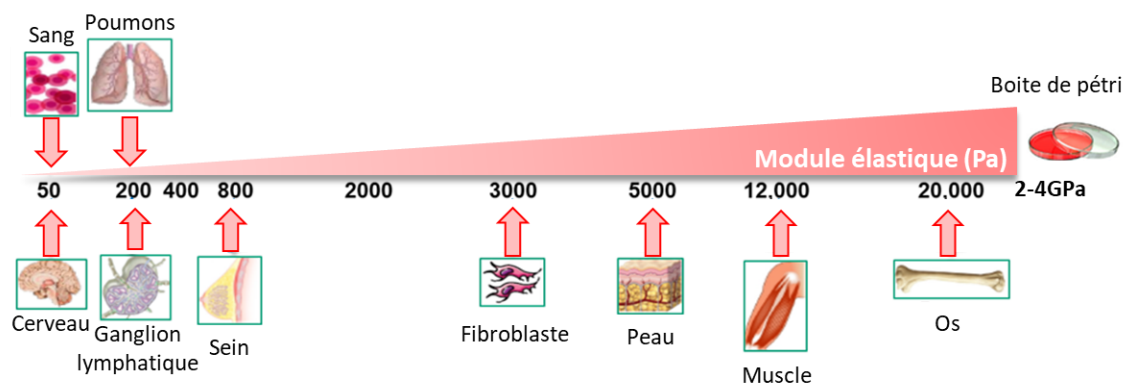


Figure 11 : Echelle de rigidité des tissus humains comparés à une boîte de pétri

Adapté de (Butcher et al., 2009).

## 2) Différents types de forces

Dans un contexte physiologique normal, les cellules sont exposées à des stimuli mécaniques variés incluant la pression hydrostatique, l'étirement cellulaire, la tension cellulaire ou la compression intracellulaire. En physique, ces phénomènes se traduisent en trois forces distinctes (Butcher et al., 2009)(Fig12) :

- La force de cisaillement qui représente le stress appliqué de façon parallèle à la cellule
- La force de compression qui est le stress appliqué perpendiculairement à la cellule et résulte en une compaction.
- La force de tension qui est également appliquée perpendiculairement à la cellule mais résulte cette fois-ci en une expansion.

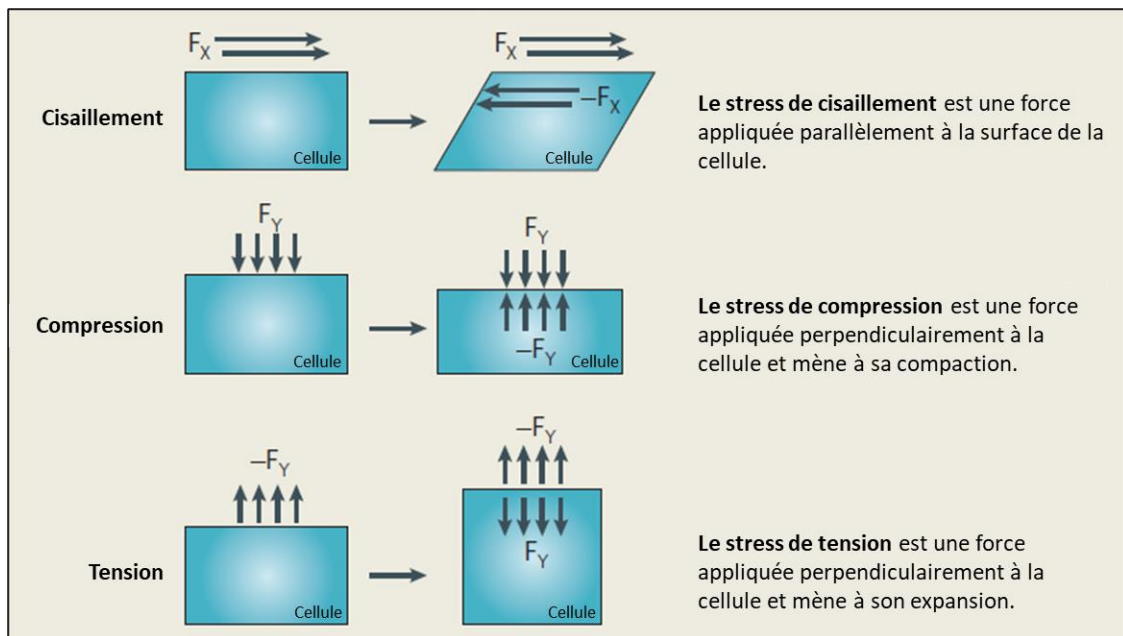


Figure 12 : Les différentes forces mécaniques pouvant s'appliquer à la cellule

Adapté de (Butcher et al., 2009).

La troisième loi de Newton stipule que pour chaque action il existe une réaction opposée d'égale intensité. Les cellules sont évidemment soumises à cette loi et répondront aux altérations mécaniques de leur environnement en ajustant leur tension intracellulaire via leur cytosquelette. Ces changements induiront également des conséquences dans l'organisation de la MEC et donc sur ses propriétés mécaniques (Fig12). Dans le contexte de la biologie, ces forces peuvent se traduire de différentes façons :

- Les forces hémodynamiques qui sont générés par le flux sanguin au sein des vaisseaux. Les cellules endothéliales au sein des capillaires vont donc subir des contraintes de cisaillement dans le sens du flux sanguin. Pour maintenir l'intégrité des vaisseaux en cas de modification de ces forces, les cellules vont pouvoir ajuster la structure de la paroi des vaisseaux. (Lehoux et al., 2004)
- Les forces de contact entre cellules peuvent intervenir lorsque les cellules sont organisées en épithélium. En effet au sein de tel structure les cytosquelettes des cellules sont reliés entre eux grâce à la présence de jonction intercellulaire faisant intervenir les cadhérines (desmosomes, jonctions adhérentes). Ainsi la contractilité de certaines cellules individuelles peut être amplifiée jusqu'à affecter un tissu tout entier (Martin et al., 2010).

- Les forces appliquées par le support vont prendre leur origine dans la composition et l'organisation de la MEC. La cellule au sein du tissu est sujette à des forces isométriques passant par son interaction avec la MEC (Butcher et al., 2009). Entre autre, le collagène, les enzymes de réticulation et les enzymes de dégradation de la MEC vont être responsable de la rigidité de la matrice (Bonnans et al., 2014; Cawston and Young, 2010; Payne et al., 2007).

### 3) Mesure des forces

Afin de mesurer les forces mises en jeu dans le contexte de la mécanobiologie, il existe plusieurs types de technique. Pour mesurer les forces de traction appliquées par une cellule sur son substrat, il existe des gels contenant des billes disposées à intervalle régulier. Lorsque la cellule va appliquer des forces de traction sur ce gel, elle va le déformer et les billes serviront de marqueur de cette déformation. C'est ce que l'on appelle la microscopie à force de traction ou TFM (Traction Force Microscopy)(Wang and Lin, 2007) . On peut également mesurer la rigidité d'un échantillon biologique en utilisant la microscopie à force atomique ou AFM (Atomic Force Microscopy). Cette technique mesure le module élastique (en Pascal) de l'échantillon en quantifiant la déflexion d'une pointe appliquée sur ce dernier (Thomas et al., 2013).

### D. Acteurs extracellulaires de la mécanotransduction

Comme on a pu le voir dans l'introduction de cette partie, certaines cellules sensorielles sont capables de détecter les contraintes mécaniques via l'ouverture de canaux ioniques. Mais il existe également différents récepteurs à la surface des cellules dont le rôle va être de transmettre les signaux biomécaniques au cytosquelette de la cellule. Le cytosquelette va être capable de propager ces signaux au noyau cellulaire avec qui il est en interaction étroite. C'est par ce mécanisme dont on va maintenant détailler les acteurs que les contraintes mécaniques vont pouvoir agir sur le programme transcriptionnel de la cellule et ainsi influencer son comportement. Dans ce contexte, on distingue acteur extracellulaire impliqué dans la perception des signaux mécaniques qui sont principalement des récepteurs de la MEC, et les acteurs intracellulaires de la transduction des signaux mécaniques.

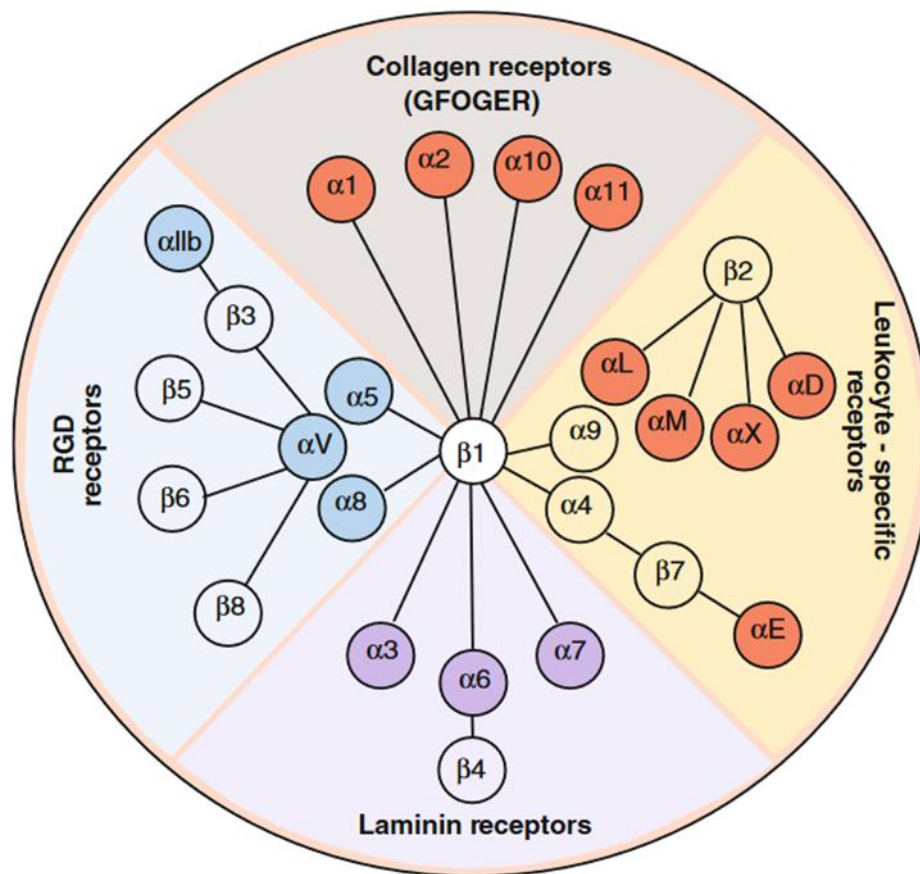


Figure 13 : Ligands et organisation des différents dimères d'intégrine

Tiré de (Barczyk et al., 2010).

### 1) Les intégrines

Les intégrines sont une famille de récepteurs impliquée dans l'adhésion de la cellule à la MEC. Chez l'homme, les intégrines jouent un rôle crucial dans le développement mais également dans certaines pathologies comme l'inflammation chronique et le cancer. Ces récepteurs sont composés de l'assemblage non-covalent d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Il existe 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  qui vont donner les 24 hétérodimères connus d'intégrines (Barczyk et al., 2010; Hynes, 2002). La structure de l'intégrine se divise en une partie extracellulaire appelée la tête et une partie intracellulaire formée par deux queues. La tête portera la fonction de liaison aux protéines de la MEC et les queues se lieront au cytosquelette à l'intérieur de la cellule formant ainsi une jonction directe entre la MEC et la cellule (Wegener et al., 2007). L'affinité de l'intégrine pour les protéines de la matrice est dictée par sa composition en sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$  (Fig13). Les intégrines spécifiques du collagène sont composées de la liaison de sous-unité  $\beta 1$  qui est la plus abondante avec une sous-unité  $\alpha 1, 2, 10$  ou  $1$ . Lorsque la sous-unité  $\beta 1$  s'assemble avec une sous-unité  $\alpha 3, 6$  ou  $7$ , l'intégrine sera spécifique des laminines. Le motif RGD présent sur la fibronectine notamment sera reconnu par les intégrines  $\alpha 5\beta 1, \alpha 8\beta 1$  et toutes les intégrines qui présentent une sous-unité  $\alpha V$ .

Lorsqu'elles sont liées à leur ligand, les intégrines vont recruter de nombreuses protéines grâce à leurs queues cytoplasmiques. Ce recrutement permet la formation de structures d'échafaudage et de rassembler des récepteurs et intégrines à la surface de la cellule. On parle de « clustering » des intégrines ce mécanisme est crucial dans la formation de structure d'adhésion telles que les adhésions focales (Winograd-Katz et al., 2014). Certaines des protéines recrutées par les domaines intracellulaires de l'intégrine (comme la taline) vont permettre de créer un lien mécanique entre la

MEC et le cytosquelette d'actomyosine (Sun et al., 2016; Wegener et al., 2007). Cette liaison permet à l'intégrine de transmettre à la cellule les signaux mécaniques du microenvironnement et d'influer sur la transcription des gènes. Elle permet également d'agir sur ce dernier en lui communiquant les forces générées par le cytosquelette d'actine contractile. Les intégrines peuvent également recruter des kinases effectrices comme FAK. L'activation de FAK entraîne sa dimérisation et son autophosphorylation et recrute les kinases de la famille des SRC pour continuer la transduction du signal.

## 2) Les récepteurs à domaine discoïdine

D'autres récepteurs sont capables de convoier les signaux mécaniques de la matrice extracellulaire, c'est le cas de la famille des récepteurs à domaine discoïdine ou DDRs (Discoidin Domain Receptor) composée de DDR1 et de DDR2. Ce sont des récepteurs à tyrosine kinase dont les ligands sont principalement les collagènes fibrillaires de type I, II et III (Fu et al., 2013). Ce sont les seuls RTKs qui peuvent interagir avec des composants de la MEC. Ils sont également caractérisés par la présence de deux domaines extracellulaires similaires : discoïdine et discoïdine-like. Les DDRs s'activent lors de la liaison à certains types de collagène fibrillaire par un mécanisme encore mal (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997). Ils sont capables de coopérer avec les intégrines pour leur expression, l'adhésion et la contractilité cellulaire (Bayer et al., 2019). Coté intracellulaire, ils sont capables d'interagir avec la myosine II ce qui explique leurs effets sur la contraction (Coelho et al., 2017). Ils possèdent également différents partenaires intracellulaires leur permettant d'interagir entre autres avec une kinase de la famille des SRC (Iwai et al., 2013).

## 3) Les canaux ioniques mécanosensibles

Parmi la multitude de protéines capables de ressentir et de répondre aux signaux de stress mécanique, se trouve certains canaux ioniques. Ces canaux ioniques mécanosensibles sont directement activés par les stress appliqués sur la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Jin et al., 2020). L'activité de ces canaux est très bien décrite dans les cellules sensorielles au sein desquelles les contraintes mécaniques vont générer des potentiels d'action en ouvrant le pore du canal. Parmi les canaux mécanosensibles on va retrouver des canaux potassiques à deux domaines pores ( $K_2P$ ) comme TREK1/2 et TRAAK dont le rôle va être de maintenir le potentiel de repos de la membrane cellulaire (Brohawn et al., 2014; Dedman et al., 2009). On trouve également des canaux calciques comme les TRP ou la famille Piezo dont le rôle dans l'import de calcium affecte la contractilité cellulaire (Jin et al., 2020)

## E. Acteurs intracellulaires de la transduction des signaux mécanique

On a vu que de multiples récepteurs permettent de créer un lien favorable à la transmission des signaux biomécaniques entre la cellule et la MEC. La plupart du temps ce lien est convoié par le cytosquelette.

### 1) Le cytosquelette

Le cytosquelette est un réseau dynamique formé par trois différents types de fibres (les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules) dont le rôle principal est de maintenir la



cohésion de la cellule. Outre son rôle de charpente, il va servir dans le trafic des protéines, vésicules et organelles, la motilité et la contraction cellulaire et durant la mitose.

#### a) Le cytosquelette d'actine

Pour former un microfilament d'actine, la cellule va produire des monomères d'actine ou actine G. Chacun de ces monomères est capable de lier l'ATP qui va fournir l'énergie nécessaire à la formation d'un polymère d'actine. Le filament d'actine est quant à lui formé de deux polymères disposés en quinconce et organisés en double hélice. A ce filament s'ajoute les protéines de liaison à l'actine ou ABP (Actin Binding Protein) qui vont donner leurs propriétés au cytosquelette d'actine. En effet ce dernier est hautement dynamique et requiert un remodelage constant pour assurer ses fonctions (Pollard and Borisy, 2003). Il existe donc des ABP dont le rôle sera de stabiliser les filaments comme la tropomyosine ou encore d'autres dont le rôle sera de les fragmenter comme la gelsoline. Parmi les protéines de liaison à l'actine, on trouve la famille des myosines. La myosine II va participer à la contraction du muscle strié squelettique tandis que la myosine I va assurer le transport des vésicules dans le cytoplasme de la cellule (Hartman and Spudich, 2012).

La régulation des filaments d'actine se fait également à l'aide de certaines enzymes de type petites GTPases de famille des protéines Rho. Ainsi la littérature nous montre qu'une version constitutive active de RhoA va induire l'assemblage de filaments d'actomyosine contractiles appelés fibre de stress. L'activation de Rac1 va induire la formation de protrusion riche en actine à la surface appelée lamellipodes. Enfin l'activation de Cdc42 va permettre l'assemblage d'une structure distincte d'actine filamenteuse appelée filopodes (Etienne-Manneville and Hall, 2002)(Fig14). Comme on a pu le voir dans la partie précédente, le cytosquelette d'actine est directement relié au récepteur de la mécanotransduction afin de transmettre les signaux mécaniques à la cellule. Ainsi les signaux mécaniques envoyés par la MEC sont capables de provoquer des changements de la morphologie cellulaire. Par exemple la rigidification de la matrice extracellulaire est capable d'induire la formation de fibre de stress (Yeung et al., 2005). Enfin en réponse aux signaux mécaniques la contraction du cytosquelette d'actine est capable d'induire la translocation de co-facteur de la transcription comme YAP/TAZ et MRTF.

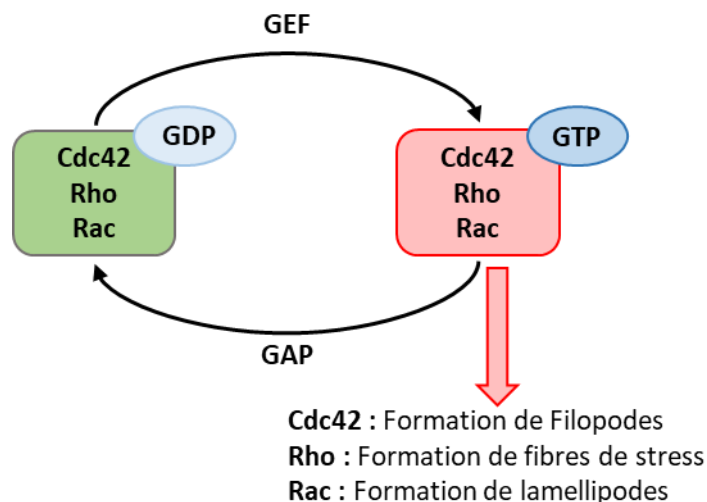


Figure 14 : Effet de l'activation des Rho GTPase sur le cytosquelette d'actine

### *b) Les filaments intermédiaires*

Les filaments intermédiaires (FI) ont été classifiés en 5 types distincts en fonction de leur structure primaire, de leur structure génétique de leur propriété d'assemblage et des tissus où ils sont exprimés. On trouve les kératines, les neurofilaments, les desmines, les lamines et la vimentine. Contrairement à l'actine qui est globulaire, les FI ont une structure fibreuse et leur assemblage ne nécessite pas d'hydrolyse de l'ATP. Les FI s'organisent d'abord en tétramère. 8 de ces tétramères vont s'attacher entre eux pour former une structure qui va s'enrouler pour former une structure en corde.

Chez la plupart des vertébrés, les FI forment un réseau au sein du cytoplasme qui va s'étendre radialement dans toutes les directions depuis la structure en forme de cage qui enferme le noyau jusqu'à la surface. Cette organisation confère aux FI un rôle évident de relais d'information entre la surface et les compartiments internes de la cellule. Dans le contexte de la mécanotransduction, les filaments intermédiaires constituent un réseau élastique capable de transmettre les signaux mécaniques de la MEC au sein de la cellule (Sanghvi-Shah and Weber, 2017). L'assemblage de fibre de stress peut également être indirectement modulée par vimentine. Ce mécanisme passe par la régulation de la GEF de RhoA (GEF-H1) (Y et al., 2017).

### *c) Les microtubules*

La tubuline constitue l'unité de base des microtubules, elle est formée par l'assemblage d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Cet hétérodimère  $\alpha/\beta$  va ensuite se polymériser pour former un protofilament. Par la suite 13 protofilaments vont s'assembler entre eux de manière à former un cylindre. Tout comme les autres composants du cytosquelette, les microtubules sont des structures dynamiques qui vont jouer un rôle à tous les niveaux dans la cellule.

Outre leur rôle dans le transport vésiculaire bien connu de la littérature et leur rôle dans la séparation des chromosomes, les microtubules peuvent également jouer un rôle dans la mécanotransduction. Par exemple l'inhibition de l'intégrine  $\beta 1$  empêche la polymérisation des microtubules (Yutao et al., 2006). Les signaux mécaniques sont également capables de stabiliser les microtubules en promouvant leur glutamylation (Torrino et al., 2021).

## 2) Les voies de signalisation de la mécanotransduction

### a) Le cofacteur transcriptionnel MRTF

MRTF-A et B (Myocardin Related Transcription Factor) sont des cofacteurs de transcription de la famille des myocardines. La liaison de ces cofacteurs au facteur de transcription SRF (Serum Response Factor) stimule son activité transcriptionnelle (Wang et al., 2002). A cause de leur similarité de structure, MRTF-A et B ont des fonctions similaires, ce qui explique pourquoi certains défauts induits par la perte de SRF ne peuvent être reproduits qu'avec la perte des deux isoformes (Sun et al., 2009). Nous utiliserons donc par la suite « MRTF » pour désigner les deux isoformes. L'activité transcriptionnelle de MRTF dépend strictement de sa localisation subcellulaire. La voie de signalisation MRTF-SRF est très sensible à la concentration d'actine G monomérique qui va participer à sa séquestration dans le cytoplasme. Au contraire lorsque la polymérisation de l'actine est stimulée par l'activation constitutive de Rho on va observer une accumulation nucléaire de MRTF et son association avec SRF (Miralles et al., 2003; Mouilleron et al., 2008). La liaison de MRTF à l'actine nucléaire va mener à son exportation du noyau et sera facilitée par la phosphorylation de MRTF par l'effecteur final de la voie des MAPk (Muehlich et al., 2008, p. 1) (fig15).

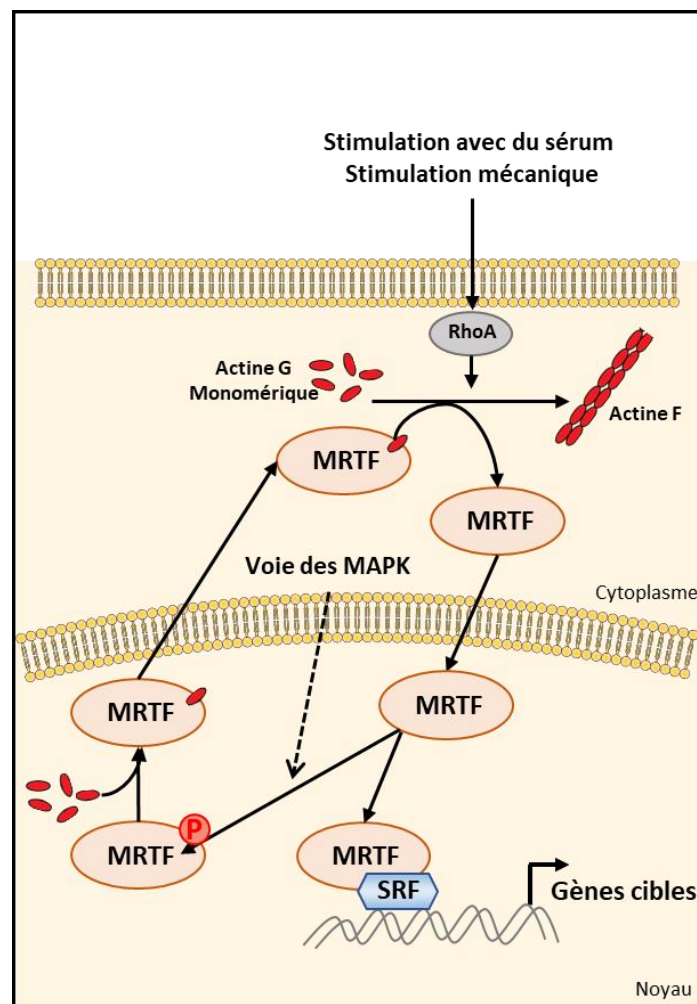


Figure 15 : L'activation de MRTF dépend des signaux mécaniques et du remodelage du cytosquelette d'actine

Considérant son lien avec le cytosquelette d'actine, on comprend que l'activité de MRTF peut aussi être contrôlée par les signaux mécaniques convoyés par le microenvironnement. En effet comme on a

pu le voir, le cytosquelette d'actine peut être remodelé par les forces biomécaniques (Fig15). La littérature indique que ce remodelage promeut la localisation nucléaire de MRTF (Iyer et al., 2012). Les premiers indices de l'activité de mécanosenseur de MRTF proviennent d'une étude de 2004 montrant que l'accumulation nucléaire de MRTF est induite par un étirement de la cellule (Somogyi and Rørth, 2004). Les intégrines jouent également un rôle dans l'activité transcriptionnelle de MRTF grâce à leur lien direct avec le cytosquelette d'actine (Maier et al., 2008). Une étude de 2017 montre que certains gènes cibles de MRTF tels que Myh9 ou SRF sont des régulateurs de la contraction du cytosquelette ce qui génère une boucle de rétrocontrôle positive et renforce la signalisation MRTF. De plus cette étude nous indique qu'il existe une dépendance mutuelle entre la transduction des signaux mécanique dépendant de MRTF et celle dépendante de YAP (Foster et al., 2017).

#### *b) Les coactivateurs transcriptionnels YAP et TAZ*

YAP (Yes Associated Protein) et TAZ (Transcriptional CoActivator With PDZ -Binding Motif), sont les effecteurs de la voie Hippo. Comme ce sont des coactivateurs de la transcription, pour induire leur programme transcriptionnel, ils vont devoir former des complexes avec des facteurs de transcription tel que TEAD (Transcriptional Enhance Associate Domain), RUNX1/2 ou p73. La voie Hippo est une cascade de phosphorylation qui va conduire à la phosphorylation et à la dégradation de YAP/TAZ. Cette voie permet la transmission de signaux depuis la membrane plasmique vers le noyau et contrôle divers processus cellulaires tel que la survie, la prolifération et la différenciation. La voie hippo ne semble pas être placée sous la régulation d'un couple ligand-récepteur dédié, mais est régulée par un réseau de protéines et mécanisme qui sont impliqués dans la l'adhésion cellulaire et la polarité. Le cœur de la voie Hippo est composé de deux familles de sérine-thréonine kinases MST1/2 et LATS1/2. Lorsque que ces kinases sont actives, la voie Hippo est considérée comme active (Fig16). Ces kinases vont ensuite phosphoryler leur cible YAP et TAZ (Johnson and Halder, 2014). Cette phosphorylation va résulter en l'exclusion de YAP/TAZ du noyau. Ils seront ensuite séquestrés dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 et seront ubiquitinés par l'E3 ligase  $\beta$ -TRCP au niveau d'un phosphodégron du côté Cterm (Fig16). Cette ubiquitination va conduire YAP et TAZ à la dégradation au niveau du protéasome (Lei et al., 2008; Zhao et al., 2010). Au contraire, lorsque la voie Hippo est inactive, YAP et TAZ vont s'accumuler dans le noyau, se lier à leur facteur de transcription pour activer la transcription de leurs gènes cibles.

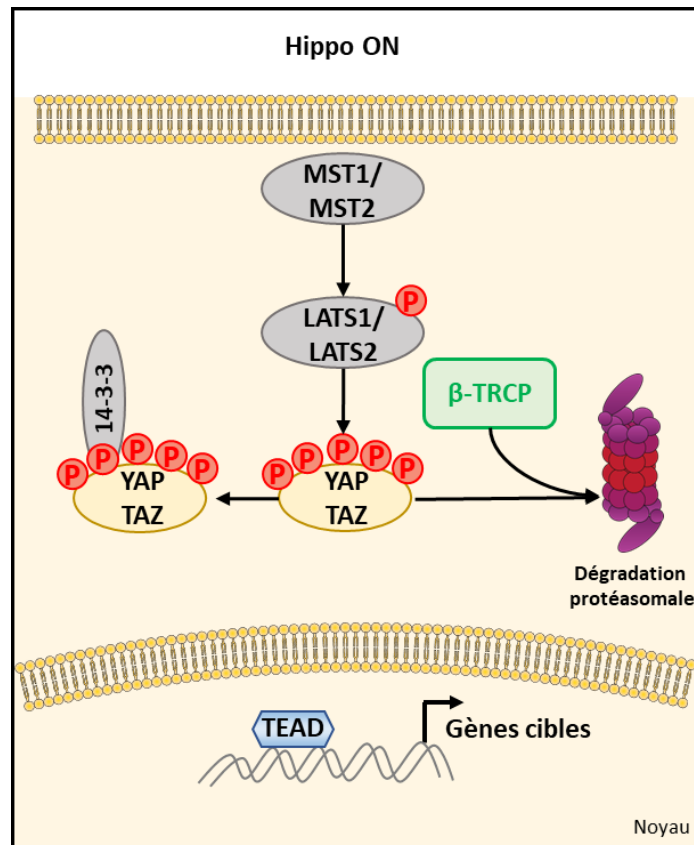


Figure 16 : Activation de la voie Hippo

La voie Hippo est impliquée dans le contrôle de la croissance des organes lors de l'embryogenèse (Halder and Johnson, 2011), mais aussi dans la biologie des cellules souches (Ramos and Camargo, 2012). Du fait de son action inhibitrice sur YAP cette voie peut également être considérée comme un suppresseur de tumeur (Pan, 2010). En effet la surexpression de YAP ou la perte d'activité de MST entraîne une prolifération accrue des cellules et une dérégulation de l'apoptose (Huang et al., 2005).

YAP et TAZ partagent une homologie de 46%, ils possèdent tous les deux plusieurs domaines communs, notamment leur domaine de liaison à TEAD et un domaine transactivateur TAD qui contient le phosphodégron révélé par leur phosphorylation lors de l'activation de la voie Hippo (Piccolo et al., 2014). La similarité entre ces deux protéines est assez forte pour créer des redondances, mais il existe des différences biochimiques entre les deux paralogues qui permettent des rôles et une régulation différente (LeBlanc et al., 2021). Par exemple la présence d'un second phosphodégron à l'extrémité Nterm de TAZ diminue sa demi-vie. Dans le fibroblaste embryonnaire murin, la demi-vie de TAZ n'est que de 2h tandis que YAP reste stable pendant 6h (Huang et al., 2012; Miranda et al., 2017).

En 2011, une étude montre que les cofacteurs de transcription YAP/TAZ sont régulés par la rigidification de la matrice extracellulaire. En effet les contraintes mécaniques générées par l'augmentation de la rigidité provoquent un remodelage du cytosquelette d'actine en fibres de stress dépendant de la voie ROCK (Fig17). Cette conformation particulière des filaments d'actine va permettre la translocation de YAP/TAZ dans le noyau en réponse à la rigidité matricielle et donc l'activation de leur programme génétique. Il est intéressant de noter que ce mécanisme est complètement indépendant de la voie Hippo. YAP et TAZ sont donc des mécanosenseurs qui vont mettre en place un programme transcriptionnel spécifique en réponse aux signaux de rigidité matricielle (Dupont et al., 2011). La localisation de YAP dépend également de la morphologie des cellules, la topologie de la matrice et des forces de cisaillement (Panciera et al., 2017). En temps normal, une forte densité cellulaire active la voie Hippo et inhibe la localisation nucléaire de YAP/TAZ. Néanmoins la rigidité matricielle est capable de forcer la localisation nucléaire de YAP/TAZ en passant outre l'activation de la voie Hippo (Aragona et al., 2013).

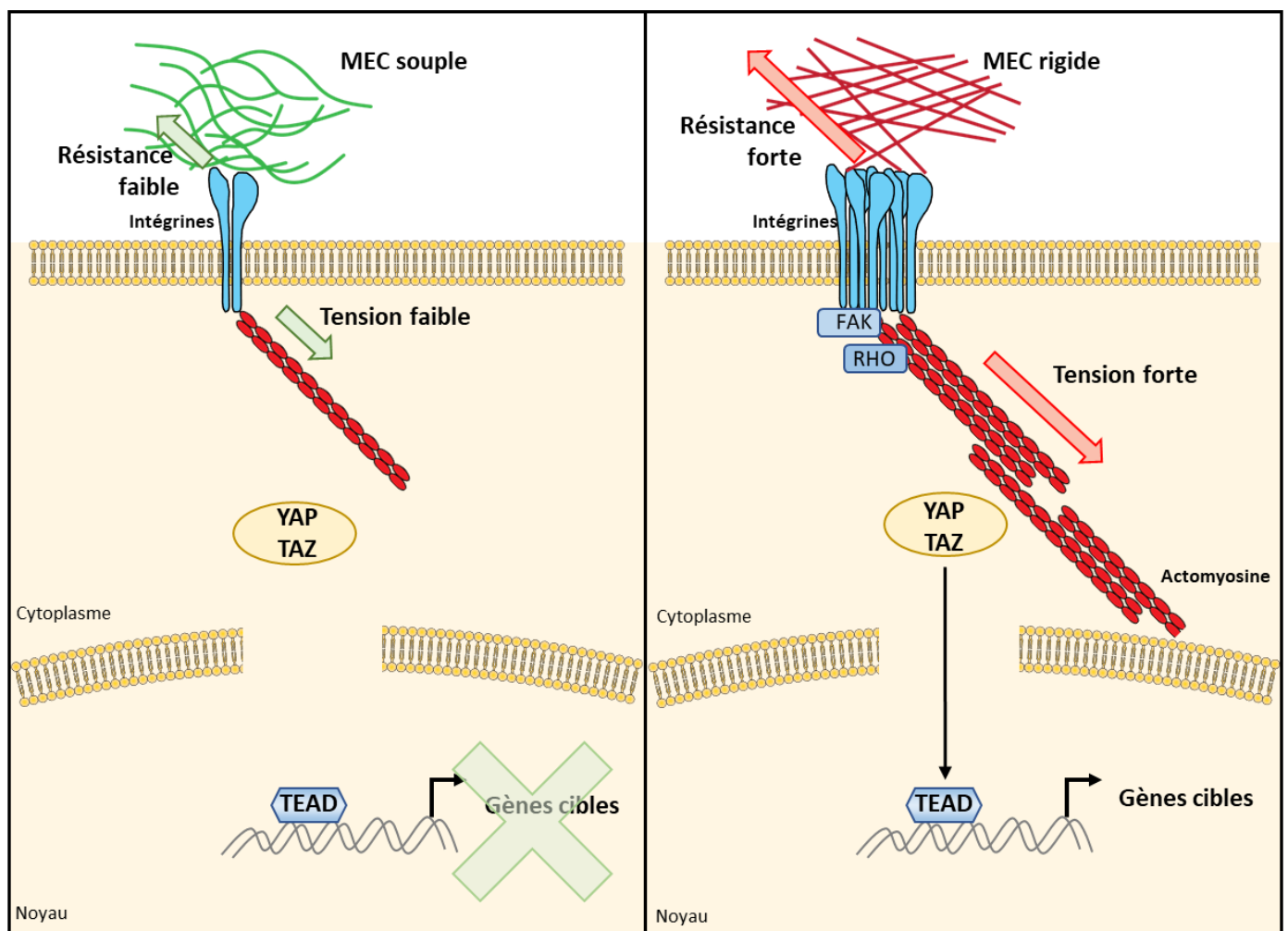


Figure 17 : L'activation de YAP et TAZ est contrôlée par les signaux mécaniques

A gauche, une matrice souple ne permet pas la relocalisation de YAP/TAZ dans le noyau. A droite, une matrice rigide induit la translocation de YAP et TAZ dans le noyau dépendamment du cytosquelette d'actomyosine.

#### F. Rôle de la mécanotransduction dans le cancer

Les cellules cancéreuses entretiennent un dialogue complexe et constant avec leur environnement, et la matrice extracellulaire n'est pas exclue de ce dialogue. Comme on a pu le voir, les cellules tumorales

manipulent la MEC afin de se créer une niche favorisant le développement tumoral. Une conséquence de ce remodelage matriciel est la rigidification des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains. Typiquement le stroma tumoral du cancer du sein peut-être 10 fois plus rigide que le tissu normal en partie grâce à l'action des enzymes de réticulation du collagène (Levental et al., 2009). De plus la littérature note que l'apparition de cette rigidité n'est pas seulement un effet secondaire de la maladie mais constitue également un facteur de risque (Levental et al., 2009) (Panciera et al., 2020). Ces changements dans les propriétés mécaniques de la MEC sont également associés à une plus forte agressivité tumorale et une moins bonne survie des patients (Lu et al., 2012).

### 1) Rôle dans l'angiogénèse

Les signaux mécaniques générés par une matrice rigide sont capables de stimuler la formation aberrante de vaisseaux sanguins au sein de la niche tumorale (Zanotelli and Reinhart-King, 2018). En effet les cellules endothéliales au sein de la tumeur présentent une activation anormale, une augmentation de leurs propriétés angiogéniques et d'adhésion cellulaire le tout associé à une dérégulation des voies de la mécano-transduction (Mason et al., 2013; Sieminski et al., 2004). La reprogrammation des cellules endothéliales exposées à une matrice rigide semble persister une fois retirées de leur environnement (Dudley, 2012). La rigidification de la matrice extracellulaire peut également augmenter l'expression du récepteur VEGF2 qui contrôle la croissance et la survie des cellules endothéliales (Coon et al., 2015; Zanotelli and Reinhart-King, 2018).

### 2) Rôle dans la réponse immunitaire

La rigidification de la MEC peut également compromettre la réponse immunitaire anti-tumorale de façon intéressante, la rigidification de la matrice peut inhiber la prolifération des lymphocytes T en affectant la production d'IL2 nécessaire à la prolifération de ces derniers (O'Connor et al., 2012). Comme on l'a vu dans la partie B. 2), une matrice plus riche en collagène et donc plus rigide va stimuler la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 plus permissif pour les tumeurs (Wesley et al., 1998). De plus une étude récente montre que YAP joue un rôle dans la mise en place du phénotype M2 via un mécanisme dépendant de l'ubiquitination (Zhang et al., 2021).

### 3) Rôle dans la prolifération

En présence d'une matrice extracellulaire rigide, les cellules vont présenter une capacité de prolifération accrue. Les signaux mécaniques convoyés depuis les adhésions focales, sont capables de recruter la voie Rho via la phosphorylation de la kinase FAK. Ce mécanisme va avoir pour conséquence la mise en place d'un programme génétique favorisant la prolifération (Provenzano and Keely, 2011). La rigidité matricielle est également capable d'induire la prolifération cellulaire en empêchant l'activité de suppresseur de tumeur comme P53 et PTEN (Ingallina et al., 2018; Mouw et al., 2014)

Dans le contexte du mélanome, une étude montre que la rigidification de la matrice de collagène induit la différenciation des cellules de mélanome via l'axe YAP/PAX3/MITF. Comme on a pu le voir dans la partie I, les cellules de mélanome qui présentent une forte expression de MITF sont caractérisées par des capacités prolifératives accrues. De façon intéressante, cette étude montre que la stimulation au TGF- $\beta$  empêche la mise en place de cet axe au profit de l'axe YAP/TEAD/SMAD (Miskolczi et al., 2018). Les cellules prennent ainsi un phénotype dédifférencié plus invasif. Cette implication de YAP et de la

rigidité matricielle au cœur des propriétés plastiques du mélanome soulignent l'importance d'étudier ce cancer dans le contexte de la mécanobiologie.

#### 4) Rôle dans la migration et l'invasion

Les signaux mécaniques provenant d'une MEC rigide sont également capables d'influencer la migration et l'invasion des cellules tumorales. En effet, la rigidification de la MEC peut promouvoir la transition épithélio-mésenchymateuse grâce à la production de TGF- $\beta$  et l'activation de la voie PI3K/AKT (Leight et al., 2012). Ces signaux peuvent également induire la formation d'adhésions focales qui vont participer à la migration et à l'invasion des cellules (Levental et al., 2009; Parekh et al., 2011). Ils peuvent aussi induire une augmentation de l'activité MMP permettant ainsi aux cellules cancéreuses de dégrader la matrice extracellulaire et rejoindre la circulation lymphatique ou sanguine (Haage and Schneider, 2014).

Dans le cadre du mélanome qui est notre modèle d'étude, la rigidification de la MEC facilite l'invasion et la dissémination métastatique. Une étude de 2014 montre que le passage de la phase RGP vers la phase VGP est associé à la diminution de la rigidité intracellulaire. Ce mécanisme va faciliter l'invasion du stroma tumoral en permettant à la cellule de se déformer plus facilement. Cette capacité de modulation de la rigidité intracellulaire permet aux cellules de mélanome de s'adapter plus facilement et rapidement au changement de contexte d'adhésion à la MEC (Weder et al., 2014). Une étude récente de 2019 montre que la rigidification de la MEC augmente significativement la capacité de croissance et de migration de cellules caractérisées peu métastatiques (Li et al., 2019). De plus la perte de l'expression de YAP/TAZ conduit à une diminution d'invasion des cellules de mélanome *in vitro* et *in vivo*. Cette observation soulève un potentiel rôle de ces deux mécanosenseurs dans l'augmentation des capacités migratrices et invasives des cellules de mélanome induites par la rigidification de la MEC (Nallet-Staub et al., 2014).

#### 5) Rôle dans la résistance aux thérapies

Il n'est pas rare de voir que les tissus cancéreux sont plus fibrotiques que les tissus sains. D'un point de vue mécanistique, la densification de la MEC qui est associée à la rigidification peut constituer une barrière physique au traitement. On a vu que la rigidification de la MEC pouvait induire une hypervascularisation au sein des tumeurs. Ce phénomène va générer des forces hemodynamiques importantes pouvant conduire les cellules à un état hypoxique plus résistant aux thérapies et favorisant la progression (Broders-Bondon et al., 2018; Karakashev and Reginato, 2015). Dans des cancers où la fibrose joue un rôle important comme le cancer du pancréas ou du poumons, il a été montré que la voie YAP/TAZ pouvait favoriser la résistance aux chimiothérapies (Rice et al., 2017; Wu et al., 2021). Dans le cancer du sein l'action de ces mécanosenseurs est également reliée à une plus grande rigidité matricielle et une résistance aux chimiothérapies (Joyce et al., 2018).

Au sein du mélanome, notre équipe montre que la matrice produite par les fibroblastes associés au cancer protège les cellules de mélanome. Cette première étude montre l'importance des DDRs qui sont des récepteurs associés à la mécanotransduction dans la résistance au traitement des cellules de mélanome. De plus plusieurs études de notre groupe montrent que le traitement aux thérapies ciblées induit une densification du réseau de collagène au sein de la tumeur. Cette rigidification induit la translocation des mécanosenseurs YAP et MRTF dans le noyau où ils engagent un programme transcriptionnel. Ce programme va en retour renforcer le phénotype rigide de la MEC déclenchant ainsi une boucle d'amplification positive qui conduit les cellules à l'échappement thérapeutique (Fig8). Le



ciblage de la fibrose induite par les thérapies ciblées avec un antifibrotique ou l'inhibition de YAP avec la Vertéporfine empêche le remodelage de la matrice et limite la rechute. Ainsi le ciblage de cette boucle apparaît crucial dans la lutte contre la résistance mécano-induite des mélanomes.

De plus le potentiel lien de ce mécanisme avec la résistance croisée aux immunothérapies développée dans le chapitre I, souligne la pertinence de poursuivre l'étude de cette boucle d'amplification conduisant à la mécanorésistance au traitement des cellules de mélanome. C'est pourquoi l'identification de nouveaux acteurs de ce mécanisme apparaît comme une nécessité afin d'abroger complètement sa mise en place.

## G. Conclusion

Certes l'activation de voies de signalisation permet à la cellule de mélanome de développer une résistance mécanodépendante aux thérapies ciblées, mais elle va aboutir à la surexpression de nombreuses protéines. Cette surcharge protéique va déstabiliser l'homéostasie protéique ou protéostasie au sein de la cellule. Pour pallier à ce problème, les cellules vont se reposer sur une suractivation de leurs systèmes de contrôle de la protéostasie tels que le système ubiquitine-protéasome (SUP) qui va dégrader les protéines indésirables. Pour maintenir la balance il existe une classe d'enzyme les déubiquitinases ou DUBs dont l'un des rôles est de contrer la dégradation de ces protéines. Dans le cancer ces enzymes sont fréquemment détournées pour stabiliser des oncogènes tels que YAP ou TAZ qui peuvent être dégradé au protéasome via leur phosphodégrons. Dans ce contexte, nous proposons d'identifier de nouveaux acteurs de cette boucle de signalisation au sein du SUP et plus particulièrement par les DUBs.

### III. Le système ubiquitine protéasome

#### A. Ubiquitination : généralités

Pour s'adapter à leur environnement, les cellules, à l'aide de leur matériel génétique, vont générer une multitude de protéines effectrices. Cet ensemble de protéines appelé le protéome constitue l'adaptation des cellules à leur environnement.

Afin de maintenir l'homéostasie du protéome (ou protéostasie) de nombreux mécanismes sont mis en place par la cellule pour réguler l'activité, la localisation ou la stabilité des protéines déjà existantes. Cela permet de lui éviter une synthèse protéique excessive coûteuse en énergie tout en maintenant la protéostasie. On parle alors de modifications post-traductionnelles qui prendront la forme de clivages ou liaisons covalentes entre une protéine et une autre protéine/groupement moléculaire. Ces modifications peuvent être classées en trois groupes, le clivage, la liaison (par exemple la phosphorylation ou l'ubiquitination) ou la réticulation (par exemple la formation de ponts disulfure ou la glycosylation) (Farriol-Mathis et al., 2004). La phosphorylation qui est l'ajout d'un groupement phosphate inorganique en est l'exemple le plus frappant. Cet ajout qui est généralement activateur est essentiel à la biologie de la cellule notamment des cascades de signalisation tel que la voie des MAPK.

Le maintien de la protéostasie passe également par la protéolyse qui permet l'élimination de protéines endommagées, en surnombre ou à courte durée de vie. La protéolyse d'une protéine libère les acides aminés qui la constituent et les redirige vers la synthèse protéique. Il existe plusieurs systèmes de dégradation chez la cellule eucaryote dont les principaux sont : les lysosomes, l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome (SUP).

Avant la découverte du système ubiquitine-protéasome à la fin des années 70 (Ciechanover et al., 1980), on considérait que la dégradation des protéines au sein de la cellule se faisait exclusivement au niveau des lysosomes indépendamment de l'ATP. Cette découverte va secouer notre compréhension de la protéolyse cellulaire et aboutira à un prix Nobel de chimie en 2004. De nos jours le SUP est reconnu comme le système principal de la dégradation des protéines au sein de la cellule (environ 80% des protéines sont dégradées au protéasome)(Rock et al., 1994). Du fait de son importance capitale pour la cellule le SUP va se retrouver impliqué dans un très grand nombre de processus cellulaires, mais aussi dans de nombreuses pathologies (Glickman and Ciechanover, 2002; Swatek and Komander, 2016).

Le fonctionnement du système ubiquitine-protéasome se décompose en plusieurs étapes. La liaison covalente d'une protéine à l'extrémité C-term d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine est appelée l'ubiquitination, cette liaison se fera généralement sur une lysine (mais pourra aussi se faire sur une serine, une thréonine, une cystéine ou encore une méthionine en position N-term). L'ubiquitination implique une cascade de trois classes d'enzymes. En premier lieu, une enzyme d'activation E1 (ubiquitin activating enzyme) va consommer un ATP pour former une liaison thioester entre l'extrémité C-term de l'ubiquitine et la cystéine de son domaine catalytique ce qui va activer l'ubiquitine. Une fois activée l'ubiquitine est transférée à une enzyme de conjugaison E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) qui va coopérer avec une enzyme de liaison E3 (ubiquitin ligase) et transférer l'ubiquitine sur le substrat (Fig18, Fig21).

Après la mise en place de cette liaison le code véhiculé par l'ubiquitine sera lu par des protéines possédant un domaine de liaison à l'ubiquitine (Ubiquitin Binding Domain ou UBDs) qui détermineront le destin de la protéine ubiquitinée (dégradation protéasomale, localisation subcellulaire etc...).

## B. Les ubiquitines ligases

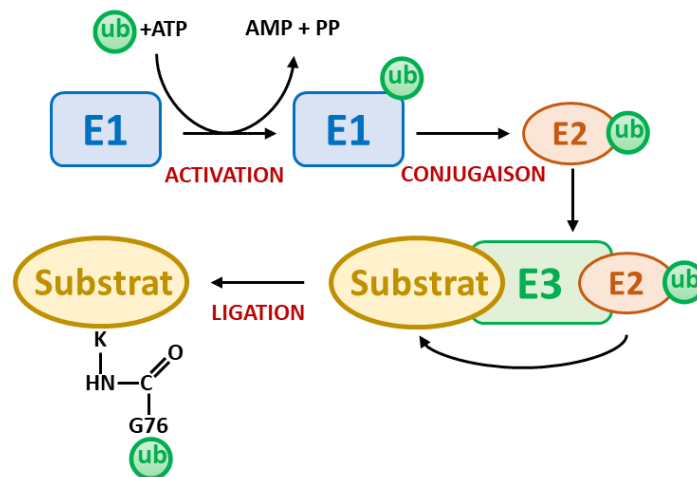


Figure 18 : Schéma du mécanisme de l'ubiquitination

L'ubiquitination passe par trois étapes, l'activation catalysée par une enzyme E1, la conjugaison prise en charge par une enzyme E2 et la ligation au substrat catalysée par une enzyme E3.

### 1) Les enzymes activatrices E1

La première étape de l'ubiquitination consiste à activer l'extrémité C-term de l'ubiquitine. Cette réaction est catalysée par une enzyme spécifique de l'ubiquitine appelée E1. Chez les eucaryotes, cette réaction se divise en deux étapes, une première étape formant un intermédiaire Ub-adénylate qui va lui permettre de former un pont thioester avec l'enzyme E1 sur un résidu cystéine. Bien qu'il existe 9 enzymes activatrices E1 seulement deux d'entre elles, UBA1 et UBA6 (Ubiquitin-Like Modifier-Activating Enzyme), sont spécifiques de l'ubiquitine. Cela implique l'existence de protéines semblables à l'ubiquitine appelées « ubiquitin like proteins » ou Ubls qui vont dépendre du même type de cascade d'activation (Schulman and Harper, 2009).

Après la formation du complexe E1-Ub, l'enzyme E1 va transférer l'ubiquitine à une enzyme de conjugaison E2.

### 2) Les enzymes de conjugaison E2

La seconde étape de la cascade d'ubiquitination consiste au transfert de l'Ub (ou de l'Ubl) du résidu cystéine de l'enzyme E1 à une cystéine de l'enzyme E2.

On dénombre une quarantaine d'enzymes de conjugaison E2 qui présentent toutes un domaine globulaire d'environ 150 acide aminés nécessaires à l'activité catalytique connu sous le nom de « Ubiquitin Conjugaison Domain ». Ce domaine va contenir la cystéine catalytique sur laquelle sera transférée l'Ub activée par l'enzyme E1 (Ye and Rape, 2009). En addition certaines enzymes E2 possèdent des extensions N ou C-term qui pourraient réguler leur activité intrinsèque, la reconnaissance du substrat ou encore la sélection de l'enzyme E3. Cette dernière caractéristique confère à ces enzymes un rôle de tri des substrats en les menant vers un type d'ubiquitination particulier.

### 3) Les enzymes de liaison E3

La dernière étape de l'ubiquitination est catalysée par les enzymes de liaison E3 ou E3-ligases qui vont médier le transfert de l'Ub de l'enzyme E2 au substrat. L'extraordinaire diversité des substrats de la cascade de l'ubiquitination peut être en partie expliquée par la grande diversité de ces enzymes qui forment une famille de plus de 600 membres. Cette famille se scinde en quatre groupes : les HECT (homologous to the E6AP carboxyl terminus), les RING (Really Interesting New Gene), les U-box et les RBR (RING-InBetweenRing-RING) E3-ligases.

#### a) HECT

Les HECT E3 ligases possèdent un mécanisme unique parmi les E3 ligases, puisqu'elles forment un pont thioester avec l'ubiquitine. Ce mécanisme est dépendant du domaine HECT qui se trouve au Cterm de l'enzyme et qui accepte l'ubiquitine issue de l'intermédiaire E2-Ub sur un résidu cystéine conservé. La partie Nterm de l'enzyme, quant à elle, va interagir avec le substrat afin de lui conjuguer l'ubiquitine (Metzger et al., 2012; Pickart and Eddins, 2004).

#### b) RING

Le domaine RING est un court motif riche en résidus cystéines et histidines qui va permettre de coordonner deux ions zinc. L'E2 va pouvoir interagir avec ce domaine de façon non covalente. Cela veut dire que le rôle des RING E3 ligases est d'augmenter la probabilité de réaction en approchant spatialement la lysine du substrat et l'intermédiaire E2-Ub (Metzger et al., 2012; Pickart and Eddins, 2004).

#### c) U-box

Une petite famille d'E3 ligase a pu être identifiée à l'aide d'un domaine de liaison aux enzymes E2 appelé U-box. Comme les RING E3 ligases, les U-box E3 ligases agissent comme une plateforme pour orienter le complexe E2-Ub vers le substrat. La similarité de ce mécanisme avec celui des RING E3 ligases se retrouve également au niveau de la structure du domaine U-box qui ressemble à celle du domaine RING (Pickart and Eddins, 2004).

#### d) RBR

La particularité des RBR E3 ligases c'est que ce sont des protéines à multidomaines complexes. Au sein de ces protéines on trouve deux domaines RING1 et RING2 qui entourent un domaine IBR pour « In Between RING » qui donne son nom à cette classe d'E3 ligases. RING2 n'est pas un domaine RING classique et possède une unique cystéine catalytique qui va pouvoir accepter une Ub de la part d'une enzyme E2. Le domaine RING1 quant à lui va permettre la reconnaissance de l'enzyme E2 (Spratt et al., 2014). Parmi ces enzymes on trouve deux composants de LUBAC (Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex), à savoir HOIP mais aussi parkin qui est impliqué dans la maladie de Parkinson (Komander and Rape, 2012; Spratt et al., 2014).

## C. Le code de l'ubiquitine

### 1) La molécule d'ubiquitine

L'ubiquitine comme son nom l'indique, est une protéine de 76 acides aminés ubiquitaires et hautement conservées chez les eucaryotes. Au sein de sa structure, l'ubiquitine présente 7 résidus lysines : K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63 sur lesquels va pouvoir se former des liaisons isopeptidiques avec la protéine cible ou d'autre molécule d'ubiquitine. Ce rôle pourra également être joué par la méthionine en position 1 (M1) et la glycine en position 76 (G76). Ces résidus permettront ainsi la formation de chaînes de poly-ubiquitines qui sont une des caractéristiques principales de l'ubiquitination (Fig20).

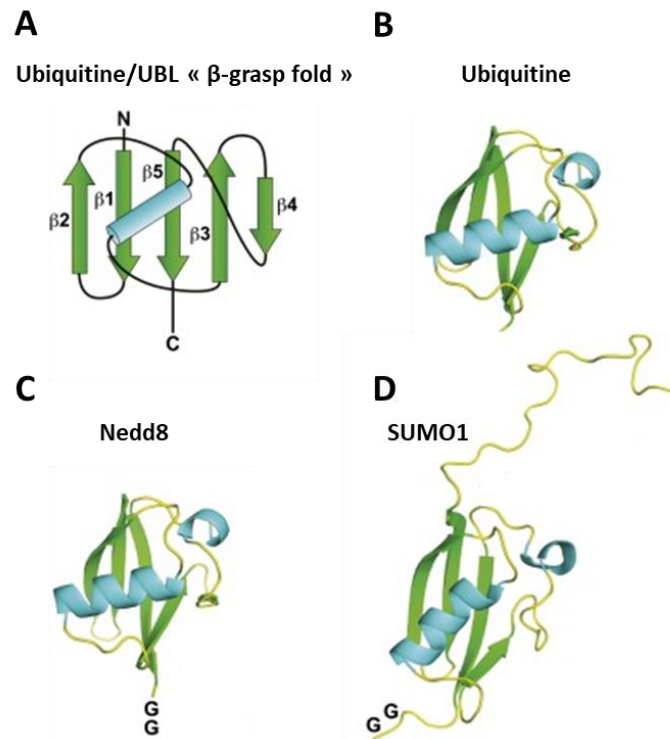


Figure 19 : Représentation de la structure 3D d'une molécule d'ubiquitine ou d'Ubl

A. Structure générale des Ub/UBL. B. Structure tertiaire d'une molécule d'ubiquitine C. Structure tertiaire d'une molécule Nedd8. D. Structure tertiaire d'une molécule SUMO1. Adapté de (Vierstra, 2012)

### 2) Les « ubiquitin like proteins »

Ce sont des protéines dont la séquence et la structure tridimensionnelle sont apparentées à l'ubiquitine. Tout comme l'Ub, les UBLs présentent toutes une structure tertiaire composée d'une hélice  $\alpha$  maintenue en place par 5 feuillet  $\beta$  que l'on appelle un «  $\beta$ -grasp fold » (Hochstrasser, 2009) (Fig19). Elles sont conjuguées au substrat via une cascade enzymatique qui ressemble à celle de l'ubiquitination. Il existe environ une dizaine d'UBL qui sont impliquées dans un nombre variés de processus cellulaires, comme le transport nucléaire, la traduction, les voies antivirales etc... (van der Veen and Ploegh, 2012).

Si on omet l'ubiquitine, SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) est l'UBL la plus étudiée. La cascade de sumoylation est très semblable à l'ubiquitination et aboutit à une modification covalente et réversible du substrat. Une centaine de substrats de la sumoylation ont pu être identifiés et la plupart d'entre eux contiennent un site accepteur de SUMO. La sumoylation peut altérer les interactions moléculaires du substrat en masquant ou en ajoutant des surfaces d'interaction (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Cette modification peut aboutir en fonction du substrat à un changement de

localisation subcellulaire, d'activité ou de stabilité. La sumoylation intervient dans un grand nombre de processus incluant les voies de réparation de l'ADN, la transcription, la progression du cycle cellulaire ou encore le trafic des protéines.

Parmi les autres UBI on peut retrouver NEDD8 qui sera notamment impliquée dans l'activation de l'activité E3 ligase des cullin-Ring-ligases qui sont-elles même responsables de l'ubiquitination de 20% des protéines régulées par le protéasome. On peut aussi citer ISG15 qui va jouer un rôle dans les voies antivirale.

### 3) Le type de liaison à l'ubiquitine

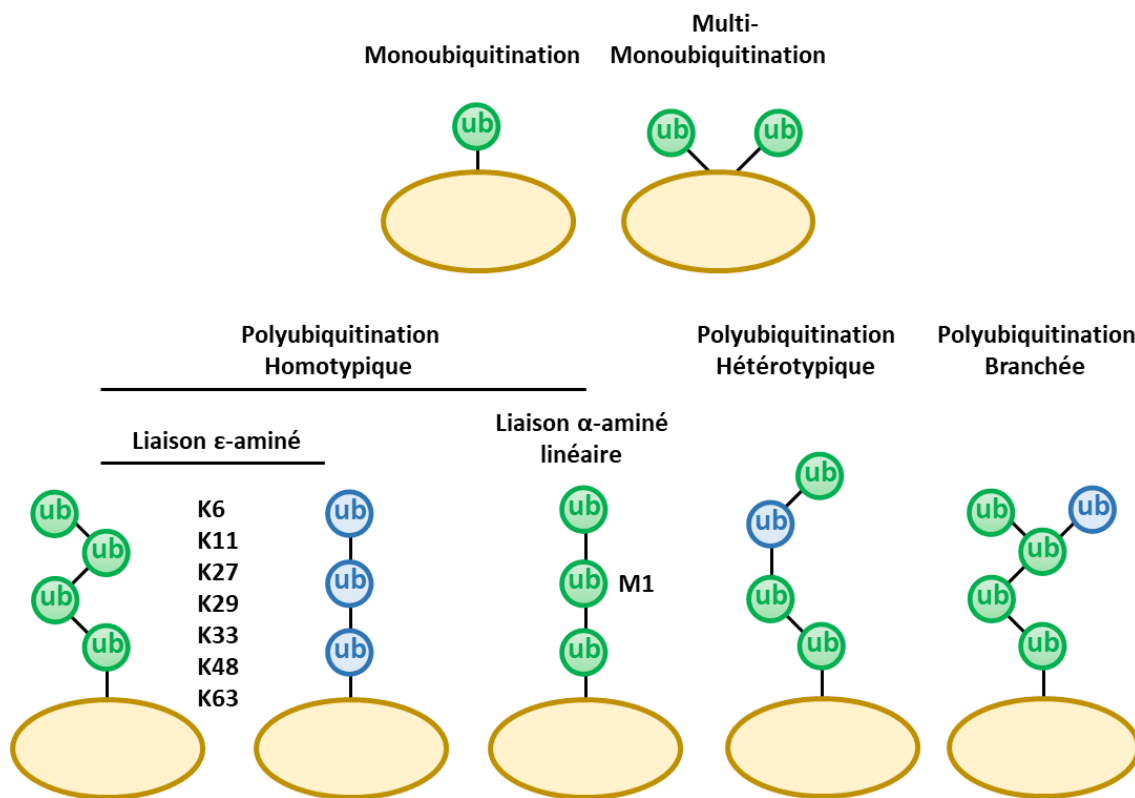


Figure 20 : Schéma représentant les différents types d'ubiquitination

#### a) La monoubiquitination

La monoubiquitination consiste en l'ajout d'une seule molécule d'Ub sur la lysine d'un substrat (Fig20). Bien qu'étant la plus simple modification possible du code de l'ubiquitine, elle va coordonner de nombreux processus au sein de la cellule. Par exemple la monoubiquitination des histones H2A et H2B permet le recrutement d'histone méthyltransférase ce qui va impacter la transcription (Weake and Workman, 2008). La monoubiquitination est également connue pour réguler l'activité de protéines membranaires en déclenchant leur internalisation par endocytose (Nakatsu et al., 2000). Elle agit comme un signal d'endocytose pour les protéines membranaires devant être « down-régulées ». Ce processus est conservé dans l'évolution de la levure jusqu'au mammifère.

### *b) La multi-monoubiquitination*

La multi-monoubiquitination est la monoubiquitination d'un substrat sur plusieurs lysines (Fig20). Ce type d'ubiquitination va permettre l'internalisation de récepteurs membranaires (par exemple PDGFR et EGFR) afin de permettre leur recyclage ou leur dégradation au niveau des lysosomes (Haglund et al., 2003). Le principal médiateur de ce mécanisme est le complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) qui va contrôler le triage des endosomes contenant ces récepteurs multi-monoubiquitinés.

### *c) La polyubiquitination*

La polyubiquitination va permettre la transmission d'un signal via l'ajout d'une chaîne d'Ub au substrat cible. Comme évoqué précédemment, la molécule d'Ub possède un résidu méthionine (M1) et 7 résidus lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) capables de former une liaison isopeptidique avec une autre molécule d'Ub au niveau de sa glycine 76. Cette caractéristique est à l'origine de la grande richesse du code ubiquitine puisque chacun de ces résidus lysines permet la formation d'une chaîne d'Ub homotypique, hétérotypique ou branchée (Fig20). En effet chaque type de liaison va présenter une conformation unique qui va exposer différentes régions de l'ubiquitine conférant ainsi à la chaîne d'Ub sa spécificité qui la différencie d'autres chaînes (Komander and Rape, 2012). La formation de ces chaînes est permise par les enzymes E3 et/ou les enzymes E2 qui seules ou en complexe, vont promouvoir une conformation limitant l'addition d'Ub à un certain type de liaison.

Le rôle des chaînes d'ubiquitine dans la dégradation des protéines est bien établi, mais elles ne sont pas exclusivement dédiées au processus de dégradation. Ici nous allons voir les lister de manière non exhaustive les fonctions connues des différentes chaînes homotypiques d'ubiquitine (Swatek and Komander, 2016).

Les chaînes K6 :

Le rôle des chaînes d'ubiquitine en K6 est encore méconnu bien que l'absence d'accumulation de ce type de chaîne à la suite de l'inhibition du protéasome semble indiquer un rôle non-dégradatif. En effet une première étude relie les liaisons en K6 à la voie de réponse au dommage à l'ADN en condition de stress génotoxique via le complexe E3 ligase BRCA1/BARD1. Une seconde étude relie les chaînes d'Ub en K6 à l'homéostasie mitochondriale. Ainsi les chaînes en K6 assemblées par l'E3 ligase parkin participent au recyclage des mitochondries endommagées ou en excès via le processus de mitophagie.

Les chaînes K11 :

Au contraire des chaînes en K6, les chaînes en K11 s'accumulent lorsque l'activité du protéasome est inhibée. Cette observation montre un lien entre ces chaînes et la dégradation au niveau du protéasome (Xu et al., 2009). En plus de ce rôle les chaînes en K11 sont également impliquées dans la dégradation dépendante du réticulum endoplasmique (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation ou ERAD) qui joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Matsumoto et al., 2010). Cette dernière caractéristique explique que les chaînes en K11 soient « up-régulées » dans les cellules mitotiques. Outre leur implication dans les processus dégradatifs, les chaînes en K11 régulent la stabilité du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , lors de l'adaptation des cellules à l'hypoxie (Akutsu et al., 2016; Bremm et al., 2014).

Les chaînes K27 :

De toutes les chaînes de poly-Ub, Les chaînes en lysine 27 sont les moins comprises et les moins étudiées. Cependant la littérature montre que les chaînes K27 sont « up-régulées » au niveau des

histones H2A et H2A.X lorsque que l'ADN est endommagé (notamment lors des cassures double brins) (Gatti et al., 2015). Ces chaînes servent de plateforme de recrutement pour les protéines impliquées dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN tel que 53BP1 (P53 binding protein) (Swatek and Komander, 2016).

Les chaînes K29 :

Ces chaînes sont assemblées par l'E3 ligase KIAA10/UBEC3C qui s'associe avec le protéasome (Swatek and Komander, 2016; You and Pickart, 2001). Lorsque le protéasome est inhibé, on constate un enrichissement en chaînes K29 dans la cellule suggérant un rôle dans la dégradation protéasomale (Kim et al., 2011). Au-delà de ce rôle, les chaînes en K29 semblent jouer un rôle dans la voie Wnt (Fei et al., 2013).

Les chaînes K33 :

Les chaînes en lysine 33 sont impliquées dans des processus biologiques variés. Notamment dans le trafic de l'appareil de Golgi et la membrane. Par exemple la polyubiquitination en K33 de la coronin7 va promouvoir son recrutement dans le réseau transgolgien (Yuan et al., 2014). Malheureusement les chaînes en lysine 33 restent encore méconnues comme c'est le cas de la plupart des chaînes atypiques (Swatek and Komander, 2016).

Les chaînes K48 :

Ce sont les chaînes les plus communes dans la cellule et comme les chaînes en k11 on observe une augmentation de l'abondance de ces chaînes lorsque l'activité du protéasome est abolie (Xu et al., 2009). Leur rôle primaire est donc d'adresser des protéines au protéasome. Pour que ce mécanisme fonctionne, une chaîne en K48 doit être composé de 4 ubiquitines au minimum, même si ce dogme commence à être questionné (Swatek and Komander, 2016; Thrower et al., 2000). Malgré leur association bien connue à la dégradation protéasomale, les chaînes en K48 peuvent également avoir des propriétés non-dégradatives.

Les chaînes k63 :

Les chaînes en K63, sont connues pour jouer un rôle dans le trafic intracellulaire des protéines. En effet les chaînes en K63 peuvent servir de signal d'endocytose pour certaines protéines ou récepteurs membranaires. Les chaînes d'ubiquitine en K63 sont également utiles pour l'adressage de protéines au niveau des corps multivésiculaires (Erpapazoglou et al., 2014). Les corps multivésiculaires permettront de diriger ces protéines ubiquitinées en K63 vers la dégradation lysosomiale (Pickart and Fushman, 2004). Outre leur rôle dans le trafic intracellulaire des protéines, l'Ub en K63 intervient dans la voie de réparation des dommages à l'ADN. Par exemple la poly-ubiquitination en K63 de la polymérase PCNA permet d'enclencher son activité de réparation de l'ADN (Hoegge et al., 2002). Ces chaînes sont également nécessaires à l'activation de la voie NF-κB. En effet l'ubiquitination en K63 de l'E3 ligase TRAF6 va conduire à l'activation de la kinase IKK et donc de la voie NF-κB (Pickart and Fushman, 2004).

Les chaînes linéaires en M1 :

Les chaînes linéaires en M1 peuvent être assemblées, le complexe d'assemblage des chaînes linéaires d'ubiquitine (Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex = LUBAC) qui va réguler l'inflammation et l'immunité (Kirisako et al., 2006) (Swatek and Komander, 2016). Les chaînes en M1 sont également liées à l'activation de la voie NF-κB via la modification de NEMO, une sous-unité du complexe IKK ou encore de RIPK1 (Tokunaga et al., 2009).



Domaine	UBD	Protéine représentative	Fonction
<b>BHélice <math>\alpha</math></b>	UIM	S5A (humain) et Rpn10 (levure), Vps27, STAM, epsins et RAP80 (UIMC1)	Dégradation par le protéasome, endocytose, biogénèse des MVB et réparation de l'ADN
	MIU ou IUIM	RABEX5	Endocytose
	DUIM	HRS	Biogénèse des MVB
	UBM	Polymérase ionta et reversionless 1	Tolérance aux dommages à l'ADN
	UBAN	NEMO, ABIN1-ABIN3 et optineurin	Voie de signalisation NF- $\kappa$ B
	UBA	Rad23(levure) R32A (humain), Dsk2 et NBR1	Ciblage au protéasome, régulation des kinases et autophagie
	GAT	GGA3 et TAB3	Biogénèse des MVB
	CUE	Vsp9, TAB2 et TAB3	Endocytoses et régulation des kinases
	VHS	STAM et GGA3	Biogénèse des MVB
<b>Doigts de zinc</b>	UBZ	Polymérase-h, polymérase-k et TaxBP1	Tolérances aux dommages à l'ADN et voie de signalisation NF- $\kappa$ B
	NZF	NPL4, Vps36, TAB2 (MAP3K7IP2) et TAB3 (MAP3K7IP3)	ERAD, biogénèse des MVB et régulation des kinases
	ZnF A20	RABEX5 (RABGEF1) et A20 (TNFAIP3)	Endocytose et régulation des kinases
	ZnF UBP (PAZ)	Isopeptidase T (USP5) et HDAC6	Fonction du protéasome, formation des aggresomes et autophagie
<b>PH</b>	PRU	RPN13	Fonction du protéasome
	GLUE	EAP45 (VPS36)	Biogénèse des MVB
<b>Ubc-like</b>	UEV	UEV1 et MMS2	Réparation de l'ADN, biogénèse des MVB et régulation des kinases
	Ubc	UBCH5 (UBE2D3)	Transfert d'ubiquitine
<b>Autres</b>	SH3	Sla1 et CIN85 (SH3KBP1)	Endocytose
	PFU	Ufd3 (Doa1)	ERAD
	Jab1/MPN	Prp8	Epissage de l'ARN

Tableau 2 : Diversité fonctionnelle et structurale des domaines de liaison à l'ubiquitine

Adapté de (Dikic et al., 2009a).

#### 4) Le mécanisme de reconnaissance des substrats

La grande complexité du code de l'ubiquitine implique l'existence de protéines possédant des domaines spécifiques capables de lire et d'interpréter le code. Ce sont donc ces protéines qui vont déterminer le devenir des substrats en fonction de leur type d'ubiquitination. Ces domaines que l'on

nomme UBDs (pour Ubiquitin Binding Domain) sont répartis en 5 grandes familles (Dikic et al., 2009b; Hicke et al., 2005) (Tableau 2) :

- Les UBD à hélice alpha contenant les UBA (Ub Associated domain) et les UIM (Ub Interacting Motif)
- Les UBZ ou UBD à doigt de Zinc
- Les UBD à domaine PH (Plekstrin Homology)
- Les UBD à domaine Ubiquitin-conjugating (Ubc)-like
- Et les UBD à domaine particulier

On va retrouver ces domaines au sein de protéines qui vont interagir avec l'ubiquitine mais qui auront des fonctions biologiques différentes. Ce peut être des récepteurs à l'ubiquitine, ou encore des enzymes catalysant l'ubiquitination ou la déubiquitination de leur substrat. Ces domaines reconnaissent l'ubiquitine au niveau de deux régions hydrophobiques (Ile44 hydrophobic patch et Ile36 hydrophobic patch). Cette interaction n'étant pas covalente et relativement faible, les liaisons UBD-Ub sont fortement réversibles et transitoires.

Cette reconnaissance entre l'Ub et les domaines UBD ne suffit pas à expliquer comment ces protéines sont capables de différencier entre les nombreuses configurations de chaîne d'ubiquitine (Komander and Rape, 2012). Certaines protéines à multiples domaines UBD vont tirer avantage du fait que la distance qui sépare deux ubiquitines d'une chaîne homotypique est fixe, en utilisant des espaceurs pour séparer les UBDs. Ainsi en séparant deux de ces UBDs par une hélice de sept résidus Rap80 va être capable de reconnaître spécifiquement les chaînes en K63 (Sims and Cohen, 2009). Ces domaines peuvent également tirer parti de la flexibilité des chaînes d'ubiquitines notamment dans le cas des chaînes en K48 qui sont plus compactes. La spécificité pour un type de chaîne d'un domaine UBD singulier peut aussi s'expliquer par la reconnaissance de surfaces spécifiques exposées par deux molécules d'ubiquitine au sein d'une chaîne homotypique.

Les domaines UBA et les domaines UIM sont particulièrement importants pour le ciblage au niveau du protéasome (Tableau 2). En effet les protéines de recrutement au protéasome, (par exemple Rad23) vont reposer sur ces domaines pour reconnaître et délivrer au protéasome les protéines ubiquitinées (Mueller and Feigon, 2003).

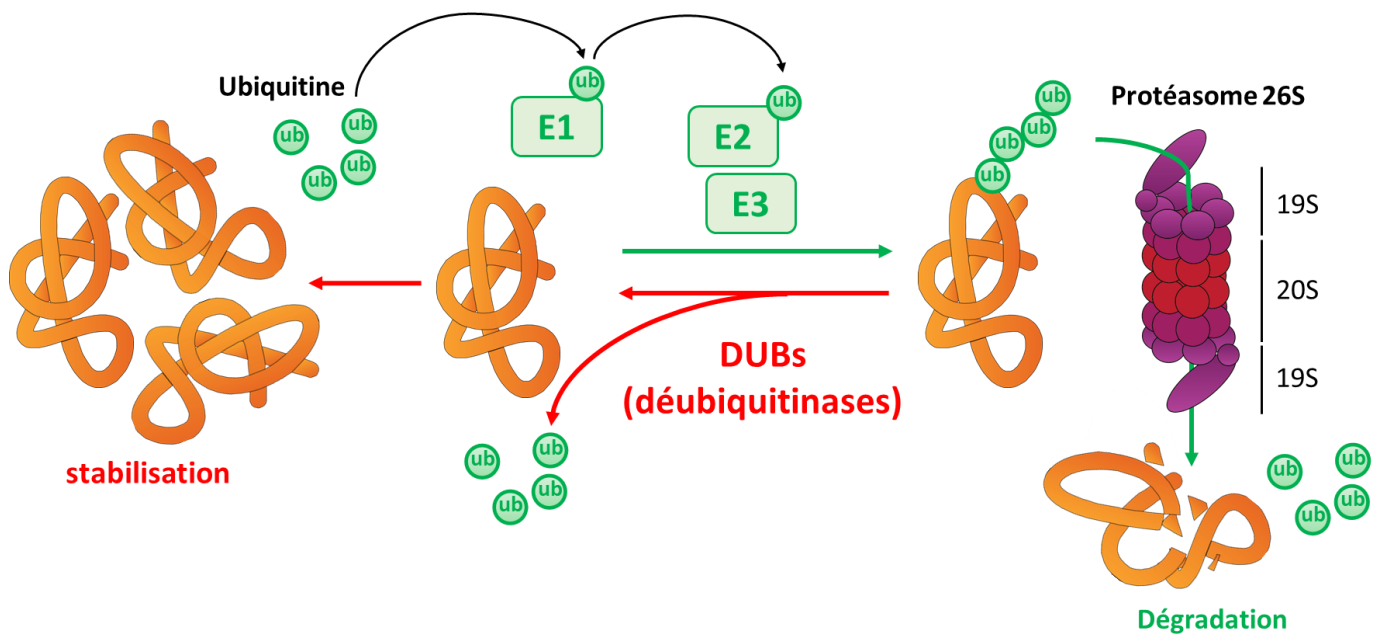


Figure 21 : Illustration du fonctionnement du système ubiquitine protéasome

#### D. Le système ubiquitine protéasome

##### 1) Généralités

Le protéasome 26S, est un complexe protéique de 2,5 mDA qui se divise en deux sous-complexes : le protéasome 20S qui renferme l'activité protéolytique et la particule régulatrice 19S qui va réguler le premier (Glickman and Ciechanover, 2002; Tanaka, 2009) (Fig21). Sa fonction primaire est de dégrader les protéines qui lui sont adressées via la cascade de l'ubiquitination. Le système ubiquitine protéasome (SUP) représente le système majeur de protéolyse des cellules eucaryotes et se révèle crucial pour une majorité de fonction cellulaire (Notamment le contrôle du cycle cellulaire, de la qualité des protéines, de l'inflammation etc...). Lorsque qu'un substrat arrive au niveau du protéasome 26S, il sera pris en charge par la particule 19S qui va aider à son dépliage ainsi qu'au recyclage des molécules d'ubiquitine. Une fois le substrat déplié et déubiquitiné, il pourra pénétrer au cœur de la particule catalytique 20S pour y être dégradé.

##### 2) La particule régulatrice 19S

La particule régulatrice (PR) 19S aussi nommé PA700 est un complexe de 19 sous-unités dont le rôle sera de guider l'entrée du substrat dans la particule 20S (Finley, 2009). En effet lorsque la particule catalytique 20S est dénuée de particule 19S l'entrée d'un substrat non déplié et non déubiquitiné dans la chambre est impossible pour des raisons purement topologiques. La PR 19S peut se lier au protéasome 20S à chaque extrémité du tonneau, cette liaison va permettre d'ouvrir un canal vers la chambre catalytique (Walz et al., 1998). Même ouvert, ce canal est suffisamment étroit pour empêcher les protéines cytoplasmiques de pénétrer dans le protéasome 20S (Groll et al., 2000; Lee et al., 2002). Cette caractéristique impose aux substrats du protéasome la contrainte d'être dépliés pour entrer dans la chambre catalytique ce qui facilite l'hydrolyse des liaisons peptidiques. C'est donc la PR19S qui va se charger de déplier les substrats via l'activité de 6 sous-unités ATPases que l'on appelle les protéines Rpt. Ces ATPases vont former un anneau hétérohexamérique qui va s'amarrer sur l'anneau extérieur de la particule catalytique (Vigneron and Van den Eynde, 2014).

La reconnaissance du substrat par le protéasome se fait via le tag ubiquitine porté par ce dernier. Cette fonction de reconnaissance est assurée par la PR 19S qui va reconnaître les substrats à l'aide de récepteurs à l'ubiquitine RPN10 et RPN13 (D'Arcy and Linder, 2012). Les 6 ATPases et les deux récepteurs à l'ubiquitines sont complétés par RPN1 qui va servir de site d'accueil pour les facteurs de recrutement de protéines ubiquitinées (Rad23, Dsk2 et Ddi1) et par RPN2 qui va assurer la liaison avec le protéasome 20S (Mueller and Feigon, 2003). Ensembles ces protéines forment ce que l'on appelle la base de la particule 19S.

La PR 19S présente également un couvercle composé de 9 sous-unités (RPN3, RPN5, RPN6, RPN7, RPN8, RPN9, RPN11 et RPN12). RPN11 (ou PSMD14 ou POH1) est la plus notable de ces sous-unités puisque son activité est nécessaire à la fonction du protéasome. En effet RPN11 est une déubiquitinase dont le rôle sera de déubiquitiner les substrats adressés au protéasome afin de leur permettre l'accès au cœur catalytique d'une part et de régénérer le « pool » d'ubiquitine libre de la cellule d'autre part (Verma et al., 2002, p. 11).

### 3) La particule catalytique 20S

Le protéasome 20S est une structure en forme de tonneau composé de 28 sous-unités arrangées en 4 anneaux hétéroheptamériques, deux anneaux  $\beta$  internes et deux anneaux  $\alpha$  externes. Les 2 anneaux internes chacun sont composés de 7 sous-unités différentes ( $\beta 1$  à  $\beta 7$ ) mais seulement trois de ces sous-unités sont protéolytiques :  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$ . Les sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$  vont renfermer l'activité « caspase-like », « trypsine-like » et « chymotrypsine-like » respectivement (Finley, 2009). Ce sont donc les anneaux  $\beta$  qui vont renfermer l'activité protéolytique du protéasome 20S tandis que les anneaux  $\alpha$ , eux même composés de 7 sous-unités ( $\alpha 1$  à  $\alpha 7$ ) régulent l'entrée des substrats dans le cœur protéolytique. En effet dans la forme fermée de la particule 20S, les extrémités N-term des sous-unités  $\alpha$  convergent en un réseau empêchant l'entrée dans le cœur de la particule 20S. Lorsque le protéasome 20S est activé, ce réseau est rompu permettant l'entrée du substrat (Borissenko and Groll, 2007; Groll et al., 2000). Les sous-unités  $\alpha$  contiennent également un motif de liaison à la PR 19S dont la liaison va permettre l'ouverture du 20S (Förster et al., 2005; Smith et al., 2007).

La dégradation des substrats du protéasome est typiquement ATP-dépendante et se fait de manière processive. Contrairement à ce qu'on pourrait penser, le protéasome ne réduit pas ces substrats en acides-aminés mais en oligopeptides de longueurs variables (entre 8 et 12 acides-aminés) (Goldberg et al., 2002; Kisselev et al., 1999).

## E. Les enzymes de déubiquitination

### 1) Généralités

Comme la plupart des modifications post-traductionnelles, l'ubiquitination est un processus réversible. Il existe donc un groupe d'enzyme capable de retirer, voire d'éditer le ou les groupements ubiquitines ajoutés sur le substrat. On appelle ces enzymes les déubiquitinases ou DUBs. On trouve environ une centaine de DUBs dans le génome que l'on subdivise 7 familles (Clague et al., 2013; Komander et al., 2009; Reyes-Turcu et al., 2009). Parmi elle, on trouve une famille de métalloprotéases à zinc et 6 familles de protéases à cystéine (Fig22).

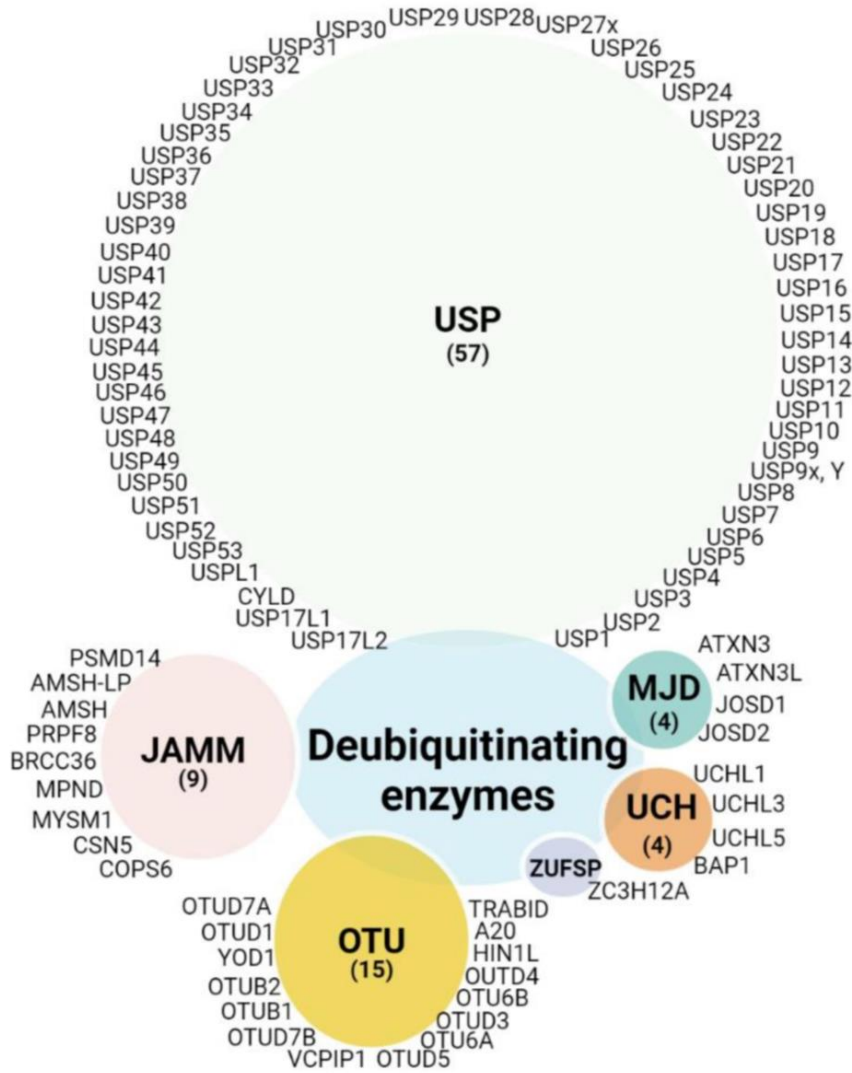


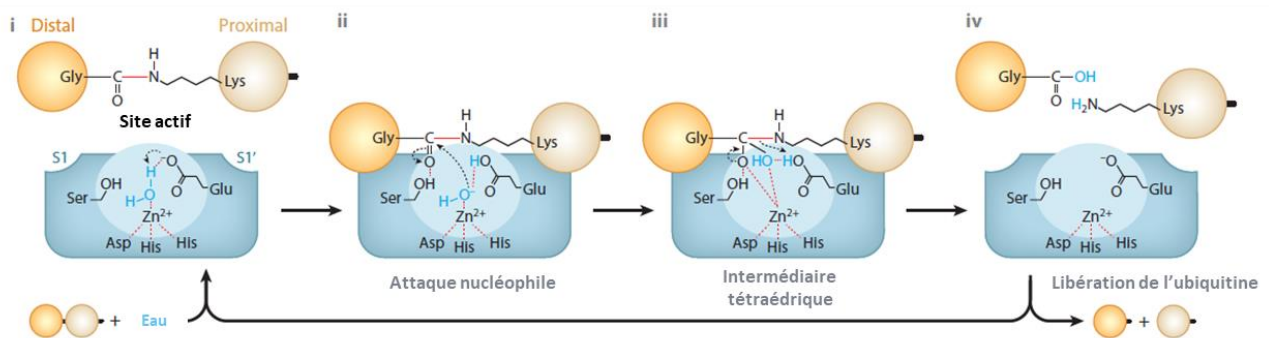
Figure 22 : Diagramme représentatif de la grande famille des DUBs

Tiré de (Ohanna et al., 2022).

## 2) Les métalloprotéases à zinc

Les DUBs appartenant à cette famille sont codées par 14 gènes et contiennent toute un domaine JAMM ou MPN+. Ce domaine contient le site catalytique de ces enzymes qui va contenir un résidu aspartate et deux histidines qui vont se coordonner avec un ion  $Zn^{2+}$  ainsi qu'une sérine. Sans rentrer dans les détails, le zinc va permettre de générer un hydroxyde qui va hydrolyser la liaison isopeptidique entre l'ubiquitine et son substrat. Ce mode d'action particulier indique que les DUBs appartenant à cette famille ne forment pas d'intermédiaires covalents avec leur cible ce qui rend le développement d'inhibiteur ou l'étude de leur activité à l'aide de sonde plus difficile (Ambroggio et al., 2004)(Fig23A). On retrouve souvent ces DUBs au sein de larges complexes, c'est par exemple le cas de RPN11 qui se trouve dans la particule régulatrice du protéasome (Verma et al., 2002; Yao and Cohen, 2002) .

**A**



**B**

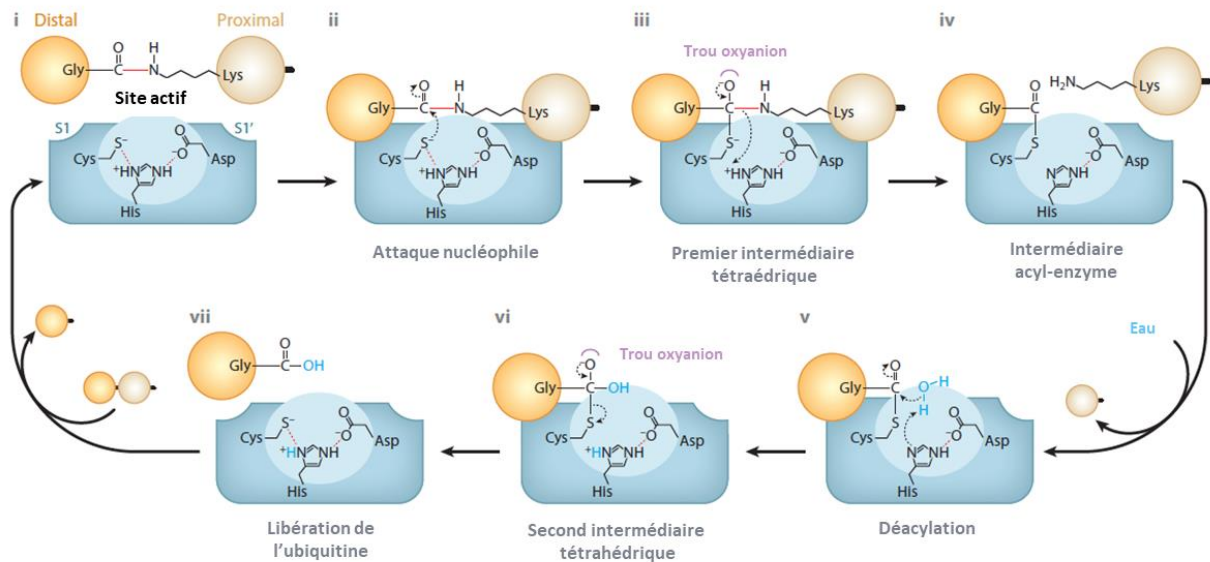


Figure 23 : Mécanisme biochimique de la déubiquitination

Adapté de (Mevisse and Komander, 2017).

## 3) Les protéases à cystéine

L'activité des DUBs appartenant à cette classe d'enzyme repose sur la présence d'une triade d'acides aminés conservée au niveau de leur site actif : une cystéine catalytique, une asparagine et une histidine (Li and Reverter, 2021). L'activation de l'enzyme se fait via le passage du thiol (-SH) inactif de cette cystéine vers un thiolate réactif (-S<sup>-</sup>) (Ronau et al., 2016). Cette transition est induite par un changement de conformation dû à la liaison au substrat ou la liaison à un complexe ou encore une modification post-traductionnelle (Hu et al., 2002; Komander et al., 2009; Sahtoe and Sixma, 2015). Le

résidu cystéine ainsi activé va réaliser une attaque nucléophile sur la liaison isopeptidique entre l'ubiquitine et son substrat en formant un thioester. La libération du substrat se fait par hydrolyse de la liaison Ub-DUB qui permet un retour au thiolate de la cystéine catalytique indiquant que l'enzyme est prête pour un nouveau cycle (Fig23B). Cette classe de DUBs se subdivise en 6 familles que nous allons détailler ci-dessous :

*a) La famille des UCH*

Les UCH sont composées de 4 membres chez les mammifères (UCLHL1, UCLHL3, UCHL5 et BAP1). Elles sont caractérisées par la présence d'une boucle qui protège le site actif de l'enzyme. Cette caractéristique limite la taille des substrats avec lesquels ces enzymes peuvent interagir, typiquement des produits de la dégradation protéasomale ou lysosomale. C'est dans cette famille que l'on trouve la première DUBs dont la structure 3D a été établie : UCHL3 (Johnston et al., 1997). BAP1 est une autre UCH notable qui est impliquée dans le cycle cellulaire et la voie de réponse aux dommages à l'ADN. Cette DUBs est également connue pour être un des principaux oncogènes dans le mélanome uvéal (Masoomian et al., 2018; Yu et al., 2010).

*b) La famille des USP*

Les USP sont la plus large famille de DUB avec 54 membres. Elles sont caractérisées par une structure en forme de main composée de trois domaines : le pouce, la paume et les doigts (Hu et al., 2002). Le site catalytique se trouve entre le pouce et la paume et les doigts servent à stabiliser l'interaction avec le substrat de l'enzyme (Renatus et al., 2006). La plupart des USP ne sont pas spécifiques d'un type de chaîne d'Ub (Ye et al., 2011). Parmi les USP notables, on peut citer USP18 qui est spécifique de l'Ubl ISG15 et USPL1 qui est spécifique de SUMO (Basters et al., 2018; Schulz et al., 2012).

*c) La famille des OTU*

La famille des OTU compte 17 membres qui vont présenter une plus grande spécificité de chaîne que les autres DUBs. Par exemple OTUD1 sera spécifique des substrats ubiquitinés en K48 alors que cezanne sera plus spécifique des chaînes en K11 (Bonacci et al., 2018; Edelmann et al., 2009). Cette spécificité s'explique par la présence de domaines additionnels d'interaction à l'ubiquitine qui permettent la liaison à de plus longues chaînes de polyubiquitines spécifiques (Mevissen et al., 2013). A cause de cette spécificité, les OTU sont connus comme des régulateurs de voies de signalisation. Une autre particularité des OTU c'est l'absence d'asparagine au niveau du site actif (Nijman et al., 2005).

*d) La famille des MJD*

La famille des MJD, composée de 4 membres (ATXN3, ATXN3L et Josephin domain containing 1 et 2), est nommée à partir d'une maladie neurologique : la maladie de Machado-Josephin Disease (MJD : Machado-Josephin Disease). Cette maladie est causée par une extension de la répétition d'un motif CAG au sein de la DUB ATXN3 ce qui va provoquer son agrégation (Kawaguchi et al., 1994). On peut également noter que cette famille de DUBs est absente chez la levure.

#### e) *La famille des MINDY*

On trouve 5 membres dans cette famille qui se distingue par une triade catalytique où l'asparagine est remplacée par une glutamine. Ces enzymes sont auto-inhibées et c'est la liaison au substrat qui viendra lever cette inhibition en induisant un changement de conformation (Abdul Rehman et al., 2016). Les membres de cette famille sont également très spécifiques des chaînes d'Ub en K48 (Maurer and Wertz, 2016).

#### f) *La famille ZUFSP*

Il n'existe qu'un seul membre de cette famille (ZUFSP1) qui contient un domaine peptidase spécifique UFM1. Cette DUB présente également 2 domaines de liaison à l'ubiquitine qui lui confère une très forte spécificité pour les chaînes d'Ub en K63 (Kwasna et al., 2018).

#### 4) Spécificité enzymatique des déubiquitinases

Les DUBs vont être capables de lire le code de l'ubiquitine, et c'est cette lecture qui va dicter leur fonction. Pour les aider à lire le code, ces enzymes présentent souvent des domaines de liaison à l'ubiquitine (UBDs) qui vont leur permettre de reconnaître la structure des différentes chaînes d'ubiquitine. Certaines DUBs vont cliver les chaînes d'Ub de manière non spécifique, c'est notamment le cas de la plupart des USP comme on a pu le voir précédemment. D'autres DUBs vont, au contraire, présenter une spécificité de clivage pour un seul type de chaîne. C'est par exemple le cas des OTU et des MINDY qui vont être spécifiques des chaînes en K48 sauf quelques exceptions (Cezanne qui est spécifique des chaînes en K11).

Les DUBs vont aussi se différencier par leur méthode de clivage. On trouve des endo-DUBs qui vont cliver au sein d'une chaîne et des exo-DUBs qui vont attaquer la chaîne à partir de son extrémité (Komander et al., 2009; Komander and Rape, 2012).

Certaines DUBs ont besoin d'un changement conformationnel induit par la liaison au substrat pour s'activer. C'est le cas des membres de la famille MINDY comme on a pu le voir, mais aussi d'USP7 dont la liaison à l'ubiquitine induit une activation du site actif (Hu et al., 2002; Sahtoe and Sixma, 2015). Certaines DUBs peuvent subir des modifications post-traductionnelles activatrices ou inactivatrices (phosphorylation, sumoylation, ubiquitination. Par exemple, la phosphorylation d'USP4 par AKT sur la ser445 va induire sa relocalisation du noyau vers le cytoplasme (Zhang et al., 2012).



### 5) Fonctions cellulaires régulées par les DUBs

Comme l'ubiquitination est omniprésente dans la biologie cellulaire, les DUBs vont intervenir dans la régulation de nombreux mécanismes (Fig26). Nous allons illustrer ce concept à l'aide d'une liste non-exhaustive.

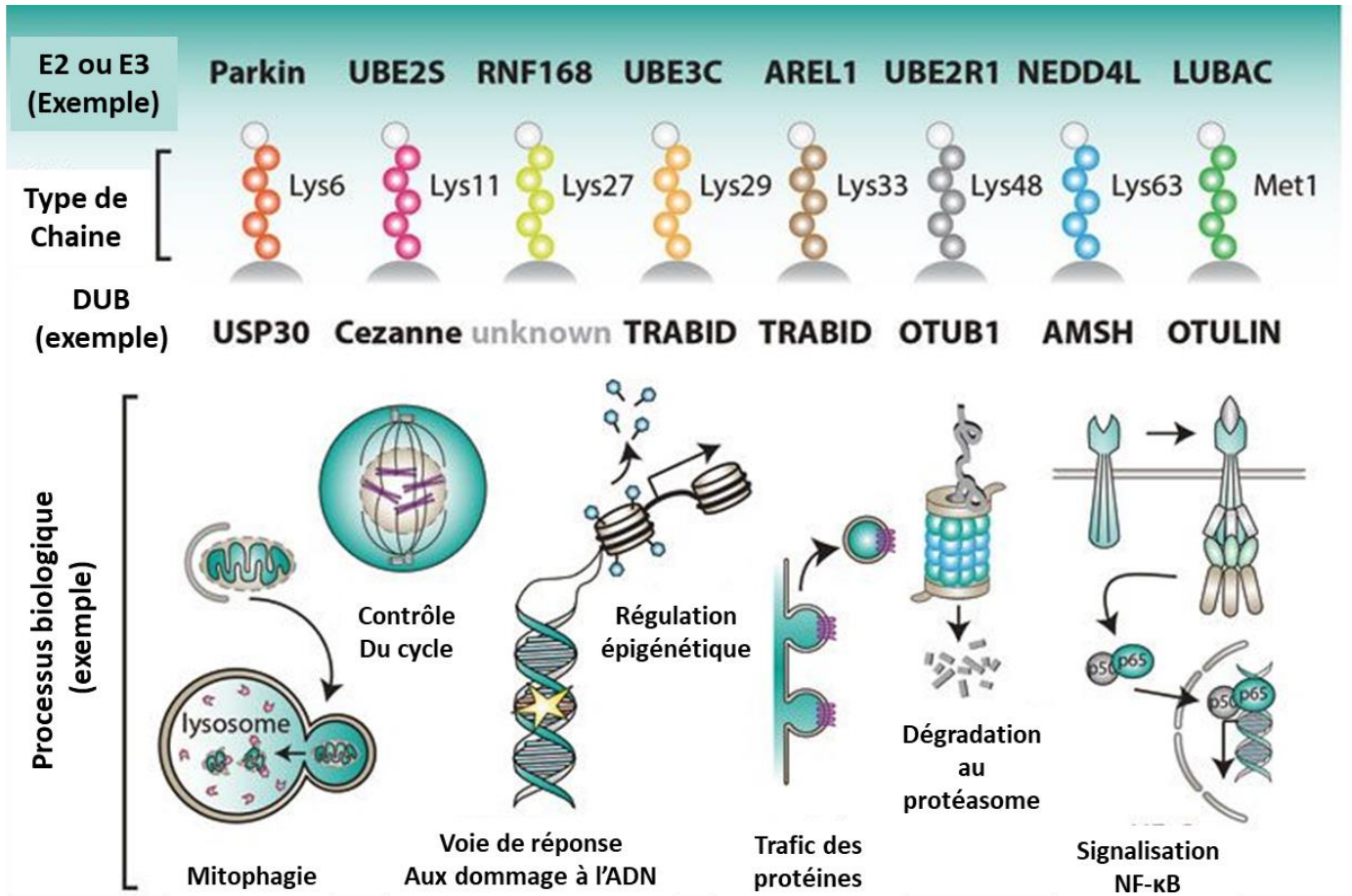


Figure 24 : Multiplicité de fonction de l'ubiquitination et des DUBs associées

Adapté de (Swatek and Komander, 2016).

#### a) Rôle dans la synthèse et le recyclage de l'ubiquitine

L'ubiquitine n'est pas directement synthétisée sous forme de protéine indépendante, mais elle sera soit codée avec une protéine ribosomale fusionnée au C-term soit sous forme de polymère d'ubiquitine. La libération de monomères d'ubiquitine à partir de ses précurseurs sera donc catalysée par des DUBs. Par exemple UCHL3, USP9X, USP7, USP5 et OTULIN vont être requises pour hydrolyser ces précurseurs et régénérer le pool d'ubiquitine libre (Grou et al., 2015).

A part la production d'ubiquitine à partir de polymère, les DUBs vont également régénérer le pool d'ubiquitine libre en déubiquitinant les substrats destinés à la dégradation au niveau du protéasome. C'est notamment le cas des déubiquitinases associées au protéasome : RPN11, USP14 et UCHL5 (Tanaka, 2009). Ainsi la présence de cette classe d'enzyme empêche la rapide déplétion du pool d'ubiquitine libre dû à l'omniprésence de l'ubiquitination et donc permet de maintenir l'homéostasie et la survie de la cellule.

#### *b) Rôle dans le trafic des protéines*

Tout comme l'ubiquitination joue un rôle dans l'endocytose, la déubiquitination peut permettre le recyclage de protéines membranaires destinées à la dégradation lysosomale. Par exemple l'activité de USP8 va permettre la déubiquitination du récepteur EGFR et donc son recyclage à la surface de la cellule (Balut et al., 2011). USP32 peut également influencer le transport endosomal tardif via la déubiquitination de Rab7 (Sapmaz et al., 2019)(Fig24).

#### *c) Rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN*

Certaines déubiquitinases sont impliquées dans les mécanismes moléculaires de réparation de l'ADN à la suite d'un stress génotoxique. Par exemple USP7 va stabiliser l'E3 ligase MDM2 qui en retour va envoyer P53 à la dégradation (Khoronenkova and Dianov, 2012). Lors d'un stress, USP7 va subir une phosphorylation inactivatrice ce qui va en retour diminuer l'activité de MDM2 et donc stabiliser P53 dont l'expression est importante dans la voie de réponse des dommages à l'ADN (Fig24).

Les DUBs peuvent également réguler l'ubiquitination des histones, la déubiquitinase Ubp8 est par exemple nécessaire au fonctionnement du complexe SAGA. Ce complexe va permettre la déubiquitination de l'histone H2B et ainsi réguler l'expression des gènes sous son contrôle (Lee et al., 2005). D'autres DUBs comme sont impliquées dans l'activité de réparation de l'ADN. On peut citer USP47 qui va réguler la stabilité de la polymérase  $\beta$  responsable de la réparation des cassures simples brins (Parsons et al., 2011).

#### *d) Rôle dans la traduction*

Les DUBs peuvent également influencer la synthèse des protéines notamment en jouant sur l'ubiquitination des ribosomes. Récemment, une nouvelle forme de régulation des ribosomes par les DUBs a été mise en évidence : la RTU (Redox control of Translation by Ub). Dans ce mécanisme l'inhibition de la DUB Ubp2 par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) induit une accumulation de ribosome ubiquitiné en K63 ce qui à terme réduit le taux global de traduction dans la cellule (Zhou et al., 2020). Certaines DUBs peuvent également réguler l'initiation de la traduction en stabilisant des facteurs d'initiation. Par exemple USP9X stabilise eIF4 et USP11 eIF4B (Kapadia et al., 2018; Z. Li et al., 2018). La ribophagie est un mécanisme dépendant de l'ubiquitination des ribosomes qui peut se mettre en place lors de déprivation en nutriments. Par conséquent, les DUBs peuvent réguler ce mécanisme, c'est le cas de Ubp3 (homologue de USP10) chez la levure (Kraft et al., 2008).

## F. Les déubiquitinases dans le cancer

### 1) Déubiquitinases et cancers : généralités

Les voies de signalisation régulées par l'ubiquitination sont omniprésentes et donc essentielles à la biologie de la cellule. En modulant les signaux convoyés par l'ubiquitine, les DUBs se posent en acteurs indispensables au fonctionnement cellulaire. Comme on a pu le voir les DUBs ont une importance capitale dans la réponse au dommage à l'ADN via la régulation de voies oncogéniques (ex : P53). De plus l'impact des DUBs sur l'ubiquitination des histones va induire des modifications épigénétiques qui peuvent altérer le programme génétique de la cellule et affecter la survie, la prolifération etc... On peut aussi noter que le rôle des DUBs dans la traduction peut avoir un rôle dans la surexpression de certaines protéines ou voies oncogéniques (Fig24). Enfin, étant donné leur capacité d'édition du signal Ub, ces enzymes sont capables de prévenir la dégradation protéasomale de protéines oncogéniques

(Fig21). On comprend donc que l'action des DUBs peut se révéler crucial dans l'établissement, le développement et la progression du cancer.

## 2) Déubiquitinasés et mélanome

Il est bien connu que BAP1, une DUB de la famille des UCH est un gène de prédisposition pour le développement du mélanome uvéal. Son inactivation par mutation est retrouvée dans la majeure partie des mélanomes de l'uvée et va jouer un rôle dans le développement, la progression et l'invasivité.

En ce qui concerne le mélanome cutané, dans le cadre d'une revue écrite par le laboratoire, nous avons listé les DUBs pour lesquelles la littérature décrit un rôle dans la pathologie. Ce travail a permis de souligner l'implication de ces enzymes dans la majorité des processus associés au développement de la maladie (Ohanna et al., 2022) (Fig25).

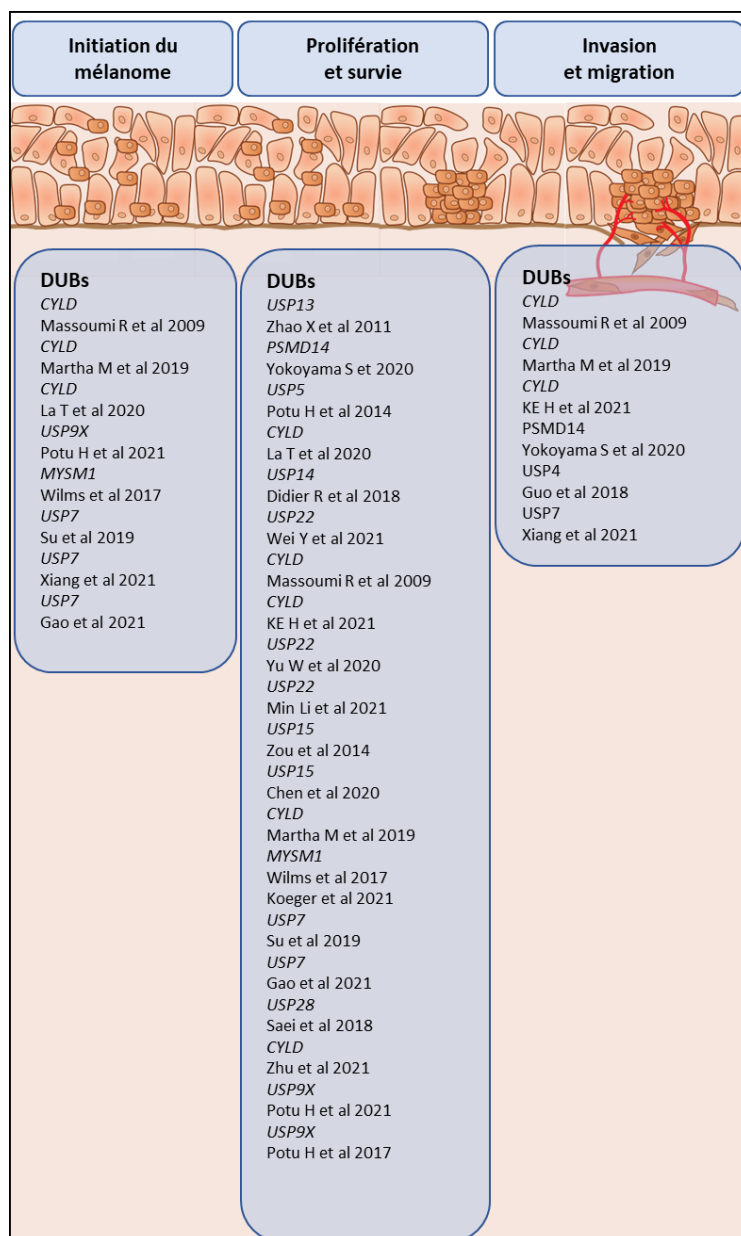


Figure 25 : Schéma récapitulant les DUBs impliquée dans la biologie du mélanome et publication associées.

Adapté de (Ohanna et al., 2022).

Plusieurs DUBs sont surexprimées dans les cellules de mélanome quand on les compare aux naevus ou au tissu normal. C'est notamment le cas de USP4, USP7 et MYSM1. De plus la surexpression de MYSM1 est associée à un mauvais pronostic pour les patients ainsi qu'à la mélanomagénèse. De façon intéressante notre laboratoire a pu démontrer que USP14 présente une augmentation de son activité dans les cellules de mélanome comparé à des mélanocytes normaux (Didier et al., 2018). L'inhibition de USP14 va induire une accumulation de protéines polyubiquitinées et un stress du réticulum endoplasmique menant les cellules vers une mort indépendante des caspases. Contrairement à ces DUBs qui vont jouer un rôle plutôt pro-oncogénique, l'expression de CYLD va diminuer dans le mélanome métastatique et la tumeur primaire par rapport au tissu normal. Cela place donc ce gène en tant que suppresseur de tumeur dans le mélanome (Massoumi et al., 2009).

Certaines de ces enzymes peuvent réguler l'expression de gènes importants pour le développement du mélanome. Par exemple USP9X est capable de contrôler indirectement l'expression de NRAS par la stabilisation du facteur de transcription Ets1 via son activité déubiquitinase (Potu et al., 2017). De même en 2011, une équipe découvre que USP13 est capable de stabiliser le facteur de transcription MITF via son activité déubiquitinase. Comme précisé dans la partie I, MITF est le « master regulator » de la mélanogénèse et va jouer un rôle prépondérant dans la biologie du mélanome, notamment sa capacité de prolifération (Zhao et al., 2011). La déplétion de USP7 peut également affecter la prolifération et la croissance tumorale dans le mélanome en inhibant la voie PI3K/AKT (Gao et al., 2021, p. 3).

D'autres DUBs semblent être impliquées dans les capacités invasives du mélanome, par exemple l'expression de USP9X est augmentée dans le mélanome métastatique comparé à la tumeur primaire. Le ciblage de USP7 altère non seulement la prolifération, mais également les capacités de migration et d'invasion des cellules de mélanome *in vitro* et *in vivo* (Xiang et al., 2021). La perte de CYLD au cours de la progression mélanome va impacter la capacité métastatique des cellules en affectant l'induction de la voie JNK/AP1 dépendante de la liaison au collagène IV de l'intégrine  $\beta 1$  (Ke et al., 2013).

Dans le cadre du mélanome résistant, la déplétion d'USP5 augmente la sensibilité des cellules de mélanome aux inhibiteurs de BRAF (Potu et al., 2014). De la même façon l'inhibition de USP5 potentialise l'effet des thérapies ciblées. C'est le cas d'autres DUBs comme USP9X dont l'activité semble être dépendante la voie BRAF et dont l'inhibition potentialise les thérapies ciblées. On peut également citer USP7 dont la déplétion augmente la sensibilité aux thérapies ciblées ou USP14 dont l'activité augmente avec la résistance (Didier et al., 2018).

## G. Conclusion : Déubiquitinase et mécanotransduction

Un potentiel lien peut se dessiner entre les DUBs et la mécanotransduction. En effet dans un premier temps on peut noter que la présence de phosphodégrons sur les mécanosenseurs YAP et TAZ les rend susceptibles à une régulation par les DUBs. A ce sujet, la littérature décrit que OTUD5 est capable de déubiquitiner YAP chez le macrophage (Zhang et al., 2021, p. 5). Au sein de notre sujet d'étude, USP22 a été identifié comme un régulateur de la résistance YAP dépendante au thérapies ciblées. En effet USP22 stabilise YAP lui permettant ainsi d'enclencher sur le programme de résistance (Wei et al., 2021). D'autres DUBs pourraient également jouer ce rôle dans le mélanome comme par exemple USP9X dont le lien avec le mécanosenseur YAP est montré par plusieurs études (Kim et al., 2016; L. Li et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Cependant aucune de ces études ne relie l'action de ces DUBs aux propriétés de mécanosenseurs de YAP ni l'activité ou l'expression des DUBs à la mécanotransduction en général. Ainsi dans le contexte de la mécanorésistance du mélanome, nous nous proposons d'identifier des DUBs pouvant être régulées par les signaux mécaniques de la matrice extracellulaire.

# Contexte de la recherche

Le mélanome se distingue des autres cancers cutanés par son hétérogénéité et son haut potentiel métastatique. Cette plasticité des cellules de mélanome va être responsable de leur adaptation rapide au traitement. Classiquement les mélanomes mutés sur la kinase BRAF sont traités aux thérapies ciblées qui sont des inhibiteurs de BRAF et de MEK. Nous avons récemment montré que le traitement aux thérapies ciblées induit un remodelage du réseau de fibres de la matrice-extracellulaire (Girard et al., 2020) (Diazi et al., 2022). Ce remodelage a pour conséquence une rigidification de la matrice extracellulaire qui active les voies de la mécanotransduction dans les cellules de mélanome. Ces voies sont dépendantes de la contraction du cytosquelette d'actine qui permet la translocation dans le noyau du mécanosenseur et de YAP. Une fois relocalisé dans le noyau il va induire la mise en place d'un programme transcriptomique pro-fibrotique grâce à son activité de co-facteur de transcription. En conséquence une boucle d'amplification positive se met en place renforçant le phénotype de rigidification matricielle. A terme, nos travaux montrent que ce mécanisme aboutit à l'échappement thérapeutique des cellules de mélanome (Girard et al., 2020).

L'activation aberrante de telles voies oncogéniques confère aux cellules tumorales un avantage contre le traitement mais déstabilise leur homéostasie protéique ou protéostasie. En effet l'activation de telles voies nécessite la surexpression de certaine protéine ce qui déséquilibre la balance protéostatique. Pour maintenir l'équilibre les cellules tumorales vont se reposer sur l'activité protéolytique du système ubiquitine protéasome d'une part et l'activité stabilisatrice des déubiquitinases (DUBs) d'autre part. Dans les pathologies cancéreuses, les DUBs sont fréquemment détournées pour prévenir la dégradation protéasomale d'acteurs de voies oncogéniques importantes dans la prolifération, l'invasion ou encore la résistance au traitement (D'Arcy et al., 2015; Ohanna et al., 2022). Dans ce contexte, les DUBs se révèlent des candidates idéales pour trouver de nouveaux acteurs dans la mécanorésistance des mélanomes, induite par les thérapies ciblées.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons identifié USP9X comme une DUBs dont l'activité est modulée par la rigidité de la matrice extracellulaire. Nous avons également mis en évidence que le mécanosenseur YAP, impliqué dans la migration, l'invasion et la résistance du mélanome, est le substrat de USP9X. Nous avons montré le rôle de USP9X dans la migration et l'invasion des cellules de mélanome *in vitro* et *in vivo*. Enfin nous avons montré que le ciblage de USP9X améliore l'efficacité des inhibiteurs de BRAF/MEK, contrecarre le remodelage du collagène induit par les médicaments et retarde la récurrence tumorale.

# Résultats

Article 1 : The mechanically-activated deubiquitinase USP9X controls melanoma invasiveness and drug response through YAP stabilization



**The mechanically-activated deubiquitinase USP9X controls melanoma invasiveness  
and drug response through YAP stabilization**

P. Biber<sup>1,2</sup>, A. Carminati<sup>1,2</sup>, C. Girard<sup>1</sup>, W. Mohager<sup>1,2</sup>, M. Ohanna<sup>1,2</sup>, M. Lecacheur<sup>1,2</sup>, O. Bouvet<sup>1,2</sup>,  
S. Audebert<sup>4</sup>, M. Khaled<sup>3</sup>, S. Tartare-Deckert<sup>1,2</sup>, and M. Deckert<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, 06204 Nice, France

<sup>2</sup>Team Microenvironment, Signalling and Cancer », Equipe labellisée Ligue contre la Cancer

<sup>3</sup>Université Paris-Saclay, Inserm UMR 1186, Gustave Roussy, Villejuif, France

<sup>4</sup>Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille, France

**Running title:** USP9X regulates melanoma mechanotransduction through YAP

**Keywords:** mechanotransduction, extracellular matrix stiffness, ubiquitin proteasome system, DUB, USP9X, YAP, invasion, therapy resistance

**\*Corresponding Author:** Marcel Deckert [deckert@unice.fr](mailto:deckert@unice.fr), Inserm UMR1065/C3M, 151 Route de Ginestière BP2 3194, F-06204 Nice cedex 3.

## Abstract

Post-translational modification by ubiquitin plays a key role in protein turnover. Deubiquitinases (DUBs) removes ubiquitin chains from target proteins to prevent their degradation by the proteasome and with the ubiquitin-proteasome system (UPS), they are gatekeepers of protein homeostasis. Despite dramatic advances in its treatment, metastatic melanoma remains a therapeutic challenge. Melanoma cells show a great plasticity that allows them to adapt to the conditions of the tumor microenvironment and to anticancer treatments. In this context, we recently showed that, in response to BRAF-targeted therapies, extracellular matrix (ECM) remodelling, cytoskeletal plasticity and mechanotransduction play a major role in proliferation, invasion and drug-resistance of melanoma cell through the mechanosensor YAP. Remarkably, the accumulation of many master tumor factors is modulated by the UPS and DUBs. However, the contribution of DUBs in mechanotransduction is still unexplored. To identify DUBs involved in melanoma mechanotransduction, we used cell lines cultivated on collagen matrices with various stiffnesses combined to an activity-based ubiquitin probe for profiling DUB activity. Using this approach and quantitative proteomic, we identified the ubiquitin-specific protease 9X (USP9X) as a DUB whose activity is increased by collagen stiffness. In silico analysis further revealed that YAP belongs to the USP9X interactome and showed a correlation between USP9X expression and YAP transcriptional signature in melanoma. We thus hypothesized that USP9X regulates levels of YAP in melanoma cells through its DUB activity. Consistently, siRNA-mediated depletion and pharmacological inhibition of USP9X decreased YAP expression at protein but not mRNA levels. Conversely, knockdown of the E3 ligase  $\beta$ TrCP increased YAP protein expression. A GST-TUBE pulldown assay revealed that combined USP9X and proteasome inhibition increased YAP poly-ubiquitination, indicating that USP9X deubiquitinates YAP to prevent its proteasomal degradation. In line with a role of USP9X in mechanotransduction upstream of YAP, USP9X targeting impaired stiffness-induced responses including YAP nuclear translocation and transcriptional activity, cell migration and invasion, and drug resistance. An experimental lung invasion assay further showed that USP9X stable knockdown impaired melanoma invasion *in vivo*. Finally, targeting USP9X in a syngeneic model of melanoma response to targeted therapy counteracted drug-induced collagen remodeling, enhanced treatment efficacy and delayed tumor relapse. Our results reveal an original role of USP9X in melanoma mechanotransduction and mechanoresistance through stiffness-dependent stabilization of the oncoprotein YAP. We therefore propose USP9X as a targetable “mechano-DUB” in melanoma.

## Introduction

Cutaneous melanoma is the skin cancer with the highest mortality rate. Its high metastatic potential associated with resistance to treatment makes it one of the most aggressive forms of cancer. Melanoma develops from melanocytes, pigmented cells derived from the neural crest that colonize the skin in the superficial layer of the epidermis (Shain & Bastian, 2016). The function of these cells is to protect our skin from ultraviolet (UV) radiation by synthesizing a pigment: melanin. In 75% of cases, melanoma develops "de novo" from a healthy melanocyte (in comparison to nevi or moles), notably because of their exposure to UV radiation, which causes mutations. Genetic alterations in the *BRAF*, *NRAS*, or *NF1* genes define melanoma subtypes and lead to the constitutive activation of the MAPK pathway in more than 75% of the cases (Cancer Genome Atlas, 2015; Flaherty *et al*, 2012). When melanoma expresses the oncogenic BRAFV600(X) mutation, patients can be treated with targeted therapies that are specific inhibitors of this oncogenic kinase (Vemurafenib, Dabrafenib) or of MEK1/2 downstream of BRAF (Cobimetinib, Trametinib) blocking the constitutive activation of the MAPK pathway. With these therapies, significant regression of melanoma is observed in some patients (Robert *et al*, 2019). However, in the majority of cases, resistance develops after 6 to 8 months of treatment.

For patients who do not have the BRAFV600(X) mutation, or who have developed resistance to BRAF pathway inhibitors (BRAFi/MEKi), there are other therapeutic avenues such as immunotherapies whose main action is to prevent tumor cells from hijacking immunological braking systems such as the PD1/PDL-1 (or PD1/PDL- 2) ligand/receptor complex or B7/CTLA-4 (Luke *et al*, 2017). These immunotherapies give very satisfactory long-term responses when the patient responds. However, only a minority of patients respond optimally. Overall, more than 50% of patients need additional treatments. It is therefore important to find other treatment options to fill the treatment gap for patients who do not respond to targeted therapies or immunotherapies or who have relapsed.

The appearance of activating mutations in the MAPK pathway induces the transformation of the melanocyte, which will proliferate and form a primary tumor characterized by a high mutational load and extensive intratumoral genetic heterogeneity. Additional mutational events and extracellular cues from the tumor microenvironment (TME) participate to the reactivation of an embryonic program of epithelial-mesenchymal transdifferentiation (EMT-like). This process, which is associated with EMT transcriptional factors such as SNAIL, SLUG and TWIST, the loss of E-cadherin and the gain of mesenchymal markers, allows melanoma cells to invade adjacent tissues (Caramel *et al*, 2013; Fenouille *et al*, 2012). Intrinsic melanoma cell phenotypic plasticity and signals from the TME, such as inflammation, growth factors or hypoxia, drive further metastatic progression, by providing advantages in terms of survival, dissemination and adaptation (Arozarena & Wellbrock, 2019; Holzel

& Tuting, 2016). Melanomas can be classified into several phenotypically different subpopulations (Hoek & Goding, 2010; Rambow *et al*, 2019; Tsoi *et al*, 2018). Melanocytic-like cells that are differentiated, less invasive and show a proliferative signature and high expression of the transcription factors MITF and SOX10 (Sun *et al*, 2014). The dedifferentiated cells with a mesenchymal signature, which will be much more invasive, with high expression of ZEB1 and receptor tyrosine kinases (RTK) like PDGFR $\beta$  or AXL (Muller *et al*, 2014; Nazarian *et al*, 2010; Rambow *et al*, 2018; Rathore *et al*, 2019; Tsoi *et al.*, 2018; Villanueva *et al*, 2010).

Besides genetic mechanisms of resistance, melanoma cell phenotypic plasticity and non-genetic heterogeneity actively participates in drug tolerance and the acquisition of therapy resistance, through transcriptional and epigenetic reprogramming in response to environmental challenges or therapeutic stress (Arozarena & Wellbrock, 2019; Marine *et al*, 2020; Rambow *et al.*, 2019). Recent findings reveal that reciprocal interactions between cancer cells and the extracellular matrix (ECM) contribute to adaptive and acquired resistance to BRAFi therapy by conferring a drug-protective niche to melanoma cells (Fedorenko *et al*, 2015; Girard *et al*, 2020; Titz *et al*, 2016). Moreover, we recently showed that upon targeted therapies, cell autonomous ECM deposition and remodeling and mechanical plasticity by dedifferentiated melanoma cells results in cross-linked collagen matrix and tumor stiffening triggering a feedforward loop dependent on the mechanotransducers YAP and MRTFA, implementing a pro-fibrotic reprogramming and leading to therapeutic escape (Berestjuk *et al*, 2022; Diazzi *et al*, 2022; Girard *et al.*, 2020)

In cancer cells, the accumulation of genetic alterations, oncogenic pathways and the high proliferative index increase protein synthesis and addiction to mechanisms for maintaining protein homeostasis, including the ubiquitin-proteasome system (UPS) (Finley, 2009). Remarkably, the accumulation of many tumor plasticity, invasion, survival and therapeutic resistance factors is modulated at the post-translational level by the UPS, and this is notably the case for the YAP oncoprotein (Moroishi *et al*, 2015). Deubiquitination of proteasome substrates by ubiquitin-specific proteases called DeUBiquitinases (DUBs) will protect them from degradation by the proteasome (D'Arcy *et al*, 2015; Ohanna *et al*, 2022). For example, in melanoma, USP13 is involved in melanoma growth and regulates MITF expression (Zhao, 2011 #1484), and high levels of USP9X promoting ETS-1 and NRAS expression are correlated with melanoma aggressiveness (Potu *et al*, 2017). Our laboratory has also shown that targeting USP14, one of the three proteasome-associated DUBs, has a potent anti-melanoma effect (Didier *et al*, 2018). In this context, DUBs are ideal candidates to find new players in melanoma mechanoresistance induced by targeted therapies. However, the contribution of DUBs in mechanotransduction is still largely unexplored.

In this study, using cells cultivated on collagen matrices combined to an activity-based ubiquitin probe for profiling DUB activity and quantitative proteomic, we identify USP9X as a DUB whose activity is

modulated by collagen stiffness. We also show that the mechanotransducer YAP is the substrate of USP9X and that the targeting of USP9X phenocopies the function of YAP in melanoma cell migration, invasion and resistance to targeted therapy in vitro and in vivo.

## Results

### Collagen stiffness controls DUB activity, including USP9X

To identify deubiquitinases whose activity is impacted by extracellular matrix stiffness, we developed the following protocol. We cultured a melanoma line (1205lu) and several primary melanoma culture lines (MM029 and MM099) on collagen matrices of different stiffness. We then extracted proteins from these cultures and using an active DUB labeling method we determined the activity of DUBs as a function of stiffness (Fig. 1A). This method works by using a probe formed by a vinylsulfone moiety fused to a ubiquitin and a hemagglutinin (HA) tag. The vinylsulfone moiety coupled to the ubiquitin, allows specific recognition of the probe by the active site of the active DUBs in the lysate to which it will covalently bind (Didier *et al.*, 2018). We observe that the global activation pattern of DUBs is impacted by collagen stiffness (Fig. 1B). Knowing that the transmission of mechanical signals within the cell is dependent on the contraction of the actomyosin cytoskeleton, we used the myosin II inhibitor Blebbistatin. We observe that Blebbistatin treatment of cells grown on a rigid matrix partially restores the global activation pattern of DUBs observed for cells grown on a soft matrix (Fig. 1C). To confirm our observations, we applied the same protocol (Fig. 1A) to cell lines from other cancers: lung (A549), breast (MDA-MB-231), and pancreas (PANC1). For all these different lines, we make the same observation, namely a difference in the overall activity pattern of DUBs as a function of stiffness (Fig. 1D). In order to individually identify DUBs whose activity is impacted by the stiffness of the collagen matrix we again used this protocol on 1205lu cells. Taking advantage of the HA label of the probe, we immunoprecipitated active DUBs from the lysate fused to the probe. Using quantitative proteomics, we identified several DUBs with increased activity either in soft or stiff conditions (Fig. 1E, Table 1). Among these DUBs we observe that the activity of USP9X is increased with the stiffness of the collagen matrix (Fig1. E, Table1).

### Physical and functional interaction between USP9X and YAP

The choice of USP9X as the primary subject of this study was motivated by several reasons. First, bioinformatic data predict that the mechanotransducer YAP (Dupont *et al.*, 2011) is a partner of USP9X (Fig. 2A). Second, protein expression of YAP is stabilized by matrix stiffening in different melanoma cell models (Fig. 2B). Third, USP9X expression is significantly increased in melanoma compared to nevus

(Fig. 2C). Third, a bioinformatics study revealed a link between USP9X expression and the transcriptional signature associated with YAP in melanoma (Fig. 2D). We also show that both USP9X and YAP1 gene expression are associated with poor prognosis when expressed at high levels in melanoma patients (Fig. 2E). An unbiased screening of DUBs involved in melanoma migration further confirm that USP9X is an important regulator of melanoma biology (Supp Fig. 1). For that purpose, we transfected a library of interfering RNAs targeting genomic DUBs in A375 invasive melanoma cells. We then performed a scratch assay and monitored wound closure for 48 h by real-time microscopy imaging. Results show that USP9X depletion affects the ability of cells to migrate into the wound (Supp Fig. 1). This observation is supported by the literature showing that USP9X is involved in the migration of neuronal cell (Homan *et al*, 2014), which share the same embryonic origin with melanocytes. Importantly, YAP is involved in the migratory and invasive capabilities of cutaneous melanoma (Nallet-Staub *et al*, 2014). Therefore, we hypothesized that USP9X is a DUB activated by extracellular matrix stiffness, which can control YAP expression and transcriptional program in melanoma.

### **USP9X controls YAP protein expression and activity in melanoma and other cancers**

To test this hypothesis, we used siRNA sequences directed against USP9X transfected into melanoma cell lines. This approach showed that USP9X depletion induces a loss of YAP protein expression without affecting its messenger (Fig. 3A, B). Moreover, USP9X knockdown induced a significant loss of the messenger of several YAP target genes (Fig. 3B). YAP is a transcriptional co-activator whose activity depends on its subcellular localization. We observe that USP9X knockdown in 1205lu cells with siUSP9X #1 induces a significant decrease in the nuclear localization of YAP (Fig. 3C). This is consistent with the result observed in Fig. 3B. In agreement with the previous results, we observed that treatment of 1205lu cells with the USP9X inhibitor G9 (Potu *et al.*, 2017) induced a decrease in YAP protein expression (Fig. 3D) without affecting its messenger (Fig. 3E). Interestingly, we observe a dose-dependent loss of the messenger of several YAP target genes (Fig. 3E). Finally, pharmacological inhibition of USP9X also induced a dose-dependent decrease in the nuclear localization of YAP (Fig. 3F). We also observe that depletion of USP9X induced the loss of YAP expression in other human (A375) and murine (YUMM1.7) melanoma cell lines, as well as in two short-term melanoma cell cultures (MM029 and MM099). This observation was also found in the BRAF inhibitor-resistant melanoma cell line M238R (Fig. 3G). Together, these results indicate that USP9X controls protein expression of the YAP mechanosensor in melanoma.

Interestingly, we also found that the loss of USP9X was associated with a decreased protein expression of YAP in other cancer cell lines, including lung (A549), breast (MDA-MB-231) and pancreatic (PANC) cancer cell lines (Fig. 3H).

### **USP9X controls the ubiquitination and degradation of YAP**

We next examined how USP9X controls YAP expression. When USP9X was overexpressed in HEK293FT cells, an increase in YAP protein expression was observed that was not found with the overexpression of the catalytically inactive USP9X mutant (USP9X MT C1566A) (Fig. 4A). Previous studies showed that the E3 ligase  $\beta$ -TrCP ubiquitinates YAP after phosphorylation at its phosphodegron motif, leading to degradation at the proteasome as part of the Hippo pathway (Zhao *et al*, 2010). Here, we observe that depletion of  $\beta$ -TRCP in 1205lu cells increased YAP protein expression (Fig. 4B) and nuclear location (Fig. 4C). To confirm that YAP is degraded at the proteasome level, we treated 1205lu cells with the proteasome inhibitor Bortezomib (BTZ) for increasing times. As a control, the levels of the labile EMT factor SLUG were also monitored. Consistent with previous studies, an increase in YAP expression after 4h of treatment was observed, indicating that YAP is degraded by the proteasome (Fig. 4D). When these cells were treated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX), a loss of SLUG expression but not YAP was found, suggesting that in contrast with SLUG, YAP is a relatively stable protein (Fig. 4E). Treatment with USP9X inhibitor G9 did not induce any effect on SLUG expression and did not induce a decrease in YAP expression at the times used (Fig. 4F). However, the combination of inhibition of USP9X with inhibition of protein synthesis caused a total loss of YAP expression as early as 1h (Fig. 4G), suggesting that the deubiquitinase activity of USP9X protects YAP from degradation by preventing its addressing to the proteasome. To assess the regulation of YAP ubiquitination by USP9X, we used GST-TUBEs fusion proteins to pull-down poly-ubiquitinated proteins from treated melanoma cells (Fig. 4H). To prevent the degradation of poly-ubiquitinated proteins, cells were treated with Bortezomib, an inhibitor of proteasome catalytic activity. To prevent their possible deubiquitination by USP9X, cells were treated or not with G9. Cell lysates were precipitated with GST-TUBEs and glutathione-agarose beads and analyzed by western blot. These experiments show that USP9X inhibition in the presence of Bortezomib increased YAP poly-ubiquitination, indicating that the deubiquitinase activity of USP9X is required to prevent YAP ubiquitination and degradation by the proteasome (Fig. 4I). In addition, we found that the expression of a proteasome-resistant form of myc-tagged YAP, YAP 5SA was not affected by USP9X knockdown in M238P melanoma cells in contrast to the endogenous form of YAP (Fig. 4J). Taken together, these results show that USP9X controls the ubiquitination and degradation of YAP in melanoma.

### **USP9X controls melanoma cell migration and invasion *in vitro* and *in vivo***

To examine the functional link between USP9X and YAP in melanoma, we next performed a scratch assay in the invasive melanoma line 1205lu transfected with two different interfering RNA sequences directed against USP9X. This approach confirmed that depletion of USP9X impairs cell migration (Fig. 5A), similar to what was observed after depletion of YAP (Fig. 5B). We also found that random motility

(Fig. 5C) and chemotactic migration (Fig. 5D) of USP9X-depleted cells cultured on stiff collagen substrate was significantly decreased compared to control cells. These data were confirmed by pharmacological treatment with USP9X inhibitor which significantly and dose-dependently decreased motility and chemotactic migration of 1205lu cells (Fig. 5E, F). Interestingly, depletion of USP9X also induced a decrease in motility in our panel of solid cancer cell lines (Fig. 5G). Finally, overexpression of a proteasome-resistant YAP mutant (YAP5SA) in M238P cells rescued cell motility that was inhibited by USP9X and YAP depletion (Fig. 5H).

To study the implication of USP9X in melanoma cell invasion, we generated lentiviral vectors containing a pSGEP Luc-PuroR plasmid expressing different shUSP9X sequences or a non-targeting shRNA sequence (directed against the Renilla luciferase mRNA). The interest of this plasmid lies in its luciferase reporter which allow to follow tumor cell invasion *in vivo* by bioluminescence imaging. We have generated 1205lu cells stably depleted for USP9X with these plasmids and first analyzed how their invasive properties were affected by collagen stiffness *in vitro*. We found that stable depletion of USP9X abrogated YAP expression in cells cultured on soft collagen substrate and prevented the upregulation of YAP induced by collagen stiffening (Fig. 6A). Consistently, we observed a loss of YAP nuclear localization in USP9X KD cells cultured on stiff collagen matrix (Fig. 6B). Cells stably depleted for USP9X also showed a significant decrease in motility when grown on a stiff collagen matrix (Fig. 6C). Notably, the motility of USP9X KD cells seeded on stiff collagen was not statistically different from that of shControl cells seeded on a soft collagen (Fig. 6C), suggesting that the control of YAP expression by USP9X is important for mechanosensing. In addition, stable depletion of USP9X also significantly decreased melanoma cell invasiveness when grown as spheroids in a 3D collagen/matrigel matrix (Fig. 6D).

To take this a step further, we injected shControl and shUSP9X#1 cells into the tail vein of nude mice to monitor long-term lung metastasis. *In vivo* bioluminescence measurements were performed every 7 days for 56 days until the end of the experiment. When cells were stably depleted for USP9X, no metastasis to the lungs was observed *in vivo* and *ex vivo* (Fig. 7A, B). A second series of short-term lung extravasation assay next revealed a decreased ability of cells to extravasate to the lungs associated with reduced USP9X expression (Fig. 7C). Together, these data indicate that USP9X targeting affects stiffness-induced and YAP-dependent tumor cell migration and invasion.

### **Targeting USP9X improves sensitivity to targeted therapies *in vitro* and *in vivo***

YAP plays a central role in melanoma resistance targeted therapy (Girard *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2016b). We therefore investigated how USP9X affect the sensitivity of melanoma cell to MAPK pathway inhibition. Time-lapse cell imaging first showed that treating 1205lu cells with a USP9X inhibitor G9 in combination with a BRAF inhibitor (BRAFi, Vemurafenib) dramatically decreased cell proliferation



compared to what was observed with BRAFi alone (Fig. 8A). Of note, G9 as a single agent had no effect compared to control DMSO on cell proliferation monitored up to 5 days. Our recent studies showed that BRAF-targeted therapies induced collagen remodelling and stiffening, mechanotransduction and drug resistance in melanoma through YAP (Diazi *et al.*, 2022; Diazi *et al.*, 2020; Girard *et al.*, 2020). With this in mind, and in view of the observed relationship between USP9X and YAP, we hypothesized that inhibition of USP9X may affect the fibrotic-like reaction induced by BRAF-targeted therapies and drug resistance. To test this hypothesis, the anti-tumor activity of G9 combined with BRAFi/MEKi/Vemurafenib was assessed in a pre-clinical syngeneic melanoma model. YUMM1.7 murine melanoma cells were injected subcutaneously into C57BL/6 mice, which were treated with G9, BRAFi/MEKi or BRAFi/MEKi plus G9 (Fig. 8B). BRAF/MEK inhibition induced a rapid tumor reduction, compared to vehicle or G9 alone (Fig. 8C). However, after 3 to 4 weeks, tumors treated with BRAFi/MEKi resumed growth whereas the combination treatment with G9 delayed tumor relapse and led to a significant reduction in tumor volume (Fig. 8C). Immunohistochemical analysis of tumor samples further documented that in comparison to single regimen, the combined BRAFi/MEKi and G9 treatment dramatically reduced the fibrotic-like reaction induced by targeted therapy as shown by second harmonic generation (SHG) imaging of collagen fibrillar network (Fig. 8D). Consistently, immunoblot analysis of tumor samples showed that the triple combination BRAFi/MEKi/G9 reduced the expression of the myofibroblast marker  $\alpha$ -SMA, the ECM component FN1 and of multiple YAP target genes, ANLN, CYR61, SERP1 and THBS1 that were triggered by targeted therapies (Fig. 8E). These data show that USP9X inhibition counteracted the fibrotic-like reaction induced by targeted therapy and delayed tumor relapse.

## Discussion

Tumors are characterized by abnormal ECM deposition and greater stiffness than healthy tissue, which correlates with aggressiveness (Diazi *et al.*, 2020; Pickup *et al.*, 2014). Mechanical stresses that stimulate tumor cell proliferation, survival and invasion, also promote angiogenesis, hypoxia, and decrease the anti-tumor immune response. ECM stiffening is also involved in therapeutic escape and we recently showed that melanoma cell mechanical plasticity in response to MAPK pathway inhibition triggers a YAP-dependent pro-fibrotic loop and tumor stiffening, involved in drug adaptation and resistance (Berestjuk *et al.*, 2022; Diazi *et al.*, 2022; Diazi *et al.*, 2020; Girard *et al.*, 2020). With the ubiquitin-proteasome system, DUBs represent essential gatekeepers of protein homeostasis and as such they play essential roles in virtually all biological processes (D'Arcy *et al.*, 2015; Nijman *et al.*, 2005). However, how they contribute to biomechanical pathways is still unknown.

To address this question, we implemented a screening strategy based on cancer cells cultivated on collagen matrices with various stiffnesses combined to an activity-based ubiquitin probe for profiling DUB activity (Didier *et al.*, 2018) and quantitative proteomics. Using this approach, we identified DUBs whose activity is modulated by collagen matrix stiffness, including the ubiquitin-specific protease 9X (USP9X). In parallel, a siRNA-based scratch assay screening also identified USP9X as a major actor of melanoma cell migration *in vitro*. USP9X (also known as FAM) is a highly conserved DUB from *Drosophila* to mammals (Murtaza *et al.*, 2015). USP9X has been described before in melanoma in the regulation of NRAS through its stabilizing activity of the transcription factor ETS-1 (Potu *et al.*, 2017) and in drug resistance via its effect on SOX2 (Potu *et al.*, 2021). USP9X is also an important player in neuronal cell migration (Homan *et al.*, 2014) and a key regulator of TGF $\beta$  signaling (Dupont *et al.*, 2009). Interestingly, no studies have linked USP9X and mechanotransduction in cancer.

*In silico* analysis showed that the mechanotransducer YAP belongs to the USP9X interactome. This observation is consistent with a study defining YAP as the substrate of USP9X in breast cancer (Li *et al.*, 2018). Furthermore, in the SKCM cohort from the TCGA, USP9X expression correlates with the transcriptional signature of YAP target genes and both proteins were found associated with a poor prognosis in melanoma. In line with the mechanical plasticity of dedifferentiated invasive melanoma cells (Diazi *et al.*, 2022; Girard *et al.*, 2020). YAP protein expression was found to increase with collagen stiffness in several invasive melanoma cells lines, while it is not affected in a melanocytic differentiated cell line. The literature also describes the importance of matrix stiffness in migration and invasion in breast cancer (Levental *et al.*, 2009) and the involvement of YAP and its transcription factor TEAD in melanoma migration (Nallet-Staub *et al.*, 2014; Verfaillie *et al.*, 2015). We therefore hypothesized that mechanical activation of USP9X by stiff ECM stabilizes YAP and controls its action on melanoma invasion and resistance. Interestingly, the effect induced by mechanical stress on the global activity of DUBs was found partially dependent on the actomyosin cytoskeleton. To further investigate how DUBs and USP9X are activated by mechanical signals, it would be relevant to study the effect of targeting ECM receptors, including Integrins (Humphrey *et al.*, 2014; Pickup *et al.*, 2014) and the collagen receptors DDR1/2 that our laboratory recently identified in matrix-mediated drug resistance (Berestjuk *et al.*, 2022).

We next show that depletion or pharmacological targeting of USP9X causes loss of YAP protein expression without affecting its messenger. This observation is consistent with a post-translational stabilization of YAP by USP9X via its deubiquitinase activity. This hypothesis is supported by the observation that overexpression of the wild-type version of USP9X induces an increase in the protein expression of YAP that is not found with its catalytically inactive mutant. A loss of nuclear localization of YAP and of its activity was also observed, consistent with a reduction of the expression of YAP/TEAD target genes. As a co-transcriptional cofactor, YAP can associate with other transcription factors such

as RUNX1/2. To confirm that the previously observed effects are indeed dependent on the YAP-TEAD interaction, it will be necessary to show that depletion of TEAD isoforms phenocopies the depletion of USP9X. Importantly, the relationship between USP9X and YAP was also confirmed in other human and murine melanoma cell lines as well as in short-term primary cultures of melanoma but also in a BRAF inhibitor resistant line. Finally, USP9X also regulates YAP protein expression in other cancers including breast, pancreas and lung carcinomas, where mechanical signals play an important role.

When the Hippo pathway is active, YAP is phosphorylated by LATS kinases which reveals its phosphodegron motif allowing its ubiquitination by  $\beta$ -TRCP and its degradation at the proteasome (Zhao *et al.*, 2010). Consistent with this mechanism, depletion of  $\beta$ -TRCP increases YAP expression and consequently its nuclear localization. This confirms that YAP can be ubiquitinated and sent to the proteasome for degradation in our model. Interestingly the YAP homolog TAZ is not impacted by  $\beta$ -TRCP depletion in our model. Pharmacological inhibition of the proteasome with Bortezomib increases YAP expression which again confirms its regulation by the UPS in melanoma. On the contrary the blockade of protein synthesis with cycloheximide is not sufficient to induce a loss of short-term expression of YAP. However, the combination of protein synthesis blockade with USP9X inhibition causes a complete loss of YAP expression, revealing that USP9X activity protects YAP from degradation upon protein synthesis inhibition. An affinity purification approach for the polyubiquitinated protein fraction further confirmed that USP9X activity prevents the ubiquitination of YAP and thus its degradation by the proteasome. We next used an M238P melanoma expressing a constitutively active form of YAP, YAP5SA. This version of YAP is mutated on the 5 serine residues phosphorylated by LATS, which prevents its degradation and thus makes it constitutively active (Zhao *et al.*, 2007). In M238P YAP5SA cells, USP9X depletion does not affect the expression of the proteasome-resistant YAP mutant or its target CYR61, while leading to endogenous YAP degradation as expected. Taken together, these results show that USP9X activity is responsible for YAP stabilization. However, we cannot conclude that the action of USP9X on YAP is direct and does not go through AMOTL2 as suggested before (Kim *et al.*, 2016a). To definitively answer this question, *in vitro* deubiquitination experiments using recombinant proteins would be required. One could also look at the expression of the long non-coding RNA LINC01433, which appears to play a scaffolding role physically bringing USP9X and YAP together to promote their interaction (Zhang *et al.*, 2019).

Subsequently, we confirm that depletion or pharmacological targeting of USP9X phenocopies YAP-mediated functional outcomes, including cell motility and migration, invasion and resistance to targeted therapies *in vitro* and *in vivo*. To determine that the effect of USP9X on melanoma cell migration is indeed YAP-dependent, we depleted USP9X in M238P YAP5SA cells, showing to the non-degradable version of YAP rescues cell motility that is impaired in the absence of USP9X. Interestingly, the motility of USP9X KD cells grown on a stiff collagen matrix was not statistically different from that

of control cells grown on a soft collagen matrix, supporting the notion that the loss of USP9X prevents cells from correctly interpret ECM mechanical signals. To study *in vivo* metastasis in mice, we generated melanoma cells stably depleted for USP9X and expressing a luciferase reporter. In an experimental lung invasion assay, we found that cells USP9X KD cells are unable to metastasize to the lungs, as a result of a defect in short-term extravasation across the lung parenchyma. Additional experiments, such as *in vitro* transendothelial migration (Zhang *et al.*, 2019), are nevertheless required to consolidate these findings.

Finally, we sought to understand the implication of USP9X within the YAP-dependent mechanoresistance loop described by our laboratory. First, we found that USP9X inhibition increases the sensitivity of melanoma cells to BRAF inhibition *in vitro*. To extend these observations *in vivo*, we used our syngeneic model of melanoma response to targeted therapy (Diazi *et al.*, 2022). In this model, targeting USP9X counteracted the fibrotic-like response induced by MAPK pathway inhibition, including collagen fibers remodeling and expression of myofibroblastic markers and YAP target genes. Remarkably, the combination of USP9X inhibitor with BRAFi/MEKi enhanced treatment efficacy and delayed tumor relapse in the absence of MAPK pathway reactivation. In line with the described mechanical mechanisms of non-genetic resistance to targeted therapies, it would be important to examine the impact of USP9X on MRTF/SRF-dependent pathways, described in melanoma development and therapy resistance (Girard *et al.*, 2020; Lionarons *et al.*, 2019). Recent studies have underlined mechanisms that may be involved in cross-resistance between targeted therapies and immune checkpoint blockade therapies, including a YAP1 enrichment signature (Hugo *et al.*, 2015; Hugo *et al.*, 2017) and the activation of ROCK/actomyosin pathway (Orgaz *et al.*, 2020). In this context, it would be interesting to study how the mechanically-activated couple USP9X/YAP participates to therapeutic cross-resistance. Finally, the functional relationship between USP9X and YAP was observed in other cancer cell lines, suggesting that USP9X is also a regulator a YAP-dependent mechanical pathways in a broad array of solid tumors, including lung, breast and pancreatic carcinomas.

In conclusion, this study reveals for the first time that the DUB activity of USP9X is modulated by collagen matrix stiffness, resulting in stabilization of the YAP oncoprotein. This mechanism is associated with increased melanoma aggressiveness and drug resistance. We therefore propose that USP9X is a "mechano-DUB" whose targeting could prevent the development of ECM-induced progression and resistance of metastatic melanoma (Fig. 9).

## **Materials and Methods**

### **Cell culture and reagents**

BRAF mutant melanoma cell lines 1205Lu and A375 were obtained as previously described (Didier *et al.*, 2018; Rathore *et al.*, 2019; Tichet *et al.*, 2015). The isogenic pair of Vemurafenib-sensitive (P) and

resistant (R) cell line M238 was described before (Rathore *et al.*, 2019). Melanoma cells were cultured in DMEM supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS) (HyClone) and 1% penicillin/streptomycin (P/S) solution. Short-term cultures of patient melanoma cells MM099 and MM029 cells were provided by J.C. Marine (Girard *et al.*, 2020) and were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 1% P/S. The YUMM1.7 murine melanoma primary line (Diazzi *et al.*, 2022) was grown in OPTIMEM medium with 10% FBS, 1% P/S. Lung (A549), breast (MDA-MB-231) and pancreatic (PANC1) cancer cells were grown in DMEM medium supplemented with 7% FBS, 1% P/S. For live imaging and red nuclear labeling 1205Lu cells were transduced with NuLight Red lentivirus reagent (Essen Bioscience) and selected with puromycin (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma Aldrich). Cells were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. pQCXIH-Myc-YAP-5SA was a gift from K. Guan (Addgene plasmid # 33093)

### **Preparation of collagen gels**

Soft and stiff collagen gels were made according to the protocol described in Park *et al.*, 2020. Soft collagen gels have a stiffness between 2.7 and 16.1 Pa and rigid collagen gels have a stiffness comparable to that of cultured plastic. When not specified, cells were grown on a stiff collagen gel.

For soft collagen gels, a solution containing 8 parts of rat type I collagen (Corning) concentrated to 2.5 mg/ml, 1 part of 10X PBS and 1 part of NaOH (0.1N) was used to obtain a basic pH favoring gel formation. This solution is then spread evenly with a sterile cone tip on the bottom of a well or culture diameter. The gel is then incubated for 1h at 37°C to allow it to polymerize. For stiff collagen gels, the rat type I collagen stock is diluted in 1X PBS to a final concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The solution is then deposited in the well or culture diameter and incubated for 1h at 37°C to allow it to polymerize. Cells are then detached using 1X collagenase I (Gibco) diluted in PBS according to the supplier's specifications. The cells are then incubated for 20 minutes at 37°C to allow the collagenase I to digest the gel. A cell centrifugation is then performed to recover the cells in the pellet.

### **RNAi studies**

For transient RNAi transfection, cells were seeded on a culture dish and then transfected 24h later with 50nM siRNA targeting USP9X, YAP,  $\beta$ -TRCP or luciferase (non-targeting control) diluted in serum-free medium containing 5 $\mu\text{M}$  RNAi MAX (Thermo Fisher Scientific). Cells were then incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for the indicated time post transfection.

For the generation of cells stably depleted for USP9X, different shUSP9X sequences or a non-targeting shRNA sequence (directed against the Renilla luciferase mRNA) were cloned into a pSGEP Luc-PuroR lentiviral vector. Lentiviral particles were produced as follow. HEK293FT cells were seeded (500,000 cells in a T75 flask) and then transfected 72h later with 5 $\mu\text{g}$  of VSV-G plasmid, 10 $\mu\text{g}$  of pCMV 8.91 plasmid and 10 $\mu\text{g}$  of shUSP9X or shRenilla plasmid (control) diluted in optiMEM medium containing 60

μL of jetPEI DNA transfection reagent (Polyplus transfection). 1205Lu cells were seeded at 400,000 in a T75 flask. The medium containing the viral particles produced by HEK293FT was collected, centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes, filtered and put in contact with the 1205Lu cells 24 hours after seeding. Stably depleted cells were then selected with 1μg/ml puromycin.

### **Immunoblot analysis**

Cells were seeded on collagen gels. After pharmacological treatment or transfection, cells were lysed at 4°C in stop buffer (50mM TrisHCl, 150mM NaCl, 0.25% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 1mM EDTA) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Pierce). Lysates were immersed in liquid nitrogen and centrifuged for 15 min at 13,300 rpm at 4°C. After colorimetric assay (DC protein assay-Biorad), 30μg of total proteins are taken up in buffer (25mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 5% glycerol, 1% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue), heated to 95°C 5min, plated on electrophoresis gels, separated, and transferred to nitrocellulose membrane (Millipore). Membranes were saturated 1h at RT in saturation buffer (5% BSA, 10mM Tris-HCl (pH7.5), 500mM NaCl) and incubated with primary antibodies at 4°C ON. The next day, membranes were rinsed in wash buffer (10mM Tris-HCl (pH7.5), 500mM NaCl, 0.1% Tween 20), incubated 1h at RT with the peroxidase-coupled secondary antibodies. After further washing, membranes were revealed by chemiluminescence (ECL, Millipore). Antibodies and inhibitors are listed in Supplementary Table 1.

### **Affinity purification of poly-ubiquitinated proteins**

Cell lysates were incubated with agarose-beads for 2h at 4°C and centrifuged at maximum speed to recover the supernatant. Pre-cleared supernatants were mixed with 5 μg of GST-TUBE (Tandem Ubiquitin Binding Entities, Life Sensors) fusion proteins with glutathione-agarose beads for 2h at 4°C pull-down ubiquitinated proteins. Samples were then centrifuged for 2 min at maximum speed. After 4 washes, pellets were then resuspended in 1X Laemli and analyzed according according to above immunoblot analysis.

### **DUB TRAP assay and Immunoprecipitation**

DUB TRAP assays were performed as described before (Diazzi *et al.*, 2022). Briefly, cells were lysed at 4°C in buffer containing 50mM Tris (pH 7.4), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 250mM sucrose, 1mM DTT, 2mM ATP and 1mM PSMF. The lysates were immersed in liquid nitrogen and centrifuged 15min at 13,300 rpm at 4°C. Lysates were then incubated for 1h at 37°C with 0.5mM HA-Ub-VS (Boston Biochem), which label active DUBs by covalently binding with their enzymatic site. After this step, samples were processed according to above immunoblot analysis.

For mass spectrometry analysis, lysates containing HA-Ub tagged DUBs were immunoprecipitated with anti-HA agarose beads (Sigma).

### **Mass spectrometry analysis**

Immunoprecipitates were then subjected to mass spectrometry analysis as described before (Berestjuk *et al.*, 2022; Girard *et al.*, 2020). Samples were reconstituted in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 2% acetonitrile and analyzed using liquid chromatography (LC)–tandem mass spectrometry (MS/MS) in an LTQ-Orbitrap-Velos (Thermo Electron, Bremen, Germany) online with a nanoLC Ultimate 3000 chromatography system (Dionex). Protein identification and estimation of abundance were determined using raw LC Orbitrap MS data that were processed using the MASCOT search engine (version 2.4.1). Spectra were searched against a SwissProt Human database.

### **Proliferation assay**

Real time analysis of cell proliferation was assessed using an automated videomicroscope (Incucyte Zoom system) according to the manufacturer's instructions (Essen BioScience) and as described before by counting the nuclei of NuLight Red infected cells (Berestjuk *et al.*, 2022). Cells were seeded in triplicate in complete medium ( $15 \times 10^3$  cells/well in 12-well plates) on stiff collagen substrate and treated with the indicated drugs. Phase contrast and red immunofluorescent images were taken every 6 h over a 5-day period (4 images per well at x 4 magnification). Cell proliferation was quantified by counting the number of fluorescent nuclei over time and growth curves were generated using the GraphPad prism 8 software. Results were normalized to time 0.

### **Migration, invasion and *in vitro* scratch assays**

Serum-stimulated chemotaxis and invasion were analysed using modified Boyden chambers (8  $\mu$ m pores, Corning) as described before (Rathore *et al.*, 2019). For invasion assays, the upper side of the filter was coated with 0.5mg/ml matrigel (Corning, NY, USA). Migrated cells were stained with Hoechst and counted (four fields randomly per well). 3D Spheroid Invasion assays were performed as follow. A 30 $\mu$ l drop containing 3,000 cells was placed on the inside of the lid and incubated for 3 days using the hanging droplet method. Once the spheroid is formed, it was embedded in a mixture containing 2.5 mg/ml collagen, MEM 10X medium (Gibco), 1M HEPES and 0.3N NAOH to maintain pH 7. Invasion was monitored and then imaged at 24 h using a light microscope (Zeiss). The invasion area was quantified by Image J software. For *in vitro* scratch assays, cells were grown approximately 80% confluence in 24-well plates. Following treatment, wounds were generated using a sterile 200  $\mu$ l pipette tip across each well and the coverage of the wound in each well was monitored by automated real-time imaging (Incucyte Zoom system).

### **Time lapse analysis of cell locomotion**

Cells were seeded on stiff or soft collagen gels in a 12-well plate (35,000 cells per well) and their nuclei were labeled with Hoescht. Cells were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours under a Leica TIRF videomicroscope and images were taken every 10min intervals for 24h. Cell movement was followed with the "Trackmate" plugin of the ImageJ software.

### **Real-time quantitative PCR**

Cells were seeded on stiff or soft collagen gels. After pharmacological treatment or transfection, total RNAs were extracted using the Nucleospin<sup>®</sup> RNA plus kit according to the supplier's recommendations (Macherey-Nagel). The amount of extracted RNA was measured using the Nanodrop (Thermo scientific). 2.5g of RNA was reverse transcribed using the High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Real-time amplification of amplicons corresponding to different target genes was followed on the Step One thermocycler (Applied Biosystems) by incorporation of SYBR Green<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Melting curve analysis was used to verify the specificity of the generated amplicons. The relative amount of each target was determined based on the expression of housekeeping genes using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Heatmaps depicting fold changes of gene expression were prepared using MeV software.

### **Immunofluorescence and microscopy**

Cells were cultured in a 12-well plate on a collagen-coated 15mm glass coverslip (35,000 cells/condition). Cells were rinsed in PBS and fixed with 3% paraformaldehyde for 20 minutes. After washing, cells were incubated for 10 minutes with a buffer containing PBS + 0.3% Triton X100 for cell permeabilization and incubated in PBS, 0.1% Triton, 5% goat serum (Dako) for 1h, which allows saturation of non-specific sites. Cells were then labelled with primary antibodies in in PBS, 0.1% Triton. F-actin was stained with Alexa Fluor 488 phalloidin (1:100; Thermo Fisher Scientific) and nuclei were stained with DAPI. Following incubation with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies, coverslips were mounted in ProLong antifade mounting reagent (Thermo Fisher Scientific). Images were captured using a wide field microscope (Leica DM5500B). Quantification of the proportion of nuclear or cytoplasmic YAP was performed by comparing the nuclear fluorescence intensity to that of the cytoplasm using ImageJ software. Quantification of cell areas and YAP intensity were also performed with ImageJ software.

### **In vivo experimentations, immunostaining and collagen imaging**



All experiments requiring mice were performed in compliance with the institutional animal care and local animal ethics committees (CIEPAL-Azur agreement NCE/2018-509). For experimental lung metastasis assays, 5-week-old female nude mice (Janvier) were intravenously injected with 1205Lu Luc+ cells ( $1 \times 10^6$ ) that were transduced with non-targeting shRNA lentivirus (shCTRL) or USP9X targeting shRNA lentivirus (shUSP9X) expressing a luciferase reporter gene. Images were recorded using a photon imager (Biospace lab) on mice injected intraperitoneally with 50mg/kg D-luciferin (PerkinElmer). Lung metastasis was monitored and quantified using BLI (Rathore et al. 2019).

For tumor tracking experiments, 5-week-old C57BL/6 mice were injected with  $5 \times 10^5$  YUMM1.7 cells in  $100 \mu\text{L}$  of PBS. Tumors were measured with caliper and treatments were started when the tumors reached a volume equivalent to  $100 \text{mm}^3$ , after randomization of mice into control and test groups. Vemurafenib (30 mg/kg p.o.), Trametinib (0.3 mg/kg p.o.), USP9X inhibitor G9 (7.5 mg/kg i.p) or the indicated combinations were administered every 3 days in vehicle (90% corn oil, 10% DMSO). Control mice were treated with vehicle only. After animal sacrifice, tumors were dissected, weighed and snap-frozen in liquid nitrogen for RNA or protein extraction and immunofluorescence analysis (embedded in OCT from Tissue-Tek). For collagen imaging, tumor samples were fixed in formalin, embedded in paraffin and stained with picosirius red using standard protocols. Tumor sections were analyzed using polarized light microscopy as previously described (Girard *et al.*, 2020). For second harmonic generation (SHG) imaging,  $7 \mu\text{M}$  sections were deparaffinized and the collagen network was observed using a Zeiss 780NLO microscope (Carl Zeiss Microscopy) with Mai Tai HP DeepSee (Newport Corporation).

### **Analysis of gene expression from public databases**

USP9X interactome was generated using the STRING tool (<https://string-db.org/network/9606.ENSP00000316357>). Publicly available gene expression data sets of human melanoma cell lines were used to analyze *USP9X* and *YAP1* levels (GSE3189). Normalized data were analyzed using GraphPad Prism software. Pearson correlation between *USP9X* levels and *YAP1* transcriptional gene signature (CORDENONSI YAP conserved signature) was assessed using the skin melanoma TCGA database retrieved using cBioPortal (cbioportal.org). Survival data from the skin melanoma TCGA database were retrieved using ProteinAtlas (<https://www.proteinatlas.org/>).

### **Statistical analysis**

Unless otherwise stated, all experiments were repeated at least 3 times and representative data/images are shown. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 software. The unpaired two-interval Mann-Whitney test was used for statistical comparisons between two groups when they do not follow a parametric distribution. The Student's T test was used for samples following

a parametric distribution. A Log-rank (Mantel-Cox) test was applied to Kaplan-Meier survival curves. Data represent biological replicates (n) and are depicted as mean values  $\pm$  SEM as indicated in the figure legends.

### **Data availability**

The mass spectrometry proteomics data have been deposited on the ProteomeXchange Consortium of proteomics resource (<http://www.proteomexchange.org>) with the dataset identifier XX.

### **Acknowledgments**

We thank J.C Marine for the short-term cultured melanoma cells, M. Irondelle from the C3M imaging facility, members of the C3M animal facility and C. Matthews for the SHG microscopy analysis (IBV imaging platform, UCA). This work was supported by funds from Inserm, Société Française de Dermatologie, Fondation ARC pour la recherche sur le cancer and Ligue Nationale Contre le Cancer. The financial contribution of the Conseil général 06, Canceropôle Provence Alpes Côte d'Azur and Région Provence Alpes Côte d'Azur to the C3M is also acknowledged. The Marseille Proteomic facility (MaP; <http://map.univmed.fr/>) is supported by IBISA (Infrastructures Biologie Santé et Agronomie), Canceropôle PACA, Région PACA and Institut Paoli-Calmettes. P.B. was a recipient of a doctoral fellowship from Fondation ARC pour la recherche sur le cancer.

### **Author contributions**

### **References**

- Arozarena I, Wellbrock C (2019) Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer* 19: 377-391
- Berestjuk I, Lecacheur M, Carminati A, Diazi S, Rovera C, Prod'homme V, Ohanna M, Popovic A, Mallavialle A, Larbret F *et al* (2022) Targeting Discoidin Domain Receptors DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated tumor cell adaptation and tolerance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *EMBO Mol Med* 14: e11814
- Cancer Genome Atlas N (2015) Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161: 1681-1696
- Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, 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
- D'Arcy P, Wang X, Linder S (2015) Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 147: 32-54

Diazzi S, Baeri A, Fassy J, Lecacheur M, Marin-Bejar O, Girard CA, Lefevre L, Lacoux C, Irondelle M, Mounier C *et al* (2022) Blockade of the pro-fibrotic reaction mediated by the miR-143/-145 cluster enhances the responses to targeted therapy in melanoma. *EMBO Mol Med*: e15295

Diazzi S, Tartare-Deckert S, Deckert M (2020) Bad Neighborhood: Fibrotic Stroma as a New Player in Melanoma Resistance to Targeted Therapies. *Cancers (Basel)* 12: 1364

Didier R, Mallavialle A, Ben Jouira R, Domdom MA, Tichet M, Auberger P, Luciano F, Ohanna M, Tartare-Deckert S, Deckert M (2018) Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Mol Cancer Ther* 17: 1416-1429

Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, Martello G, Stinchfield MJ, Soligo S, Morsut L *et al* (2009) FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* 136: 123-135

Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S *et al* (2011) Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474: 179-183

Fedorenko IV, Wargo JA, Flaherty KT, Messina JL, Smalley KSM (2015) BRAF Inhibition Generates a Host-Tumor Niche that Mediates Therapeutic Escape. *J Invest Dermatol* 135: 3115-3124

Fenouille N, Tichet M, Dufies M, Pottier A, Mogha A, Soo JK, Rocchi S, Mallavialle A, Galibert MD, Khammari A *et al* (2012) The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Regulatory Factor SLUG (SNAI2) Is a Downstream Target of SPARC and AKT in Promoting Melanoma Cell Invasion. *PLoS One* 7: e40378

Finley D (2009) Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* 78: 477-513

Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE (2012) From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 12: 349-361

Girard CA, Lecacheur M, Ben Jouira R, Berestjuk I, Diazzi S, Prod'homme V, Mallavialle A, Larbret F, Gesson M, Schaub S *et al* (2020) A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma. *Cancer Res* 80: 1927-1941

Hoek KS, Goding CR (2010) Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 746-759

Holzel M, Tuting T (2016) Inflammation-Induced Plasticity in Melanoma Therapy and Metastasis. *Trends Immunol* 37: 364-374

Homan CC, Kumar R, Nguyen LS, Haan E, Raymond FL, Abidi F, Raynaud M, Schwartz CE, Wood SA, Gecz J *et al* (2014) Mutations in USP9X are associated with X-linked intellectual disability and disrupt neuronal cell migration and growth. *Am J Hum Genet* 94: 470-478

Hugo W, Shi H, Sun L, Piva M, Song C, Kong X, Moriceau G, Hong A, Dahlman KB, Johnson DB *et al* (2015) Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell* 162: 1271-1285

Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, Berent-Maoz B, Pang J, Chmielowski B, Cherry G *et al* (2017) Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* 168: 542

Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA (2014) Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 802-812

Kim M, Kim M, Park SJ, Lee C, Lim DS (2016a) Role of Angiomotin-like 2 mono-ubiquitination on YAP inhibition. *EMBO Rep* 17: 64-78

Kim MH, Kim J, Hong H, Lee SH, Lee JK, Jung E, Kim J (2016b) Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. *EMBO J* 35: 462-478

Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Ertler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W *et al* (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139: 891-906

Li L, Liu T, Li Y, Wu C, Luo K, Yin Y, Chen Y, Nowsheen S, Wu J, Lou Z *et al* (2018) The deubiquitinase USP9X promotes tumor cell survival and confers chemoresistance through YAP1 stabilization. *Oncogene* 37: 2422-2431

Lionarons DA, Hancock DC, Rana S, East P, Moore C, Murillo MM, Carvalho J, Spencer-Dene B, Herbert E, Stamp G *et al* (2019) RAC1(P29S) Induces a Mesenchymal Phenotypic Switch via Serum Response Factor to Promote Melanoma Development and Therapy Resistance. *Cancer Cell* 36: 68-83 e69

Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV (2017) Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 14: 463-482

Marine JC, Dawson SJ, Dawson MA (2020) Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat Rev Cancer* 20: 743-756

Moroishi T, Hansen CG, Guan KL (2015) The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat Rev Cancer* 15: 73-79

Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, Kong X, Possik PA, Cornelissen-Steijger PD, Geukes Foppen MH *et al* (2014) Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 5: 5712

Murtaza M, Jolly LA, Gecz J, Wood SA (2015) La FAM fatale: USP9X in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 72: 2075-2089

Nallet-Staub F, Marsaud V, Li L, Gilbert C, Dodier S, Bataille V, Sudol M, Herlyn M, Mauviel A (2014) Pro-invasive activity of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 134: 123-132

Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H *et al* (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468: 973-977

Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123: 773-786

Ohanna M, Biber P, Deckert M (2022) Emerging Role of Deubiquitinating Enzymes (DUBs) in Melanoma Pathogenesis. *Cancers (Basel)* 14

Orgaz JL, Crosas-Molist E, Sadok A, Perdrix-Rosell A, Maiques O, Rodriguez-Hernandez I, Monger J, Mele S, Georgouli M, Bridgeman V *et al* (2020) Myosin II Reactivation and Cytoskeletal Remodeling as a Hallmark and a Vulnerability in Melanoma Therapy Resistance. *Cancer Cell* 37: 85-103 e109

Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 15: 1243-1253

Potu H, Kandarpa M, Peterson LF, Durham A, Donato NJ, Talpaz M (2021) Downregulation of SOX2 by inhibition of Usp9X induces apoptosis in melanoma. *Oncotarget* 12: 160-172

Potu H, Peterson LF, Kandarpa M, Pal A, Sun H, Durham A, Harms PW, Hollenhorst PC, Eskiocak U, Talpaz M *et al* (2017) Usp9x regulates Ets-1 ubiquitination and stability to control NRAS expression and tumorigenicity in melanoma. *Nat Commun* 8: 14449

Rambow F, Marine JC, Goding CR (2019) Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev* 33: 1295-1318

Rambow F, Rogiers A, Marin-Bejar O, Aibar S, Femel J, Dewaele M, Karras P, Brown D, Chang YH, Debiec-Rychter M *et al* (2018) Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* 174: 843-855 e819

Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Ben Jouira R, Garcia E, Larbret F, Gesson M, Audebert S, Lacour JP *et al* (2019) Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 38: 5873-5889

Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, Chiarion Sileni V, Schachter J, Garbe C, Bondarenko I *et al* (2019) Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 381: 626-636

Shain AH, Bastian BC (2016) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 16: 345-358

Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJ, Prahallad A, Robert C, Haanen J, Blank C, Wesseling J, Willems SM *et al* (2014) Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508: 118-122

Tichet M, Prod'Homme V, Fenouille N, Ambrosetti D, Mallavialle A, Cerezo M, Ohanna M, Audebert S, Rocchi S, Giaccherio D *et al* (2015) Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat Commun* 6: 6993

Titz B, Lomova A, Le A, Hugo W, Kong X, Ten Hoeve J, Friedman M, Shi H, Moriceau G, Song C *et al* (2016) JUN dependency in distinct early and late BRAF inhibition adaptation states of melanoma. *Cell Discov* 2: 16028

Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, Wong DJL, Atefi M, Shirazi R, Wang X *et al* (2018) Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* 33: 890-904 e895

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

Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, Wubbenhorst B, Xu X, Gimotty PA, 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

Zhang C, Qian H, Liu K, Zhao W, Wang L (2019) A Feedback Loop Regulation Of LINC01433 And YAP Promotes Malignant Behavior In Gastric Cancer Cells. *Onco Targets Ther* 12: 7949-7962

Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL (2010) A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev* 24: 72-85

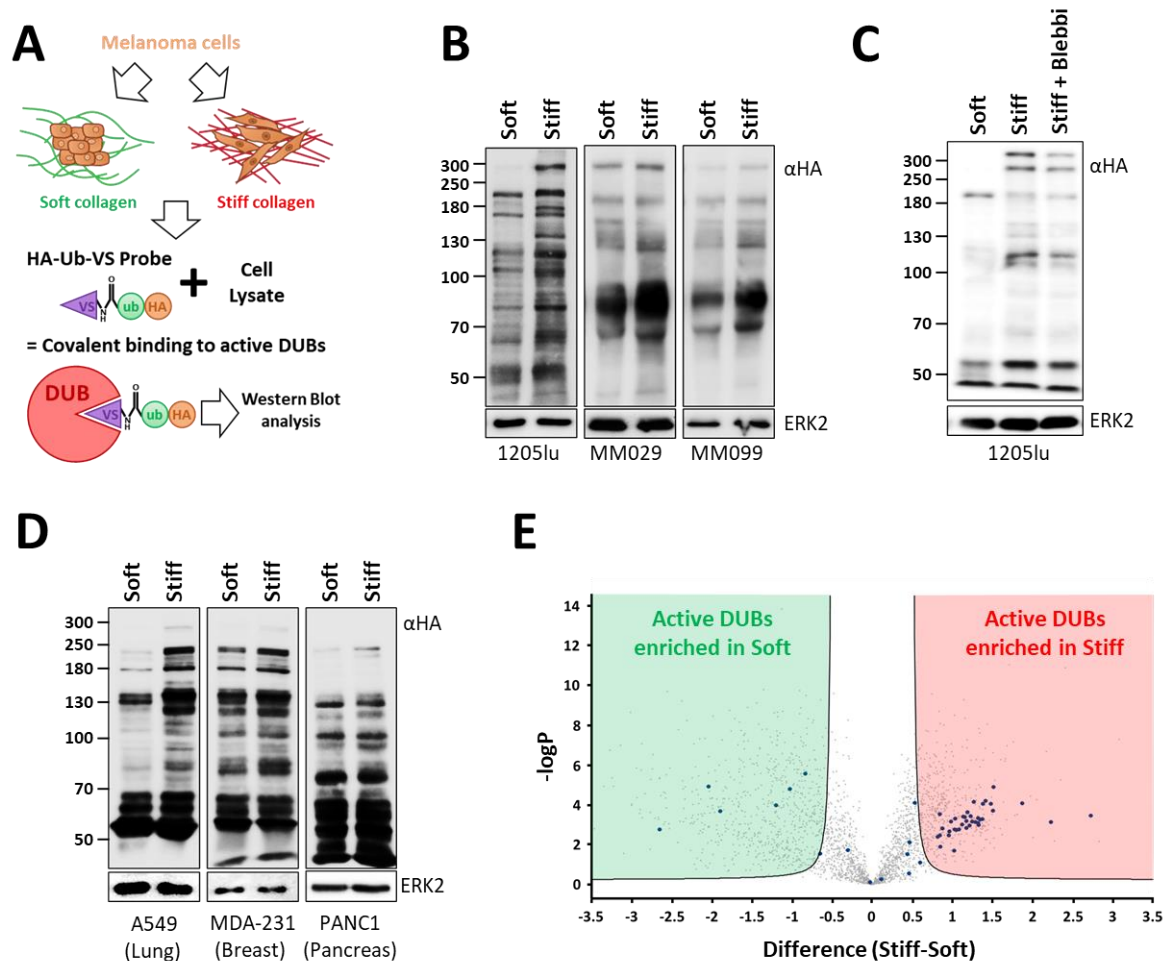
Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L *et al* (2007) Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21: 2747-2761

**Supplementary Table 1**  
**Antibodies**

<b>Antibody</b>	<b>Source</b>	<b>Reference</b>
aSMA	Abcam	ab9694
B-TRCP	Santa Cruz	sc-33213
YAP	Cell Signaling Technology	14074S
Fibronectin	Sigma	F3648
HSP90	Santa Cruz	sc-13119
YAP/TAZ	Cell Signaling Technology	84185
USP9X	Novus biological	NB100-61591 Novus
ERK2	Santa Cruz	sc-154
FAP	Santa Cruz	Sc-65398
SLUG	Santa Cruz	Sc-10436
HA	Cell Signaling Technology	3724S
CYR61	Santa Cruz	sc-374129
SERP1	Santa Cruz	sc-5297
THBS1	Cell Signalling Technology	376795
ANLN		GTX107742
Phospho-ERK	Cell Signalling Technology	9101
ACTIN	Sigma	A2066
MYC	Cell Signalling technology	9402

**Pharmacological inhibitors**

<b>Compound</b>	<b>Source</b>	<b>Reference</b>
G9	Selleckchem	No. S6877
Cycloheximide	Sigma	01810-G
Bortezomib	Selleckchem	No. S1013
Vemurafenib	AbMole	No.M1761
Trametinib	AbMole	N.M1759
Blebbistatine	Selleckchem	No. S7099



**Figure 1. USP9X activity is controlled by extracellular collagen matrix stiffness**

**A.** Principle of the in vitro labeling method of activated DUBs by the activity-based probe HA-Ub-VS (DUB trap assay) according to the collagen matrix stiffness. **B.** Effect of collagen matrix stiffness on DUBs activity in 1205lu cells or MM029 and MM099 cultivated for 72h on soft versus stiff collagen matrices. Lysates of the indicated cells were incubated at 37°C with the HA-Ub-VS probe and analyzed by anti-HA. ERK2, loading control. **C.** Effect of myosin II inhibition using 40μM of Blebbistatin (blebbi) on DUBs activity according to collagen matrix stiffness on 1205lu cells cultivated for 72h on soft versus stiff collagen matrices. Lysates of the indicated cells were incubated at 37°C with the HA-Ub-VS probe and analyzed by anti-HA. ERK2, loading control. **D.** Effect of collagen matrix stiffness on DUBs activity on A549 (lung cancer cells), MDA-MB-231 (breast cancer cells) and PANC1 (pancreas cancer cells) cells cultivated for 72h on soft versus stiff collagen matrices. **E.** 1205lu cells were cultivated and lysed according to the DUB trap assay protocol in (B). Lysate containing the HA-Ub-VS-Active DUB complexes were immunoprecipitated using anti-HA coated agarose beads and sent to quantitative proteomic analysis to determine particular DUBs whose activity is affected by stiffness. Volcano-plot shows DUBs (blue dots) whose activity is increased on soft (green side) or in stiff (red side).



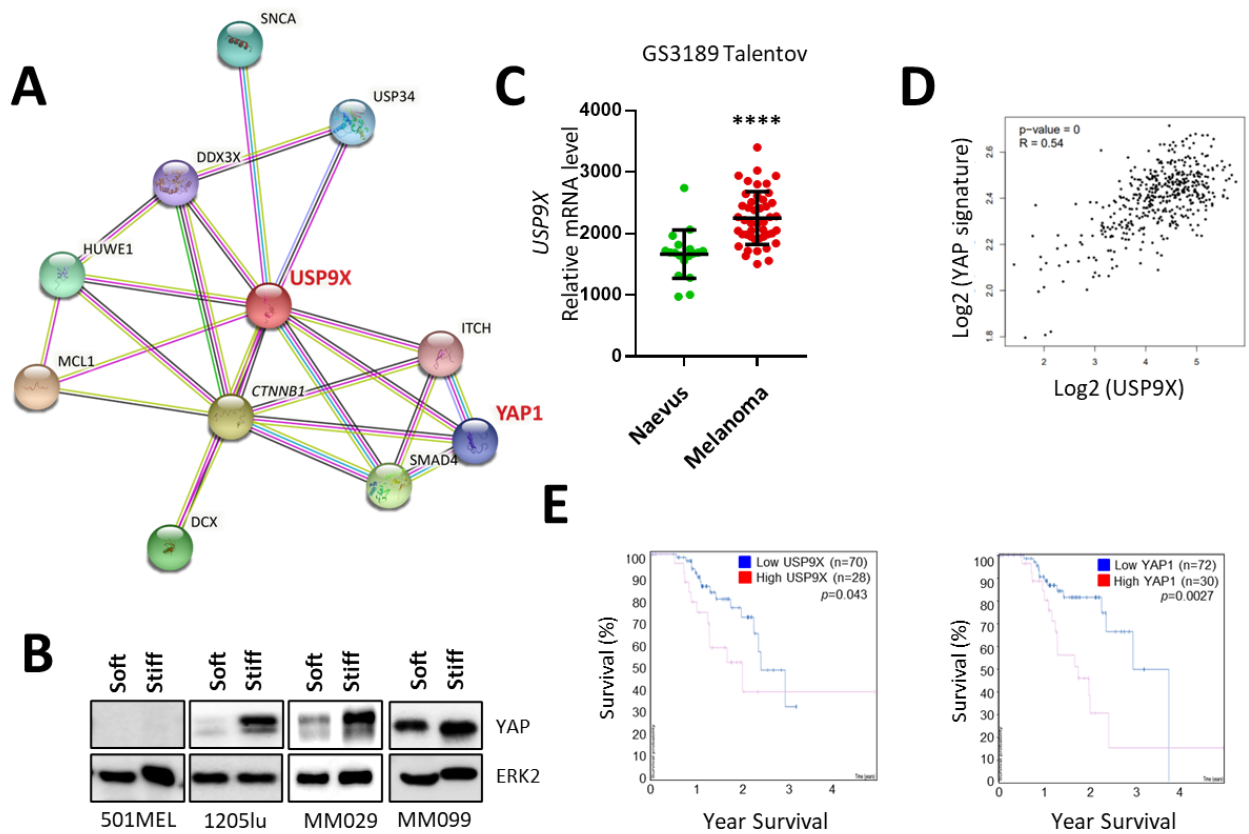
Rank	Protein names	Gene names	log2 FC
1	OTU domain-containing protein 5	OTUD5	2,722674635
2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 35	USP35	2,228630834
3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 38	USP38	1,870641973
4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD	CYLD	1,509820117
5	Ubiquitin thioesterase OTUB2	OTUB2	1,501484685
6	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y	USP9Y	1,480303261
7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 32	USP32	1,410126421
8	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	UCHL5	1,37678406
9	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16	USP16	1,371511062
10	OTU domain-containing protein 6B	OTUD6B	1,343094534
11	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8	USP8	1,326086071
12	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24	USP24	1,319959508
13	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	USP15	1,317871915
14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47	USP47	1,286602789
15	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	USP10	1,26393395
16	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	USP14	1,248148017
17	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4	USP4	1,222306861
18	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	UCHL3	1,209354692
19	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22	USP22	1,18237967
20	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	USP5	1,17518017
21	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25	USP25	1,171805408
22	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28	USP28	1,152943002
23	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 19	USP19	1,118481212
24	OTU domain-containing protein 7B	OTUD7B	1,078283283
25	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	USP9X	1,048494524
26	Ubiquitin thioesterase OTU1	YOD1	1,030632151
27	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 40	USP40	1,028741625
28	OTU domain-containing protein 1	OTUD1	1,018856843
1	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36	BRCC3	-2,659423722
2	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3;A20p50;A20p	TNFAIP3	-2,04895197
3	U4/U6,U5 tri-snRNP-associated protein 2	USP39	-1,899883986
4	COP9 signalosome complex subunit 6	COPS6	-1,207294517
5	COP9 signalosome complex subunit 5	COPS5	-1,02998315

Active DUBs  
enriched in Stiff

Active DUBs  
enriched in Soft

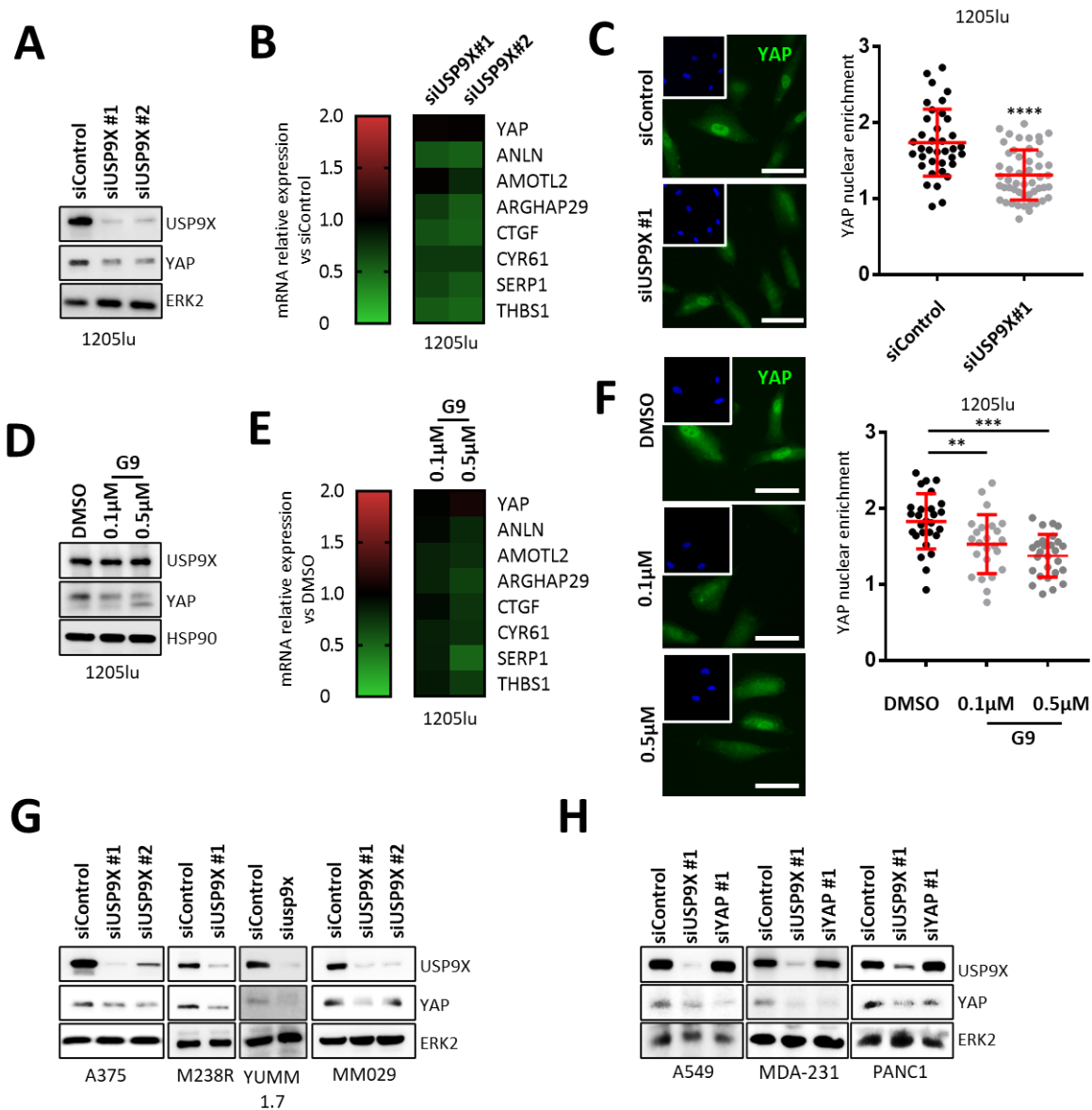
**Table 1. DUBs whose activity is affected by collagen matrix stiffness**

Red background, DUBs whose activity are increased when 1205lu cells are plated on stiff collagen matrix. Green background, DUBs whose activity are increased when 1205lu cells are plated on soft collagen matrix.

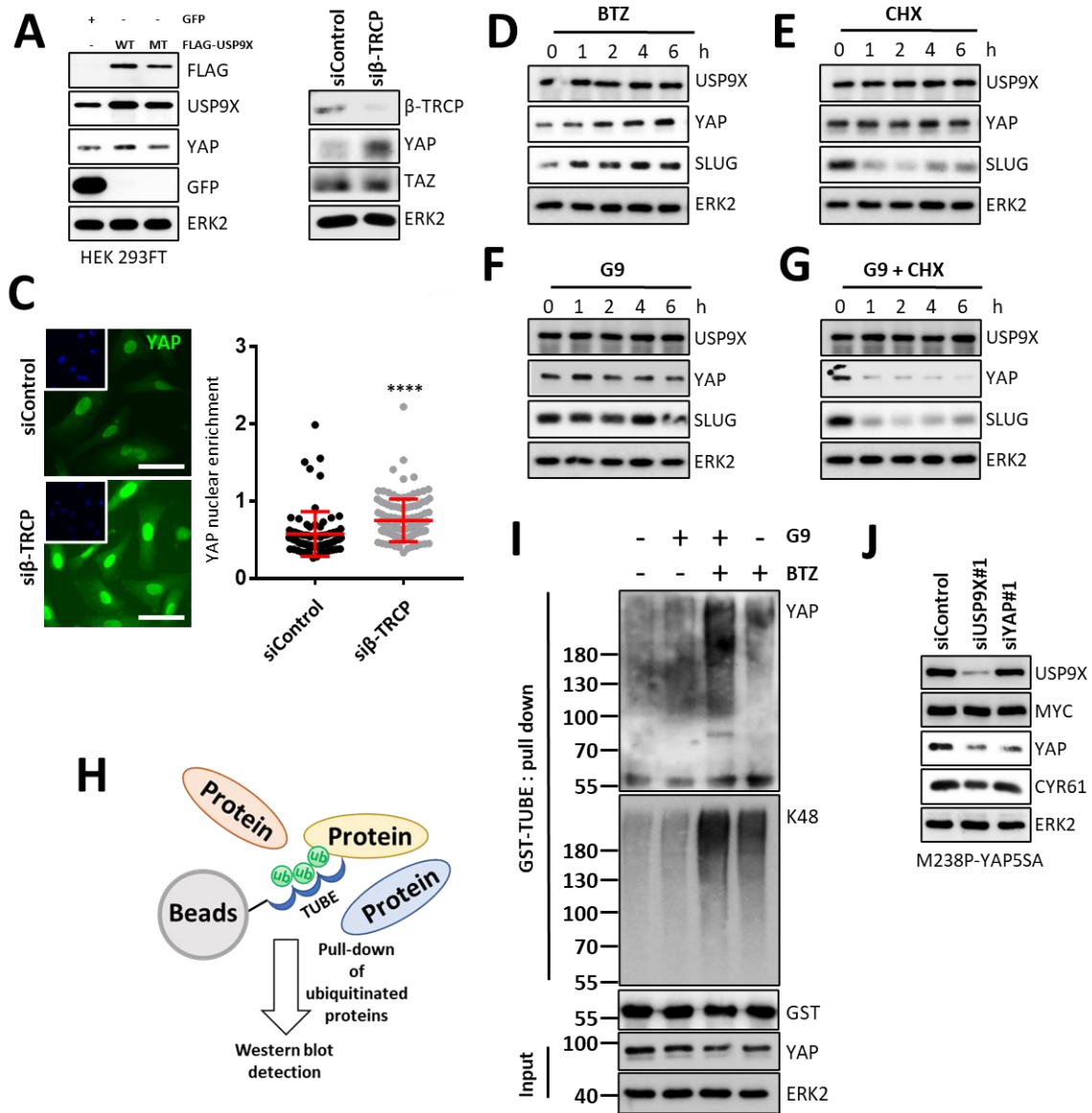


**Figure 2. Correlation between USP9X and the YAP mechanosensor in melanoma**

**A.** USP9X interactome generated using the STRING tool (<https://string-db.org/network/9606.ENSP00000316357>). **B.** Western blot analysis of YAP expression on 501MEL, 1205lu, MM029 and MM099 cells cultivated for 72h on soft versus stiff collagen matrices. ERK2, loading control. **C.** Comparison of RNA expression of *USP9X* between naevus and metastatic melanoma (GSE3189 Talentov). \*\*\*\*  $P < 0.0001$ . **D.** Scatter plots showing the correlation between *USP9X* expression and the transcriptional signature controlled by YAP (CORDENONSI YAP conserved signature). Each dots represent a SKCM cohort sample (TCGA). Pearson correlation and p-value are indicated. **E.** Kaplan-Meier showing patient survival percentage through time according to *USP9X* (left) and YAP expression (right).



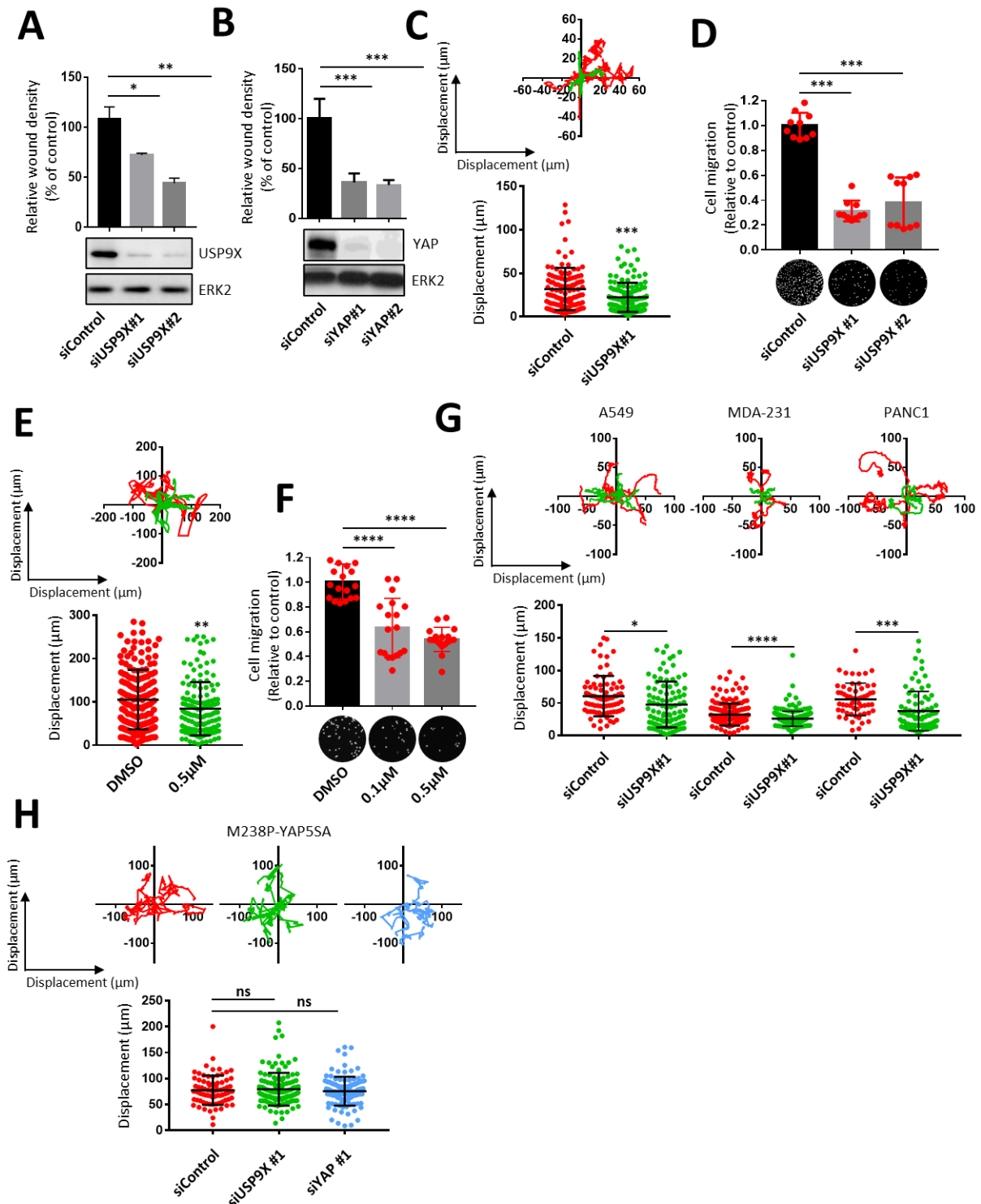
**Figure 3. USP9X controls YAP expression and activity in multiple solid cancers including melanoma** **A.** Western blot analysis of USP9X and YAP expression on 1205lu cells transfected for 72h with 2 different sequences of siUSP9X or a control siRNA and cultivated on stiff collagen matrices. ERK2, loading control. **B.** Heatmap showing *YAP* and its target genes expression on 1205lu cells transfected and cultivated according to (A). **C.** On the left, immunofluorescence analysis of YAP (Green) of 1205lu cells transfected and cultivated according to (A). Scale bar = 50µM (white). On the right, quantification of YAP nucleoplasmic distribution ( $n>30$ ). \*\*\*\*  $P<0.0001$ . **D.** Western blot analysis of USP9X and YAP expression on 1205lu cells treated with 2 doses of USP9X inhibitor G9 for 72h and cultivated on stiff collagen matrices. ERK2, loading control. **E.** Heatmap showing *YAP* and its target genes expression on 1205lu cells treated and cultivated according to (D). **F.** On the left, immunofluorescence analysis of YAP (Green) of 1205lu cells treated and cultivated according to (A). Scale bar = 50µM (white). On the right, quantification of YAP nucleoplasmic distribution ( $n>30$ ). \*\*  $P<0.01$  \*\*\*  $P<0.001$ . **G.** Western blot analysis of USP9X and YAP expression on A375, YUMM1.7, M239R and MM029 cells transfected for 72h with different sequences of siUSP9X or a control siRNA and cultivated on stiff collagen matrices. ERK2, loading control. **H.** Western blot analysis of USP9X and YAP expression on A549, MDA-MB-231 and PANC1 cells transfected for 72h with the siUSP9X#1, the siYAP#1 or a control siRNA and cultivated on stiff collagen matrices. ERK2, loading control.



**Figure 4. USP9X controls YAP stability and prevents its proteasomal degradation**

**A.** Western blot analysis of USP9X, FLAG, YAP and GFP expression on HEK293FT cells transfected for 48h with plasmid coding for a WT FLAG-USP9X, a dead catalytic mutant Flag-USP9X or GFP as control. ERK2, loading control. **B.** Western blot analysis of YAP, TAZ and  $\beta$ -TRCP expression on 1205lu cells transfected with a si $\beta$ -TRCP and a control siRNA for 72h and cultivated on stiff collagen matrices. ERK2, loading control. **C.** On the left, immunofluorescence analysis of YAP (Green) of 1205lu cells transfected and cultivated according to (B). Scale bar = 50 $\mu$ M (white). On the right, quantification of YAP nucleoplasmic distribution (n>30). \*\*\*\* P<0.0001. **D.** Western blot analysis of USP9X, YAP and SLUG on 1205lu cells treated at indicated times with 100nM of the proteasome inhibitor Bortezomib (BTZ). ERK2, loading control. **E.** Western blot analysis of USP9X, YAP and SLUG on 1205lu cells treated at indicated times with 25 $\mu$ g/ml of the protein synthesis inhibitor Cycloheximide (CHX). ERK2, loading control. **F.** Western blot analysis of USP9X, YAP and SLUG on 1205lu cells treated at indicated times with 1 $\mu$ M of the USP9X inhibitor (G9). ERK2, loading control. **G.** Western blot analysis of USP9X, YAP and SLUG on 1205lu cells treated at indicated times with a combination of Cycloheximide (25 $\mu$ g/ml) and G9 (1 $\mu$ M). ERK2, loading control. **H.** Principle of the affinity-based precipitation of poly-ubiquitinated proteins using GST-TUBE (Tandem Ubiquitin Binding Entities) fusion protein and glutathione coated agarose beads. **I.** GST-TUBE pull down analysis of YAP ubiquitination on 1205lu cells treated for 3h with G9 (1 $\mu$ M), BTZ (100nM) or a combination of both. Precipitated protein a visualized using anti-K48 ubiquitin chain antibody and anti-YAP antibody. ERK2, loading control. **J.** Western Blot analysis of USP9X, YAP, MYC and CYR61 expression on M238P cells overexpressing YAP5SA

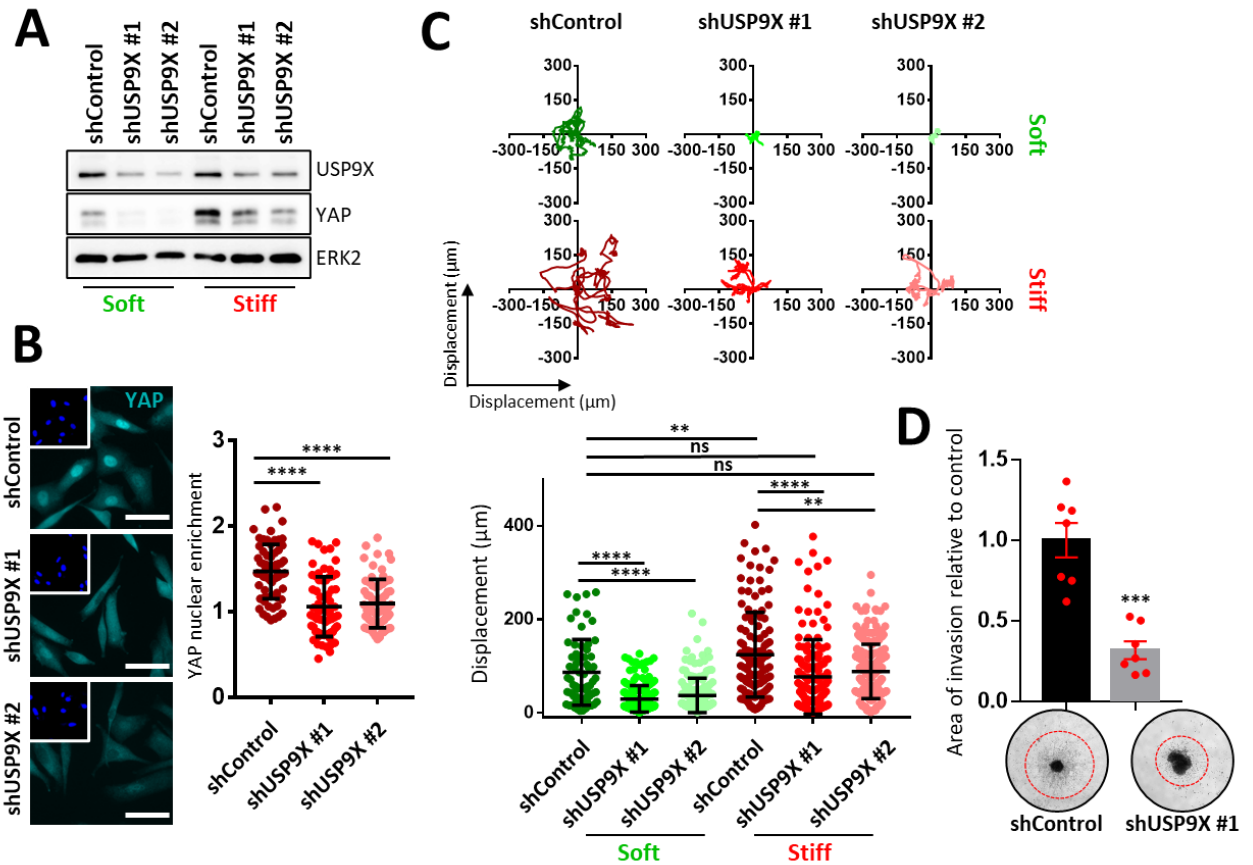
constitutive active mutant transfected with a siUSP9X#1, a siYAP#1 or a control siRNA and cultivated for 72h on stiff collagen matrices. ERK2, loading control.



**Figure 5. USP9X controls melanoma cells migration through YAP stabilization**

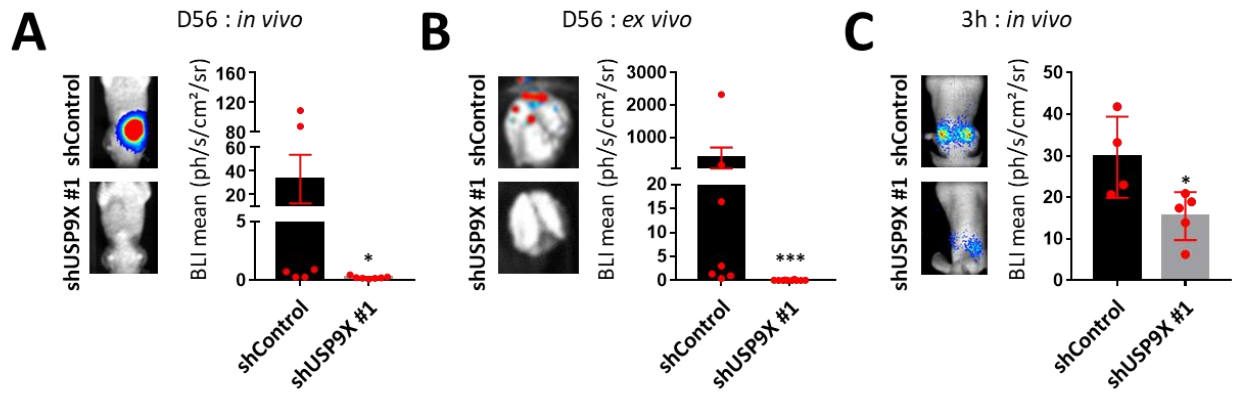
**A.** Wound closing percentage 24h after its realization on a 1205lu cell monolayer at 100% confluency transfected with 2 different sequences of siUSP9X or a control siRNA. Upper panel, quantification of closing percentage. Lower panel, western blot analysis of USP9X expression. ERK2, loading control. \* P<0.05, \*\* P<0.01. **B.** Wound closing percentage 24h after its realization on a 1205lu cell monolayer at 100% confluency transfected with 2 different sequences of siYAP or a control siRNA. Upper panel, quantification of closing percentage. Lower panel, western blot analysis of USP9X expression. ERK2, loading control. \*\*\* P<0.01. **C.** Videomicroscopy analysis of

1205lu cells displacement during 24h after siUS9X#1 or siControl transfection. Upper panel, displacement path of 5 representative cells for each condition. Lower panel, quantification of cells displacement (n>40). \*\*\*P<0.001. **D.** Quantification of migration by chemotactism in Boyden chambers of 1205lu cells after 72h transfection of two sequences of siUSP9X or a control siRNA. \*\*\* P<0.001. **E.** Videomicroscopy analysis of 1205lu cells displacement during 24h after treatment with the USP9X inhibitor G9. Upper panel, displacement path of 5 representative cells for each condition. Lower panel, quantification of cells displacement (n>40). \*\*P<0.01. **F.** Quantification of migration by chemotactism in Boyden chambers of 1205lu cells treated with increasing doses of G9 during 24h. \*\*\*\* P<0.0001. **G.** Videomicroscopy analysis of A549, MDA-MB-231 and PANC1 cells displacement during 24h after siUS9X#1 or siControl transfection. Upper panel, displacement path of 5 representative cells for each condition. Lower panel, quantification of cells displacement (n>40). \* P<0.05, \*\*\*P<0.001 \*\*\*\* P<0.0001. **H.** Videomicroscopy analysis of M238P-YAP5SA cells displacement during 24h after siUS9X#1, siYAP#1 or siControl transfection. Upper panel, displacement path of 5 representative cells for each condition. Lower panel, quantification of cells displacement (n>40).



**Figure 6. USP9X affect invasives characteristics of melanoma cells *in vitro***

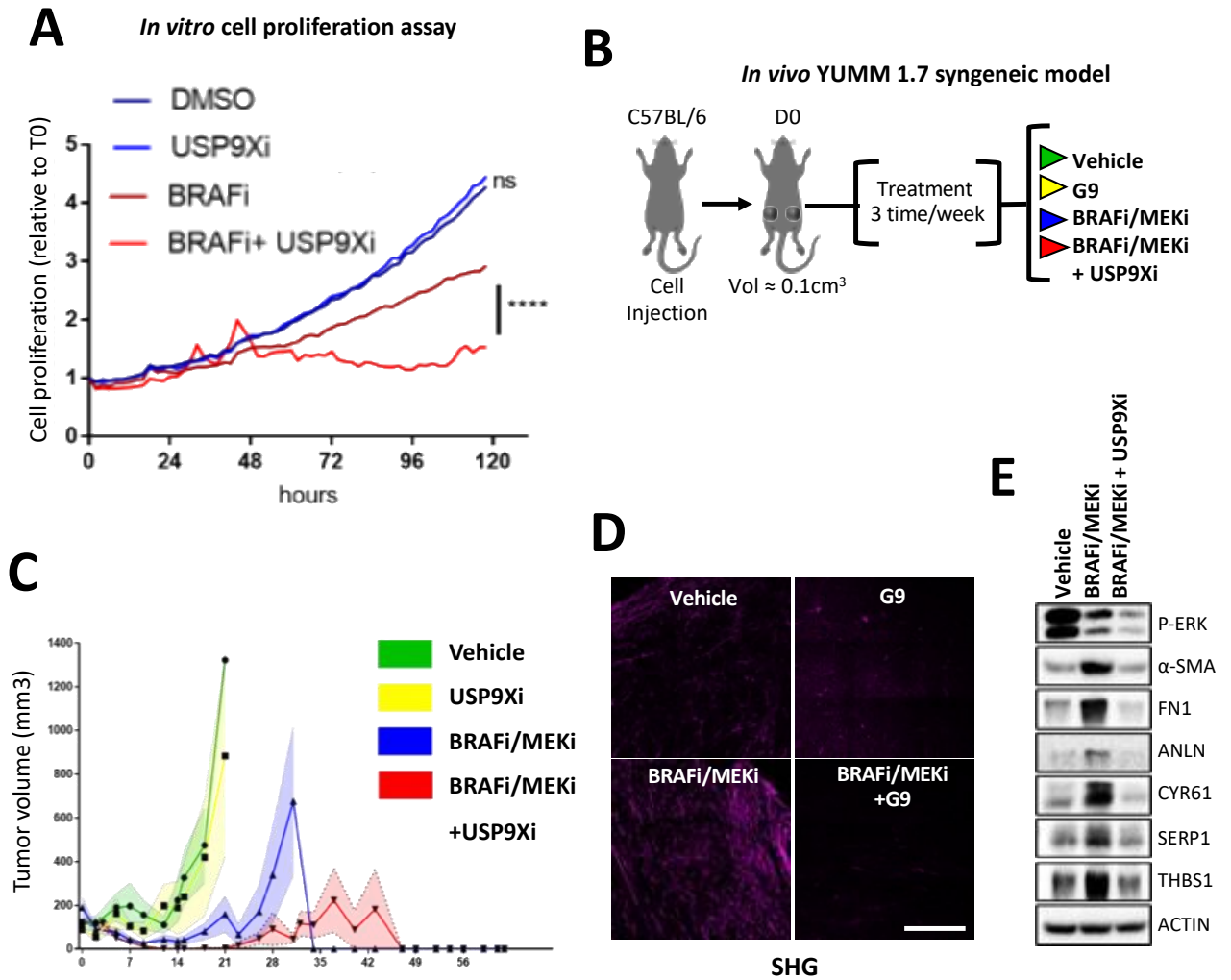
**A.** Western blot analysis of USP9X and YAP expression on 1205lu cells having integrated by infection the lentiviral plasmid pSGEP Luc-PuroR ShUSP9X#1/2 or Control and cultivated for 72h on soft versus stiff collagen matrices. ERK2, loading control. **B.** On the left, immunofluorescence analysis of YAP (cyan) of shUSP9X1/2 or shControl cultivated on stiff matrices. Scale bar = 50µM (white). On the right, quantification of YAP nucleoplasmic distribution (n>30). \*\*\*\* P<0.0001. **C.** Videomicroscopy analysis of shUSP9X1/2 or shControl cells displacement during 24h after siUS9X#1 or siControl transfection. Upper panel, displacement path of 5 representative cells for each condition. Lower panel, quantification of cells displacement (n>40). \*\* P<0.01, \*\*\*\* P<0.0001. **D.** Analysis of tumoral invasion of shUSP9X1/2 or shControl cells cultivated in spheroids a 3D and included in a 3D collagen matrix. Upper panel quantification of invasion area in pixels. Lower panel, representative pictures of cellular invasion after 24h. \*\*\* P<0.001.



**Figure 7. USP9X affects metastatic melanoma cells extravasation *in vivo***

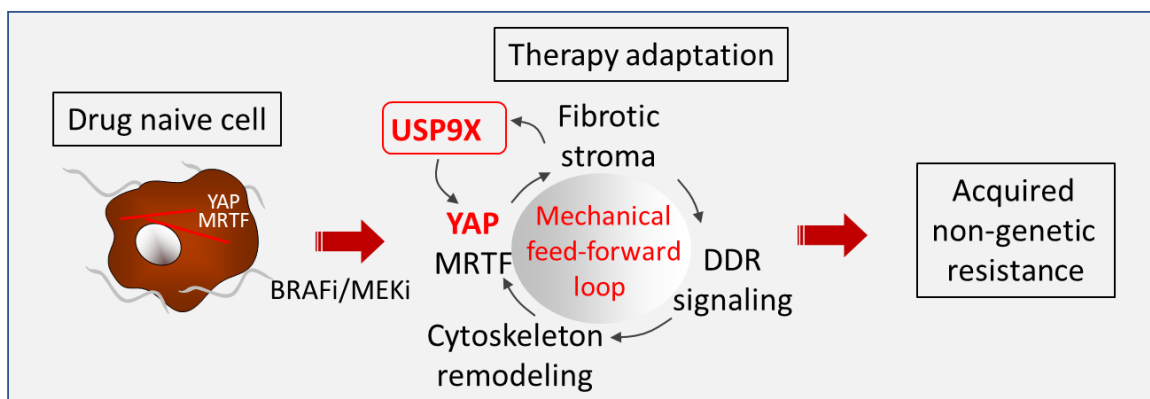
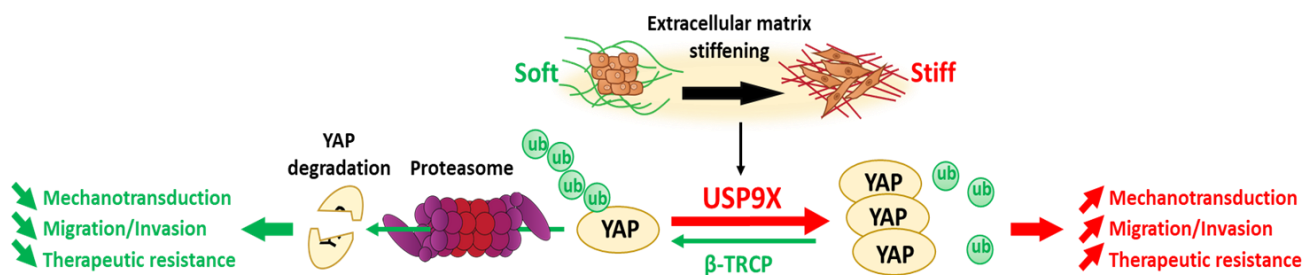
**A.** ShControl and shUSP9X#1 cells were intravenously injected in the caudal vein of nude mice and metastatic progression was followed and quantified using Biospace imager. On the left, representative pictures of photons fluxes produced by bioluminescent melanoma cells. On the right quantification of photon fluxes produced by shControl and shUSP9X#1 cells in mice lungs at the end of the experiment. \*  $P < 0.05$ . **B.** On the left, representative pictures of photon fluxes produced by metastatic foci in extracted lung. *Ex vivo* metastatic foci quantification at the end of the experiment. \*\*\*  $P < 0.001$ . **C.** ShControl and shUSP9X#1 cells were intravenously injected in the caudal vein of nude mice and metastatic progression was followed and quantified using Biospace imager. On the left, representative pictures of photons fluxes produced by bioluminescent melanoma cells 3h after the injection. On the right quantification of photon fluxes produced by shControl and shUSP9X#1 cells in mice lungs 3h after the injection. \*  $P < 0.05$ .





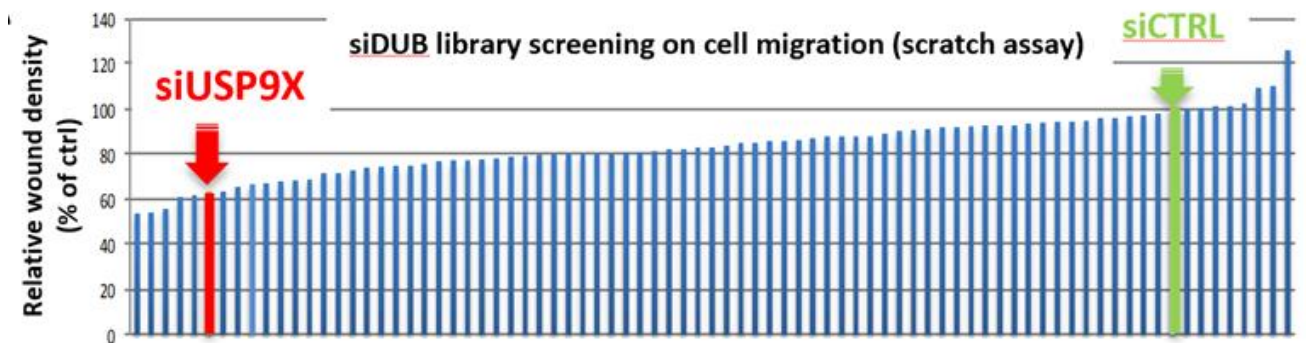
**Figure 8. Targeting USP9X prevent collagen network remodeling induced by targeted therapies and delays treatment relapse**

**A.** 1205lu melanoma cells were seeded on stiff collagen matrices, treated with 2.5 $\mu\text{M}$  of Vemurafenib (BRAFi), 0.5 $\mu\text{M}$  of the USP9X inhibitor (G9) or a combination of both and proliferation was monitored using real time imaging (Incucyte Zoom System). Curve shows evolution of confluency through time relative to T0. \*\*\*\* P<0.0001. **B.** YUMM1.7 murine melanoma cells were subcutaneously injected in C57BL/6 mice. Once tumors reached 100mm<sup>3</sup>, mice were treated with vehicle, USP9X inhibitor (G9), MAPK inhibitors (BRAFi, Vemurafenib + MEKi, Trametinib) or BRAFi/MEKi + G9. **C.** Representatives pictures of collagen fibers network in tumors according to treatment, taken using second harmonic generation (SHG). Scale bar = 250 $\mu\text{M}$  (white). **D.** Western blot analysis of Phospho-ERK,  $\alpha$ -SMA, FN1 and several target genes of YAP (ANLN, CYR61, SERP1 and THSBS1) expression according to treatment. **E.** Graphical representation of tumor growth according to treatment. **F.** Kaplan-Meier survival curves of mice according to treatment.



**Figure 9. Proposed model of USP9X action in melanoma's mechanobiology**

Scheme showing the relationship between USP9X, extracellular matrix stiffness and the YAP-dependent feed-forward loop contributing to melanoma cells resistance to MAPK inhibitors.



### Supplemental Figure 1. Screening of DUBs implicated in melanoma cell migration

A375 melanoma cells cultivated at 100% confluency were transfected with a siRNA bank directed against most the DUBs in the human genome. After transfection a wound is realized, and wound healing is monitored by automatized real time imagery (Incucyte Zoom System). Panel shows wound healing percentage according to the depleted DUB 48h after transfection.

# Discussion/perspectives

Le système ubiquitine protéasome joue un rôle critique dans le maintien de la balance protéostatique au sein de la cellule. Son activité sur l'ubiquitination consiste en l'addition de plusieurs molécules d'ubiquitines sous forme de chaîne sur les substrats du protéasome. Ces chaînes serviront ensuite de signal d'adressage à la dégradation au niveau du protéasome à l'aide de protéines navettes possédant des domaines spécialisés reconnaissant la conformation de ces chaînes. De plus ce système est complété par les déubiquitinases (DUBs) qui vont catalyser le clivage des chaînes d'ubiquitine de leur substrat. Leur rôle consiste ainsi à permettre l'édition du code de l'ubiquitine et dans le cas du système ubiquitine protéasome, ces enzymes vont empêcher la dégradation de leur substrat par le protéasome. Ensemble avec les autres composants du système ubiquitine protéasome, les DUBs constituent les gardiennes de l'homéostasie protéique.

Dans la cellule cancéreuse, l'accumulation d'altérations génétiques, l'activation de voies oncogéniques et le fort index prolifératif augmente la synthèse protéique et l'addiction aux systèmes permettant de maintenir la protéostasie (Finley, 2009). De plus l'accumulation de facteurs jouant des rôles clés dans la plupart des processus tumoraux comme la survie, l'invasion et la résistance thérapeutique est régulé au niveau post-traductionnel par le système ubiquitine protéasome. C'est notamment le cas de l'oncoprotéine YAP (Moroishi et al., 2015) pour laquelle notre équipe décrit un rôle important dans le mécanisme d'adaptation au traitement du mélanome.

Le mélanome est un cancer défini par sa forte capacité métastatique et sa propension à résister au traitement. Ces capacités prennent leur origine dans la grande plasticité que présentent les cellules de mélanome. Le développement d'inhibiteurs spécifiques de la version mutante de BRAF appelés thérapies ciblées a permis une révolution dans la prise en charge thérapeutique des patients. Malheureusement, la grande capacité d'adaptation des cellules de mélanome leur permette de mettre en place différentes stratégies conduisant à la résistance aux thérapies ciblées. Dans ce contexte, notre laboratoire montre que le traitement aux inhibiteurs de BRAF induit une rigidification de la matrice extracellulaire qui conduit à l'activation d'une voie de la mécanotransduction dépendante du cofacteur de transcription YAP. En retour ce dernier va promouvoir un programme génétique renforçant le remodelage et la rigidification de la matrice créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif qui a terme conduit les cellules à un échappement thérapeutique.

Afin d'identifier de nouveaux acteurs dans ce mécanisme, nous avons choisi de nous pencher sur le système ubiquitine protéasome et les déubiquitinases (DUBs) qui y sont associées. En effet, Les cellules cancéreuses vont être capables de détourner l'activité des DUBs pour stabiliser des oncogènes (D'Arcy et al., 2015). C'est notamment le cas dans le mélanome dans lequel de nombreuses DUBs vont participer à tous les niveaux de la progression de la maladie : de sa transformation maligne à la résistance au traitement (Ohanna et al., 2022). Parmi ces DUBs impliquées dans le mélanome, on trouve USP9X qui est capable de réguler l'expression de NRAS via la stabilisation d'ETS1 (Potu et al., 2017) et de jouer un rôle dans la résistance aux thérapies ciblées via la stabilisation de SOX2 (Potu et al., 2021). Notre laboratoire montre également que le ciblage de USP14, l'une des trois DUB associée au protéasome induit un fort effet anti-mélanome (Didier et al., 2018). De plus une seconde étude en cours de préparation au laboratoire identifie PSMD14 comme une DUB jouant un rôle critique dans la croissance tumorale et la résistance thérapeutique du mélanome via son interaction avec l'histone H2A (Ohanna et al., en préparation, annexes : publication 1). De plus, nous montrons que la régulation de l'ubiquitination de H2A par PSMD14 joue un rôle clé dans la mise en place de la résistance aux thérapies ciblées. Dans ce contexte, les DUBs sont des candidates idéales pour identifier de nouveaux acteurs dans la mécanorésistance du mélanome en réponse au thérapies ciblées. Toutefois, la contribution des DUBs dans la mécanotransduction est encore largement inexplorée.

De façon originale, ces travaux de thèse mettent en évidence pour la première fois que la rigidité de la matrice extracellulaire et du collagène en particulier peut moduler l'activité des DUBs dans plusieurs lignées de cellules de mélanome, mais également dans des lignées de différents cancers solides (poumon, sein et pancréas).

Afin d'identifier précisément les DUBs dont l'activité est augmentée ou diminuée avec la rigidité de la matrice extracellulaire nous avons utilisé la protéomique quantitative couplée à notre méthode d'étiquetage des DUBs actives (Fig1A). Dans l'analyse des données de spectrométrie de masse, d'autres DUBs que USP9X présentent une augmentation de leur activité avec la rigidité matricielle et peuvent se révéler être des cibles intéressantes dans le cadre du mélanome. C'est notamment le cas de OTUD5 qui présente la plus forte augmentation d'activité en condition rigide (Article 1, Table 1). En effet, en 2021, une étude montre chez le macrophage que OTUD5 est responsable de la transition de M1 vers M2 et facilite le développement du cancer du sein triple négatif (Zhang et al., 2021). L'étude démontre que cela passe par une stabilisation de YAP hors du contexte de la mécanotransduction. Malgré tout, cette interaction possible entre le mécanosenseur YAP et OTUD5 confirme la validité de notre approche puisqu'on s'attend à trouver des DUBs pouvant être reliées à la mécanotransduction. Une autre étude de 2021 montre que USP22 dont l'activité est augmentée en condition rigide (Article 1, Table 1) est un régulateur de YAP dans le mélanome et participe à la résistance aux thérapies ciblées (Ohanna et al., 2022; Wei et al., 2021). Toutefois, cette étude ne s'est pas non plus faite dans le contexte de la mécanotransduction ce qui souligne l'originalité de notre approche.

D'après notre criblage, USP9X est une DUB dont l'activité est augmentée avec la rigidité de notre modèle de matrice de collagène. Notre choix s'est porté sur USP9X car son lien avec YAP n'est plus à faire dans la littérature. En effet plusieurs études montrent que USP9X va activer la signalisation YAP-dépendante. Ici, la littérature décrit deux mécanismes possibles : d'une part une stabilisation directe via son activité déubiquitineuse observée par une étude dans le cancer du sein en 2018 (L. Li et al., 2018) ; d'autre part une étude de 2016 montre que YAP peut être indirectement stabilisé par la surexpression de USP9X via la perte de la monoubiquitination de AMOTL2. Lorsque la monoubiquitination de AMOTL2 est perdue, il ne peut plus remplir son rôle d'inhibiteur de YAP (Kim et al., 2016). Cependant, aucune étude montrant un lien entre USP9X et YAP ne le fait dans le contexte de la mécanotransduction ce qui souligne l'originalité de notre approche.

Outre le lien déjà établi entre USP9X et YAP dans la littérature, nous avons mis en évidence une corrélation entre l'expression de USP9X et la signature transcriptionnelle contrôlée par YAP dans la cohorte SKCM du TCGA. De plus l'expression de USP9X et de YAP sont toutes deux associées à un mauvais pronostic dans le mélanome. De façon intéressante, avant la mise en place de cette étude, notre laboratoire avait réalisé un criblage des DUBs du génome pour identifier de nouveaux acteurs de la migration dans le mélanome. On observe que USP9X ressort comme la sixième meilleure cible identifiée par ce criblage. Cette observation est appuyée par la littérature qui montre que USP9X est impliquée dans la migration des cellules neuronales, ce qui est pertinent dans le cadre du mélanome puisque que les mélanocytes et les neurones présentent une origine embryonnaire commune (Homan et al., 2014). Enfin YAP, que nous avons identifié comme partenaire potentiel de USP9X est impliqué dans les propriétés invasives des cellules de mélanome (Nallet-Staub et al., 2014). Malgré son lien avec YAP dans le mélanome, USP22 n'est sortie que 70ième dans cette liste parmi les DUBs dont la déplétion n'a aucun effet sur la migration. Enfin, il est également connu que l'augmentation de la rigidité matricielle est associée à une augmentation des capacités motiles et invasives des cellules. En effet la rigidification de la matrice peut promouvoir la transition épithélio-mésenchymateuse via un mécanisme dépendant du TGF- $\beta$  (Leight et al., 2012), mais aussi participer à l'invasion via l'assemblage d'adhésion focale (Parekh et al., 2011) et l'augmentation de l'activité métalloprotéase (Haage and

Schneider, 2014). De plus lorsque l'on cible la réticulation des fibres de collagène on observe une diminution de la formation d'adhésions focales, de l'activation de la voie PI3K ayant pour conséquence la diminution des capacités invasives de cellules de cancer du sein (Levental et al., 2009). Enfin, des résultats récents de notre laboratoire montrent que la rigidification de la matrice induit une augmentation de la motilité cellulaire dans des lignées de mélanome invasives. On montre également une plus forte expression protéique de YAP dans différentes lignées de mélanome cultivées sur une matrice de collagène rigide ce qui va de pair avec un rôle de YAP dans la migration mécano-induite dans le mélanome. Ce contexte nous permet d'établir un lien potentiel entre la mécano-activation de USP9X, YAP et la migration/invasion des cellules de mélanome. C'est donc pour toutes ces raisons que le choix de USP9X nous est apparu pertinent dans le cadre de cette étude.

Nous montrons aussi que la contraction du cytosquelette d'actine est importante la modulation de l'activité globale des DUBs induite par la rigidification de la matrice de collagène. En effet, l'inhibition de la myosine II dans des cellules cultivées sur matrice rigide restaure partiellement le phénotype d'activation des DUBs observé sur matrice souple. Cette observation est en accord avec la littérature qui montre que le cytosquelette d'actine et sa capacité de contraction est impliquée dans le transfert des signaux mécaniques au sein de la cellule (Dupont et al., 2011; Miralles et al., 2003; Yeung et al., 2005). Le remodelage du cytosquelette d'actine est donc en partie responsable des différences dans le profil d'activation des DUBs observées en fonction de la rigidité. Les signaux mécaniques générés par la rigidification de la matrice extracellulaire sont transmis au cytosquelette de la cellule au moyen de différents récepteurs des macromolécules de la matrice extracellulaire telles que les intégrines (Aragona et al., 2013; Humphrey et al., 2014; Pickup et al., 2014). Parmi ces récepteurs on trouve également les récepteurs tyrosine kinases (RTKs) à domaine discoïdine DDR1/2 qui vont reconnaître le collagène fibrillaire via leur partie extracellulaire et interagir avec le cytosquelette d'actine via leur partie intracellulaire (Coelho et al., 2017; Vogel et al., 1997). Une étude en cours au sein du laboratoire montre que ces récepteurs peuvent moduler la signalisation de YAP dépendante des contraintes mécaniques (Lecacheur et al., in preparation). Ces récepteurs, mais aussi les intégrines peuvent donc constituer une piste intéressante pour explorer la façon dont la rigidité matricielle peut influencer l'activité des DUBs et plus particulièrement l'activité de USP9X et son interaction avec YAP.

Nous avons également identifié d'autres cibles intéressantes dont l'activité est augmentée lorsque que la rigidité de la matrice de collagène est faible. Ainsi nous observons que BRCC3 et TNFAIP3 sont les principales DUBs de notre criblage à montrer une augmentation de leur activité inversement proportionnelle à la rigidité (Article 1, Table 1). De façon intéressante ces deux DUBs sont reliées à l'inflammasome NLRP3. En effet la littérature nous informe que BRCC3 est la DUB de NLRP3 (Py et al., 2013) et TNFAIP3 qui est régulée par le TNF $\alpha$  peut indirectement moduler à la hausse NLRP3 (Wang et al., 2021). Cela concorde avec de récentes observations faites au laboratoire montrant que les cellules de mélanome cultivées sur une matrice souple ont un phénotype plutôt pro-inflammatoire (Fig26). Ces observations pointent vers l'installation d'un phénotype plutôt pro-inflammatoire dans les cellules cultivées sur une matrice souple avec une stabilisation de l'inflammasome et la production d'IL1 $\alpha$  et  $\beta$ . Au contraire, la rigidité matricielle semble promouvoir un état plutôt anti-inflammatoire avec la sécrétion avec notamment l'augmentation de l'activité de OTUD5 qui favorise la polarisation du macrophage vers un phénotype M2 anti-inflammatoire (Zhang et al., 2021). Ces modifications de l'activité et/ou de l'expression des DUBs en fonction de la rigidité du collagène pourraient jouer un rôle important dans l'adaptation des cellules tumorales aux conditions hétérogènes de microenvironnement matriciel des multiples tissus parcourus au cours de la dissémination métastatique. A l'inverse, ces mécanismes pourraient aussi permettre aux cellules tumorales de modifier à leur avantage leur environnement en fonction des localisations dans l'organisme.

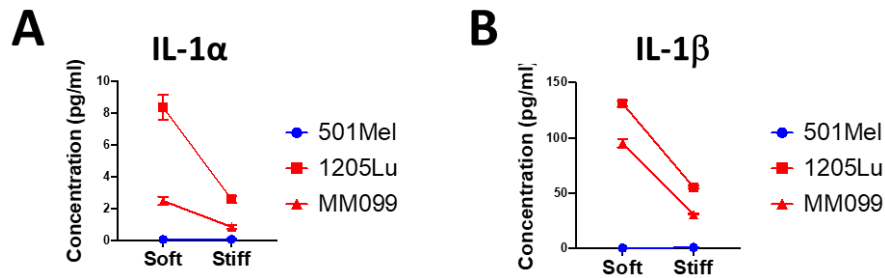


Figure 26 : Les cellules de mélanome dédifférenciées secrètent des facteurs pro-inflammatoires sur une matrice de collagène souple

A. Dosage ELISA d'IL-1 $\alpha$  dans le surnageant de cellules de mélanome 1205lu, MM099 et 501MEL. B. Dosage ELISA d'IL-1 $\beta$  dans le surnageant de cellules de mélanome 1205lu, MM099 et 501MEL.

Le lien potentiel de USP9X avec YAP dans le mélanome est particulièrement intéressant dans le contexte de cette étude. En effet, YAP est un cofacteur transcriptionnel qui va induire un programme génétique spécifique en réponse aux contraintes mécaniques induites par la matrice extracellulaire. L'opportunité d'étudier une enzyme dont l'activité est augmentée avec la rigidité matricielle et qui peut potentiellement influencer sur la stabilité d'une protéine mécanosenseur s'est présentée avec USP9X. De plus plusieurs études récentes du laboratoire montrent que la matrice et plus précisément sa rigidification due à une densification du réseau de fibres de collagène en réponse aux thérapies ciblées participent à l'apparition de résistances (Diazi et al., 2022; Girard et al., 2020). Ce remodelage de la matrice va induire l'activation des voies de la mécanotransduction via YAP et MRTF qui en retour vont renforcer ce phénotype matriciel. La mise en place de cette boucle auto-amplificatrice aboutit à un échappement thérapeutique des cellules de mélanome aux thérapies ciblées (Girard et al., 2020). Ainsi le lien entre YAP et la mécanorésistance motive encore plus notre choix de USP9X comme nouvel acteur de cette boucle dans le cadre de cette étude.

Par des approches de déplétion avec des siARN et d'inhibition pharmacologique, nous avons montré que l'expression protéique de YAP était contrôlée par USP9X dans le mélanome (Article 1). De façon intéressante, seule l'expression protéique de YAP semble être affectée. Cette observation renforce l'idée que l'action stabilisatrice de USP9X sur YAP est post-traductionnelle, et donc probablement médiée par son activité déubiquitineuse. On note également que la déplétion ou le ciblage pharmacologique de USP9X diminue la proportion de YAP dans le noyau lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice rigide de collagène. La perte de la localisation nucléaire de YAP est associée à une diminution de son activité de cofacteur de la transcription via sa liaison à TEAD (Verfaillie et al., 2015). Ceci se traduit par la perte du message des gènes cibles que le couple YAP-TEAD contrôle dans le cadre de la mécanotransduction (Fig3B Fig3E). En tant que cofacteur de la transcription, YAP peut également s'associer à d'autre facteur de transcription comme RUNX1/2. Pour confirmer que les effets observés précédemment sont bien dépendants de l'interaction de YAP-TEAD il faudra montrer que la déplétion des 4 isoformes de TEAD phénocopie la déplétion de USP9X.

Nous observons également que l'expression de USP9X est nécessaire à l'expression protéique de YAP dans plusieurs autres lignées de mélanome comme les A375 ou la lignée murine YUMM1.7. On étend également cette observation aux deux cultures de cellules de mélanome fraîchement isolées de patients (MM029 et MM099) ce qui sous-entend que cette observation n'est pas lignée-spécifique. Enfin dans la lignée de mélanome résistante aux inhibiteurs de BRAF M238R, on observe également une diminution de l'expression protéique de YAP lorsque l'on déplete USP9X.



Par la suite, nous avons décidé d'étendre ces observations à d'autres lignées de cancer dans lesquelles la mécanotransduction joue un rôle important comme le sein ou le pancréas ou encore issues d'organes sujets aux fibroses comme le poumon. Dans ce panel de lignées, lorsque USP9X est déplétée, nous observons également cette perte d'expression protéique de YAP qui n'affecte pas son messenger mais affecte en revanche celui de ses gènes cibles.

Pris ensemble, ces résultats indiquent que l'expression et l'activité de USP9X sont nécessaires à la stabilité de YAP non seulement dans le mélanome, mais également d'autres cancers solides pour lesquels les contraintes mécaniques de l'environnement jouent un rôle important. De plus ces résultats nous indiquent que cette stabilisation est post-traductionnelle puisque le messenger de YAP n'est pas affecté par la déplétion de USP9X (Fig3B, Fig3E). On fait donc l'hypothèse USP9X stabilise YAP via son activité déubiquitinase en lui retirant sa possibilité d'être dégradé au protéasome.

Pour tester cette hypothèse nous avons surexprimé une version sauvage et une version catalytiquement inactive de USP9X dans des cellules HEK-293FT. On observe que la surexpression de la version sauvage USP9X induit bien une augmentation de l'expression de YAP que l'on ne retrouve pas avec son mutant inactif. Cette observation nous indique que c'est bien l'activité déubiquitinase de USP9X qui est responsable de la stabilisation de YAP. Dans le cadre de l'activation de la voie hippo, YAP va être phosphorylé sur son motif phosphodégron. A la suite de cette phosphorylation, l'E3 ligase  $\beta$ -TRCP va pouvoir ubiquitiner YAP ce qui aboutit à sa dégradation au niveau du protéasome (Zhao et al., 2010). Nous confirmons cette relation dans notre modèle en montrant que la déplétion de  $\beta$ -TRCP induit une augmentation de l'expression protéique de YAP et son accumulation dans le noyau de la cellule. Cette observation nous indique également que YAP peut être dégradé par le protéasome dans le mélanome. De plus, on observe que la déplétion de  $\beta$ -TRCP n'affecte pas l'expression de TAZ suggérant une spécificité pour la protéine YAP de notre modèle. Une approche d'inhibition pharmacologique du protéasome avec le Bortézomib, nous permet de confirmer que YAP est dégradé par le protéasome dans les cellules de mélanome. De manière intéressante, l'inhibition de la synthèse protéique avec du cycloheximide n'est pas suffisante pour induire une perte de l'expression protéique de YAP. Cette observation est cohérente avec la littérature qui décrit une demi-vie d'environ 6h pour la protéine YAP (Huang et al., 2012; Miranda et al., 2017). Nous avons donc fait l'hypothèse que USP9X est responsable de la stabilité de YAP lorsque la synthèse protéique n'est pas possible (Fig4E). Un co-traitement avec le cycloheximide et l'inhibiteur de USP9X (G9) montre une perte totale et rapide de l'expression protéique de YAP. Cette observation nous permet de confirmer que c'était bien l'activité de USP9X qui protège YAP de la dégradation dans la figure 3D. Grâce à une approche de purification de la fraction des protéines polyubiquitinées, on observe que le co-traitement avec le Bortézomib et l'inhibiteur de USP9X induit une augmentation de l'ubiquitination de YAP par rapport à la condition Bortézomib seul. Le co-traitement avec le Bortézomib nous permet d'observer la fraction polyubiquitinée des protéines sans qu'elle soit dégradée par le protéasome. Cette observation nous indique que l'activité de USP9X empêche l'ubiquitination de YAP et donc sa dégradation au protéasome.

Par la suite, nous avons utilisé une lignée de mélanome M238P ayant intégré un vecteur d'expression d'une forme constitutivement active de YAP : YAP5SA. Cette version de YAP est mutée sur les 5 sérines phosphorylées par LATS1/2 ce qui empêche sa désactivation par dégradation et donc le rend constitutivement actif (Zhao et al., 2007). Dans ces cellules nous observons que la déplétion de USP9X n'affecte pas l'expression de la version mutante de YAP ni de son gène cible CYR61. Cette observation montre que l'introduction d'une version non dégradable de YAP permet de restaurer le phénotype dépendant de YAP même en absence de USP9X. Ensemble, ces résultats nous montrent que l'activité de USP9X est bien responsable de l'ubiquitination de YAP dans le mélanome. Cependant on ne peut

pas conclure que l'action de USP9X sur YAP est directe et ne passe pas par AMOTL2 (Kim et al., 2016). Pour cela il faudrait réaliser des expériences de déubiquitination *in vitro* à l'aide de protéines recombinantes. On pourrait également s'intéresser à l'expression du long ARN non codant LINC01433 qui semble jouer un rôle d'échafaudage rapprochant physiquement USP9X et YAP pour promouvoir leur interaction (Zhang et al., 2019).

Comme mentionné dans la première partie de la discussion USP9X semble jouer un rôle dans la migration des cellules de mélanome. Cette idée est supportée par le rôle connu de YAP dans migration des cellules de mélanome, mais également la plus forte propension des cellules à migrer/envahir en présence d'une matrice rigide. Dans ce contexte, nous avons fait l'hypothèse que USP9X peut impacter la migration des cellules de mélanome via son effet sur YAP. Tout d'abord nous avons confirmé le résultat du criblage sur notre modèle de cellule de mélanome avec un test de blessure. La même approche a été utilisée pour confirmer que la perte de YAP impacte la migration des cellules de mélanome dans notre modèle. Par la suite des approches de déplétion par siRNA et de ciblage pharmacologique, nous ont permis de montrer que USP9X est impliqué dans migration par chimiotactisme et la motilité des cellules de mélanome (Article 1). Néanmoins pour confirmer que l'effet de USP9X sur la migration est dépendant de YAP des expériences de sauvetage additionnelles seront nécessaires. Nous avons co-déplété  $\beta$ -TRCP cellules transitoirement déplétées pour USP9X afin de tenter de restaurer le phénotype migratoire. Malheureusement la déplétion de  $\beta$ -TRCP associée à la déplétion de USP9X se révèle bien trop toxique dans notre modèle ce qui induit un biais. En effet  $\beta$ -TRCP fait partie d'un complexe d'ubiquitination qui joue un rôle critique dans de nombreux processus cellulaires dont notamment la progression du cycle cellulaire (Bi et al., 2021). La littérature montre également que la déplétion de  $\beta$ -TRCP affecte la capacité migratoire des cellules ce qui en fait un probable mauvais candidat pour restaurer le phénotype migratoire des cellules déplétées pour USP9X (Cui et al., 2020). Dans les cellules M238P surexprimant la version non-dégradable de YAP, la déplétion de USP9X n'affecte plus la motilité cellulaire. Cette observation nous indique que l'effet de USP9X dans les propriétés motiles du mélanome est dépendant de YAP.

Toujours dans le but d'étendre cette étude à d'autres types de cancer nous avons observé que la déplétion de USP9X induit également une diminution de la motilité de cellules de cancer du poumon, du sein et du pancréas.

Afin d'étendre cette étude à notre modèle d'invasion au poumon chez la souris, nous avons généré des cellules 1205lu stablement déplétées pour USP9X. De plus ces cellules expriment un rapporteur luciférase qui permet le suivi des cellules *in vivo*. Tout d'abord, nous nous sommes assurés que ces cellules possèdent un phénotype consistant avec nos observations précédentes. On remarque qu'elles présentent une diminution de l'expression de YAP lorsqu'elles sont cultivées sur une matrice de collagène rigide. On fait la même observation lorsque ces cellules sontensemencées sur une matrice de collagène souple avec une perte encore plus drastique de YAP. De plus on a également montré que ces cellules présentent une diminution de la localisation nucléaire de YAP. La motilité de ces cellules est également réduite par rapport au contrôle lorsqu'elles sont cultivées sur une matrice de collagène rigide. De manière intéressante la motilité des cellules stablement déplétées pour USP9X cultivées sur une matrice de collagène rigide n'est pas statistiquement différente de celle des cellules contrôles cultivées sur une matrice de collagène souple. Cela nous indique que la perte de USP9X empêche les cellules de correctement interpréter les signaux mécaniques de la matrice. Cet effet est probablement dû à la perte de l'expression de YAP ainsi qu'à son exclusion du noyau qui empêche la mise en place de son programme génétique. On note également que lorsqu'elles sont cultivées sur une matrice de collagène souple, les cellules stablement déplétées pour USP9X présentent une motilité réduite par rapport au cellules shContrôle. Il semble ainsi y avoir une corrélation entre le niveau d'expression de

YAP et la motilité des cellules. Ensemble, ces résultats renforcent l'idée que l'effet de USP9X sur la migration et la motilité cellulaire est probablement dépendant de YAP.

De plus lorsque l'on cultive ces cellules en sphéroïdes inclus dans une matrice tridimensionnelle de collagène/matrigel, on observe une diminution de l'aire du gel envahie par les cellules 1205lu stablement déplétées pour USP9X. On en conclut que USP9X est également nécessaire à la mise en place des propriétés invasives des cellules de mélanome.

Par la suite nous avons suivi la formation de métastases aux poumons après injection de ces cellules dans la veine caudale de souris immunodéprimées (souris nude) (Rathore et al., 2019; Tichet et al., 2015). Nous observons que les cellules stablement déplétées pour USP9X sont incapables de former des métastases aux poumons. Pour expliquer ce résultat, nous faisons l'hypothèse que la perte de USP9X affecte la capacité d'extravasation des cellules de mélanome. Cette hypothèse est renforcée par la perte des propriétés invasives des cellules déplétées pour USP9X. Pour tester cette idée, nous avons lancé une seconde expérience de métastases expérimentales aux poumons pour regarder l'extravasation à court terme (Tichet et al., 2015). 3h après l'injection, nous observons une diminution de la quantité de cellules présentes dans les poumons de la souris. Cette observation concourt avec l'idée que les cellules présentant une extinction de USP9X sont incapables de traverser le parenchyme pulmonaire et sont rapidement évacuées dans la circulation sanguine du rongeur. Pour confirmer cette hypothèse on peut envisager des expériences complémentaires d'extravasation *in vitro* en utilisant une chambre de Boyden couverte d'une monocouche de cellules épithéliales.

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent un rôle important de USP9X dans les capacités motiles, migratoires et invasives du mélanome *in vitro* via un mécanisme dépendant du mécanosenseur YAP. USP9X joue également un rôle dans la formation de métastase *in vivo* dans un modèle d'invasion aux poumons chez la souris immunodéprimée.

Nos travaux montrent que YAP est impliqué dans une boucle auto-amplificatrice dépendante de la rigidification de la MEC et menant à l'échappement thérapeutique du mélanome. Sachant que nos résultats montrent que USP9X contrôle l'expression et l'activité de YAP, nous avons cherché à comprendre l'impact de cette DUB au sein de cette boucle de mécanorésistance. Dans un premier temps, nous avons confirmé que l'inhibition de USP9X augmente la sensibilité des cellules de mélanome à l'inhibition de BRAF. Nous avons tenté de reproduire cette observation sur un modèle de cellules de mélanome résistantes aux inhibiteurs de BRAF (M238R) dans lequel nous observons la relation entre USP9X et YAP. Dans ces cellules nous n'avons pas pu observer de re-sensibilisation aux inhibiteurs de BRAF. Pour expliquer ce résultat, nous proposons que le ciblage de USP9X est uniquement capable d'influencer l'adaptation transitoire aux thérapies ciblées et ne peut pas restaurer le phénotype sensible de lignées résistantes telles que les M238R. De plus l'étude de Girard et., al montre que la résistance dans ces cellules est également dépendante de la signalisation du mécanosenseur MRTF. Ces données sont pertinentes dans le cadre de ces observations puisque nous observons une perte de l'expression du messager de MRTF dans les cellules transitoirement déplétée pour USP9X que nous n'observons pas dans le modèle de cellules stablement déplétée pour USP9X (données non montrées). Nous faisons donc l'hypothèse que ces dernières réactivent la signalisation MRTF pour s'adapter à la perte de USP9X et de l'activité de YAP. Sachant que les programmes transcriptionnels de MRTF et de YAP présentent des redondances (Foster et al., 2017), nous faisons l'hypothèse que c'est la voie de MRTF qui permet aux cellules stablement déplétée pour USP9X de s'adapter et aux cellules résistante de maintenir leur résistance sous inhibition de USP9X.

Pour aller plus loin, nous avons utilisé des cellules YUMM1.7 possédants un fond génétique C57BL/6 afin de pouvoir les injecter dans des souris immunocompétentes. Des travaux précédant du laboratoire

confirment que le traitement aux thérapies ciblées induisent un remodelage de la matrice extracellulaire de collagène dans les tumeurs générées par ce modèle (Diazi et al., 2022; Girard et al., 2020). Dans un premier temps, nous avons confirmé que les tumeurs traitées aux thérapies ciblées et prélevées durant la phase de rechute présentent un réseau de collagène plus dense associé à une plus forte expression de marqueurs myofibroblastiques ainsi que des gènes cibles de YAP. Au contraire, les tumeurs prélevées durant la rechute à la trithérapie ne présentent pas de remodelage de la matrice extracellulaire de collagène. De plus on observe une perte de l'expression des marqueurs myofibroblastiques et des gènes cibles de YAP. Ce phénotype est associé à une meilleure survie globale des souris (données non montrées) et une rechute qui apparaît en moyenne 7 jours plus tard que dans le groupe BRAFi/MEKi. On note aussi que les tumeurs traitées avec les thérapies ciblées en combinaison avec le G9, ne présentent pas de réactivation de la voie des MAPK puisqu'on observe une phosphorylation de ERK plus faible que dans le groupe BRAFi/MEKi seul. Cela sous-entend que dans ces cellules la résistance aux thérapies ciblées ne passe pas par une réactivation de la voie BRAF/MEK. De plus l'inhibition de USP9X en combinaison avec les thérapies ciblées, retarde la rechute au traitement.

Ces observations montrent que le couple USP9X-YAP participe bien à la mise en place de phénomène de remodelage de la matrice de collagène sous l'impulsion des thérapies ciblées. De plus, l'utilisation d'un modèle syngénique de mélanome chez la souris immunocompétente permet d'ouvrir la voie à l'étude de la fonction du couple USP9X/YAP dans la résistance croisée aux immunothérapies. Cette perspective est d'autant plus pertinente que des études récentes montrent que la résistance croisée entre les thérapies ciblées et les immunothérapies peut être associée à une signature YAP (Hugo et al., 2017, 2015) et être dépendante de l'activation de la voie ROCK/Myosine II (Orgaz et al., 2020). En effet, le remodelage du cytosquelette d'actomyosine est nécessaire à la translocation dans le noyau de YAP ce qui nous amène à l'hypothèse que le couple USP9X/YAP peut être impliqué dans ce type de résistance croisée.

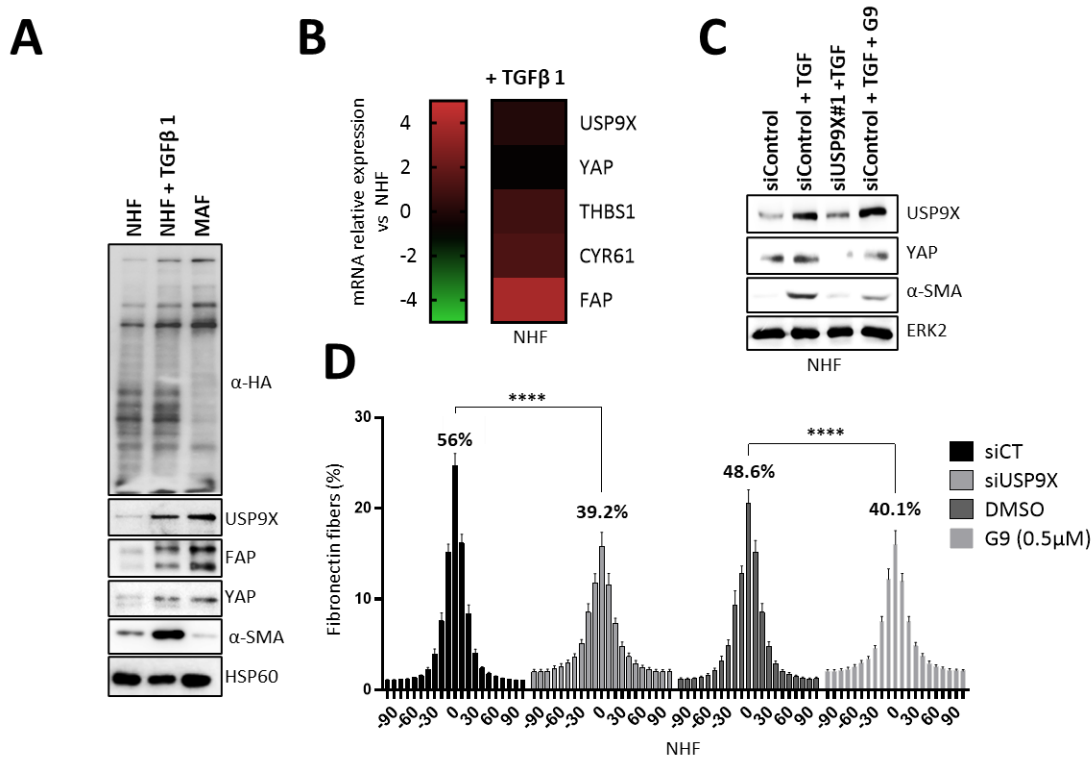


Figure 27 : L'inhibition de USP9X inhibe l'expression de YAP et l'activation myofibroblastique des CAFs

**A.** Analyse biochimique de l'activité des DUBs, de l'expression des marqueurs de CAF  $\alpha$ -SMA et FAP et de l'expression de USP9X et YAP sur des fibroblaste humain normale (NHF) traitées ou non au TGF $\beta$  1 et des fibroblastes associés au mélanome (MAF). HSP60, contrôle de charge. **B.** Heatmap montrant l'expression de YAP de deux de ses gènes cibles (CYR61 et THBS1), de USP9X et de FAP par RT-qPCR. **C.** Analyse biochimique de l'expression de USP9X, de YAP et de  $\alpha$ -SMA sur des NHF traitées ou non au TGF $\beta$  1 et transfectées avec un siUSP9X ou un siControl ou traitée avec l'inhibiteur de USP9X G9. ERK2, contrôle de charge. **D.** Quantification en immunofluorescence de l'alignement des fibres de fibronectines déposée par des MAF transfectées avec un siControl ou un siUSP9X ou traitées avec l'inhibiteur de USP9X G9.

En condition physiologique, les fibroblastes sont responsables de la production et de la sécrétion des macromolécules de la matrice extracellulaire dans le microenvironnement. Ces macromolécules telles que les fibres de collagène ou la fibronectine s'organisent en un réseau complexe qui servira de charpente pour les cellules et assurera l'intégrité des différents tissus. Dans une étude récente, notre laboratoire montre que la matrice produite par les fibroblastes associés aux cancers (CAFs) peut protéger les cellules de mélanome des thérapies ciblées (Berestjuk et al., 2022). De plus le phénotype myofibroblastique présenté par les fibroblastes associés au cancer est dépendant de YAP (Calvo et al., 2013). Les résultats de cette thèse montrent que USP9X semble jouer un rôle important dans la capacité des cellules de mélanome à remodeler la matrice de collagène via la stabilisation de YAP. Dans ce contexte, nous nous sommes donc demandés si la relation entre YAP et USP9X se retrouve dans les fibroblastes associés au cancer et plus particulièrement au mélanome. Dans un premier temps notre technique d'étiquetage des DUB actives nous révèle que le motif d'activité globale augmente dans les fibroblastes traités au TGF $\beta$  1 pour simuler le phénotype « CAF » et dans une lignée de MAF par rapport à des fibroblastes normale de peau (Fig27A). De plus cette augmentation de l'activité des DUBs est associée à une plus forte expression protéique de USP9X et YAP (Fig27A). En accord avec nos résultats dans le mélanome, on remarque que les messagers de USP9X et de deux gènes cibles de YAP augmentent avec le traitement au TGF $\beta$  sans que le messager de YAP soit impacté (Fig27B). Cette observation préliminaire concorde avec celles que nous avons faites dans le mélanome et renforce l'idée que USP9X stabilise YAP au niveau protéique dans ces cellules sous

l'action du TGF $\beta$ . Des approches de déplétion ou de ciblage pharmacologique de USP9X nous indiquent que son expression est importante pour la mise en place du phénotype CAF sous l'action du TGF $\beta$ . En effet lorsque l'on déplete USP9X on perd l'expression du marqueur de myofibroblaste  $\alpha$ -SMA (Sugimoto et al., 2006) en comparaison avec les cellules contrôles traitées au TGF $\beta$  1 (Fig27C). De façon intéressante une étude de 2009 montre que USP9X est un régulateur de la réponse des cellules au TGF $\beta$  via un mécanisme de déubiquitination de SMAD4 (Dupont et al., 2009). Ainsi la modulation de l'expression de USP9X mais aussi la perte de l'induction de  $\alpha$ -SMA dans les fibroblastes normaux de peau pourraient s'expliquer par ce mécanisme d'action. De plus on perd également l'expression protéique de YAP ce qui est consistant avec nos observations dans le mélanome. Enfin la perte de USP9X affecte également la capacité des MAFs à déposer une matrice de fibronectine alignée (Fig27D). Dans les fibroblastes associés au cancer (CAF), l'activité de YAP est nécessaire pour l'induction de la rigidification de la MEC (Calvo et al., 2013). Ainsi le ciblage de USP9X pourrait non seulement empêcher l'installation de résistance mécanodépendante au traitement dans les cellules de mélanome, mais également empêcher l'amplification de ce phénomène de façon YAP dépendante par les CAF via la déposition d'une matrice plus rigide. D'une manière générale, la modulation de l'expression de YAP par USP9X pourrait participer à l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des populations de CAFs (Mhaidly and Mechta-Grigoriou, 2021). Ces résultats montrent que USP9X est un acteur potentiel de l'installation du phénotype CAF dans les fibroblastes normaux. Ils suggèrent également un rôle de la DUB dans la résistance thérapeutique liée à la matrice extracellulaire déposée par les CAF. Ces résultats préliminaires pointent vers un rôle de USP9X dans l'adaptation non autonome des cellules de mélanome au traitement via la modulation de leur microenvironnement en addition de son rôle dans l'adaptation autonome des cellules de mélanome.

# Conclusion

Le mélanome est caractérisé par sa grande agressivité, et surtout sa capacité à résister au traitement. Malgré l'essor des thérapies ciblées et des immunothérapies le mélanome métastatique reste un cancer extrêmement difficile à traiter. Cette forte propension à développer des résistances s'explique par l'hétérogénéité de phénotype des cellules de mélanome retrouvées au sein de la tumeur. Cette plasticité phénotype leur permet de s'adapter rapidement aux contraintes de l'environnement et donc au traitement auxquelles elles sont soumises. Parmi les différents mécanismes d'adaptation existants, notre équipe montre que les inhibiteurs de BRAF et de MEK poussent les cellules à densifier et rigidifier la matrice extracellulaire qui les entourent. Cette rigidité nouvellement acquise de la MEC va générer des contraintes mécaniques avec pour conséquence une activation de la voie de la mécanotransduction YAP dépendante au sein de la cellule de mélanome. En retour cette voie va amplifier le phénotype rigide de la matrice générant une boucle d'amplification qui conduira à la résistance thérapeutique. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés au rôle du système ubiquitine protéasome et plus particulièrement des DUBs au sein de cette boucle.

C'est ainsi que nous avons montré que l'activité de la DUB USP9X est sensible à la rigidité de la matrice. Ensuite nous avons observé que USP9X régule la stabilité de YAP dans les cellules de mélanome en empêchant sa dégradation au niveau du protéasome. Par conséquent USP9X influence également le programme transcriptionnel promu par l'activité de cofacteur de transcription de YAP. On observe donc une diminution de la capacité migratoire des cellules à la fois *in vitro* et *in vivo*. De façon intéressante, nous reproduisons cette observation dans différentes lignées de cancers mécanosensibles. Enfin nous montrons que le ciblage de USP9X semble normaliser le phénotype fibreux induit par l'activité de YAP sous l'action des inhibiteurs de BRAF et de MEK et retarde la rechute.

Des données préliminaires suggèrent également que USP9X, contrôle l'expression de YAP au sein des cellules de fibroblastes associés au mélanome. Son ciblage semble également affecter le phénotype de ces cellules, ce qui fait de USP9X une cible intéressante pour le remodelage matriciel protecteur contrôlé par les CAF dans la pathologie du mélanome.

Ces travaux ont donc permis de mettre pour la première fois en évidence que l'activité de USP9X est induite par la rigidité matricielle permettant la stabilisation de l'oncogène YAP. Cette stabilisation est associée à une plus grande agressivité et résistance des cellules de mélanome. Nous proposons donc que USP9X est une «mécano-DUB » dont le ciblage peut empêcher l'apparition de résistance mécano-induite dans la pathologie du mélanome.



# Bibliographie

- Abdul Rehman, S.A., Kristariyanto, Y.A., Choi, S.-Y., Nkosi, P.J., Weidlich, S., Labib, K., Hofmann, K., Kulathu, Y., 2016. MINDY-1 Is a Member of an Evolutionarily Conserved and Structurally Distinct New Family of Deubiquitinating Enzymes. *Mol Cell* 63, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.009>
- Ad, B., E, S., Ja, J., RI, B., JI, C., Je, G., Kb, K., P, H., Aj, L., Ma, D., 2013. Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. *Cancer* 119. <https://doi.org/10.1002/cncr.28306>
- Akutsu, M., Dikic, I., Bremm, A., 2016. Ubiquitin chain diversity at a glance. *J Cell Sci* 129, 875–880. <https://doi.org/10.1242/jcs.183954>
- Ambroggio, X.I., Rees, D.C., Deshaies, R.J., 2004. JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol* 2, E2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020002>
- Andersen, L.B., Fountain, J.W., Gutmann, D.H., Tarlé, S.A., Glover, T.W., Dracopoli, N.C., Housman, D.E., Collins, F.S., 1993. Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines. *Nat Genet* 3, 118–121. <https://doi.org/10.1038/ng0293-118>
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giullitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., Piccolo, S., 2013. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* 154, 1047–1059. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>
- Arnold, M., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Vaccarella, S., Meheus, F., Cust, A.E., de Vries, E., Whiteman, D.C., Bray, F., 2022. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatol* 158, 495–503. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2022.0160>
- Asparuhova, M.B., Ferralli, J., Chiquet, M., Chiquet-Ehrismann, R., 2011. The transcriptional regulator megakaryoblastic leukemia-1 mediates serum response factor-independent activation of tenascin-C transcription by mechanical stress. *FASEB J* 25, 3477–3488. <https://doi.org/10.1096/fj.11-187310>
- Assoian, R.K., Schwartz, M.A., 2001. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev* 11, 48–53. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(00\)00155-6](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(00)00155-6)
- Bai, X., Flaherty, K.T., 2021. Targeted and immunotherapies in BRAF mutant melanoma: where we stand and what to expect. *Br J Dermatol* 185, 253–262. <https://doi.org/10.1111/bjd.19394>
- Balut, C., Loch, C., Devor, D., 2011. Role of ubiquitylation and USP8-dependent deubiquitylation in the endocytosis and lysosomal targeting of plasma membrane KCa3.1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 3938–48. <https://doi.org/10.1096/fj.11-187005>
- Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D., 2010. Integrins. *Cell Tissue Res* 339, 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Basters, A., Knobloch, K.-P., Fritz, G., 2018. How USP18 deals with ISG15-modified proteins: structural basis for the specificity of the protease. *FEBS J* 285, 1024–1029. <https://doi.org/10.1111/febs.14260>
- Bayer, S.V., Grither, W.R., Brenot, A., Hwang, P.Y., Barcus, C.E., Ernst, M., Pence, P., Walter, C., Pathak, A., Longmore, G.D., 2019. DDR2 controls breast tumor stiffness and metastasis by regulating integrin mediated mechanotransduction in CAFs. *eLife* 8, e45508. <https://doi.org/10.7554/eLife.45508>

- Beaty, B.T., Condeelis, J., 2014. Digging a little deeper: the stages of invadopodium formation and maturation. *Eur J Cell Biol* 93, 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.003>
- Berestjuk, I., Lecacheur, M., Carminati, A., Diazzi, S., Rovera, C., Prod'homme, V., Ohanna, M., Popovic, A., Mallavialle, A., Larbret, F., Pisano, S., Audebert, S., Passeron, T., Gaggioli, C., Girard, C.A., Deckert, M., Tartare-Deckert, S., 2022. Targeting Discoidin Domain Receptors DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated tumor cell adaptation and tolerance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *EMBO Mol Med* 14, e11814. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911814>
- Bi, Y., Cui, D., Xiong, X., Zhao, Y., 2021. The characteristics and roles of  $\beta$ -TrCP1/2 in carcinogenesis. *FEBS J* 288, 3351–3374. <https://doi.org/10.1111/febs.15585>
- Biswas, S.K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., Vago, L., Nebuloni, M., Mantovani, A., Sica, A., 2006. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107, 2112–2122. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0428>
- Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R., Marchlewicz, M., 2016. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postepy Dermatol Alergol* 33, 1–5. <https://doi.org/10.5114/pdia.2015.48037>
- Bonacci, T., Suzuki, A., Grant, G.D., Stanley, N., Cook, J.G., Brown, N.G., Emanuele, M.J., 2018. Cezanne/OTUD7B is a cell cycle-regulated deubiquitinase that antagonizes the degradation of APC/C substrates. *EMBO J* 37, e98701. <https://doi.org/10.15252/embj.201798701>
- Bondareva, A., Downey, C.M., Ayres, F., Liu, W., Boyd, S.K., Hallgrimsson, B., Jirik, F.R., 2009. The lysyl oxidase inhibitor, beta-aminopropionitrile, diminishes the metastatic colonization potential of circulating breast cancer cells. *PLoS One* 4, e5620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005620>
- Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z., 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>
- Borissenko, L., Groll, M., 2007. 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev* 107, 687–717. <https://doi.org/10.1021/cr0502504>
- Bornstein, P., Sage, E.H., 2002. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14, 608–616. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(02\)00361-7](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(02)00361-7)
- 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., Pencheva, N., Mortensen, J.T., Foppen, M.G., Rozeman, E.A., Blank, C.U., Janmaat, M.L., Satijn, D., Breij, E.C.W., Peeper, D.S., Parren, P.W.H.I., 2018. Cooperative targeting of melanoma heterogeneity with an AXL antibody-drug conjugate and BRAF/MEK inhibitors. *Nat Med* 24, 203–212. <https://doi.org/10.1038/nm.4472>
- Boulais, N., Misery, L., 2007. Merkel cells. *J Am Acad Dermatol* 57, 147–165. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.02.009>
- Bremm, A., Moniz, S., Mader, J., Rocha, S., Komander, D., 2014. Cezanne (OTUD7B) regulates HIF-1 $\alpha$  homeostasis in a proteasome-independent manner. *EMBO Rep* 15, 1268–1277. <https://doi.org/10.15252/embr.201438850>
- Broders-Bondon, F., Nguyen Ho-Boulidoires, T.H., Fernandez-Sanchez, M.-E., Farge, E., 2018. Mechanotransduction in tumor progression: The dark side of the force. *J Cell Biol* 217, 1571–1587. <https://doi.org/10.1083/jcb.201701039>

- Brohawn, S.G., Campbell, E.B., MacKinnon, R., 2014. Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K<sup>+</sup> channel. *Nature* 516, 126–130. <https://doi.org/10.1038/nature14013>
- Butcher, D.T., Alliston, T., Weaver, V.M., 2009. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 9, 108–122. <https://doi.org/10.1038/nrc2544>
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R.P., Chaudhry, S.I., Harrington, K., Williamson, P., Moeendarbary, E., Charras, G., Sahai, E., 2013. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* 15, 637–646. <https://doi.org/10.1038/ncb2756>
- Cancer Genome Atlas Network, 2015. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161, 1681–1696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., Lachuer, J., Puisieux, A., Pringle, J.H., Ansieau, S., Tulchinsky, E., 2013. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 24, 466–480. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.018>
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- Cawston, T.E., Young, D.A., 2010. Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell Tissue Res* 339, 221–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0887-6>
- Celià-Terrassa, T., Meca-Cortés, O., Mateo, F., Martínez de Paz, A., Rubio, N., Arnal-Estapé, A., Ell, B.J., Bermudo, R., Díaz, A., Guerra-Rebollo, M., Lozano, J.J., Estarás, C., Ulloa, C., Álvarez-Simón, D., Milà, J., Vilella, R., Paciucci, R., Martínez-Balbás, M., de Herreros, A.G., Gomis, R.R., Kang, Y., Blanco, J., Fernández, P.L., Thomson, T.M., 2012. Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J Clin Invest* 122, 1849–1868. <https://doi.org/10.1172/JCI59218>
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O’Day, S.J., Sosman, J.A., Kirkwood, J.M., Eggermont, A.M.M., Dreno, B., Nolop, K., Li, J., Nelson, B., Hou, J., Lee, R.J., Flaherty, K.T., McArthur, G.A., BRIM-3 Study Group, 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364, 2507–2516. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>
- Cheli, Y., Giuliano, S., Fenouille, N., Allegra, M., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Lacour, J.-P., Tartare-Deckert, S., Bertolotto, C., Ballotti, R., 2012. Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene* 31, 2461–2470. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.425>
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., Tymińska, A., 2013. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol* 30, 30–41. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>
- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A.L., Hershko, A., 1980. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1365–1368. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1365>
- Clague, M.J., Barsukov, I., Coulson, J.M., Liu, H., Rigden, D.J., Urbé, S., 2013. Deubiquitylases from genes to organism. *Physiol Rev* 93, 1289–1315. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2013>

Clark, W.H., From, L., Bernardino, E.A., Mihm, M.C., 1969. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 29, 705–727.

Coelho, N., Arora, P., Van Putten, S., Boo, S., Petrovic, P., Lin, A., Hinz, B., McCulloch, C., 2017. Discoidin Domain Receptor 1 Mediates Myosin-Dependent Collagen Contraction. *Cell Reports* 18, 1774–1790. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.061>

Conic, R.Z., Cabrera, C.I., Khorana, A.A., Gastman, B.R., 2018. Determination of the impact of melanoma surgical timing on survival using the National Cancer Database. *J Am Acad Dermatol* 78, 46-46.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.08.039>

Coon, B.G., Baeyens, N., Han, J., Budatha, M., Ross, T.D., Fang, J.S., Yun, S., Thomas, J.-L., Schwartz, M.A., 2015. Intramembrane binding of VE-cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 assembles the endothelial mechanosensory complex. *J Cell Biol* 208, 975–986. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408103>

Corre, S., Tardif, N., Mouchet, N., Leclair, H.M., Boussemer, L., Gautron, A., Bachelot, L., Perrot, A., Soshilov, A., Rogiers, A., Rambow, F., Dumontet, E., Tarte, K., Bessedé, A., Guillemin, G.J., Marine, J.-C., Denison, M.S., Gilot, D., Galibert, M.-D., 2018. Sustained activation of the Aryl hydrocarbon Receptor transcription factor promotes resistance to BRAF-inhibitors in melanoma. *Nat Commun* 9, 4775. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06951-2>

Cui, D., Dai, X., Shu, J., Ma, Y., Wei, D., Xiong, X., Zhao, Y., 2020. The cross talk of two family members of  $\beta$ -TrCP in the regulation of cell autophagy and growth. *Cell Death Differ* 27, 1119–1133. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0402-x>

Cymerman, R.M., Shao, Y., Wang, K., Zhang, Y., Murzaku, E.C., Penn, L.A., Osman, I., Polsky, D., 2016. De Novo vs Nevus-Associated Melanomas: Differences in Associations With Prognostic Indicators and Survival. *J Natl Cancer Inst* 108. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw121>

Dai, D., Martinka, M., Yang, F., 2005. Prognostic Significance of Activated Akt Expression in Melanoma: A Clinicopathologic Study of 292 Cases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 1473–82. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.07.168>

D’Arcy, P., Linder, S., 2012. Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1729–1738. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.07.011>

D’Arcy, P., Wang, X., Linder, S., 2015. Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 147, 32–54. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.002>

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W.C., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R., Futreal, P.A., 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>

Dedman, A., Sharif-Naeini, R., Folgering, J.H.A., Duprat, F., Patel, A., Honoré, E., 2009. The mechano-gated K(2P) channel TREK-1. *Eur Biophys J* 38, 293–303. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0318-8>

Diazzi, S., Baeri, A., Fassy, J., Lecacheur, M., Marin-Bejar, O., Girard, C.A., Lefevre, L., Lacoux, C., Irondelle, M., Mounier, C., Truchi, M., Couralet, M., Ohanna, M., Carminati, A., Berestjuk, I., Larbret,

- F., Gilot, D., Vassaux, G., Marine, J.-C., Deckert, M., Mari, B., Tartare-Deckert, S., 2022. Blockade of the pro-fibrotic reaction mediated by the miR-143/-145 cluster enhances the responses to targeted therapy in melanoma. *EMBO Mol Med* 14, e15295. <https://doi.org/10.15252/emmm.202115295>
- Didier, R., Mallavialle, A., Ben Jouira, R., Domdom, M.A., Tichet, M., Auberger, P., Luciano, F., Ohanna, M., Tartare-Deckert, S., Deckert, M., 2018. Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Mol Cancer Ther* 17, 1416–1429. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0919>
- Dikic, I., Wakatsuki, S., Walters, K.J., 2009a. Ubiquitin-binding domains — from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 659–671. <https://doi.org/10.1038/nrm2767>
- Dikic, I., Wakatsuki, S., Walters, K.J., 2009b. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 659–671. <https://doi.org/10.1038/nrm2767>
- Dudley, A.C., 2012. Tumor endothelial cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006536. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006536>
- Dummer, R., Ascierto, P.A., Gogas, H.J., Arance, A., Mandalá, M., Liskay, G., Garbe, C., Schadendorf, D., Krajsova, I., Gutzmer, R., Chiarion-Sileni, V., Dutriaux, C., de Groot, J.W.B., Yamazaki, N., Loquai, C., Moutouh-de Parseval, L.A., Pickard, M.D., Sandor, V., Robert, C., Flaherty, K.T., 2018. 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. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30142-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30142-6)
- Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., Martello, G., Stinchfield, M.J., Soligo, S., Morsut, L., Inui, M., Moro, S., Modena, N., Argenton, F., Newfeld, S.J., Piccolo, S., 2009. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFβ signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* 136, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.051>
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., Piccolo, S., 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179–183. <https://doi.org/10.1038/nature10137>
- Eberl, D.F., Hardy, R.W., Kernan, M.J., 2000. Genetically similar transduction mechanisms for touch and hearing in *Drosophila*. *J Neurosci* 20, 5981–5988.
- Edelmann, M.J., Iphöfer, A., Akutsu, M., Altun, M., di Gleria, K., Kramer, H.B., Fiebiger, E., Dhe-Paganon, S., Kessler, B.M., 2009. Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination. *Biochem J* 418, 379–390. <https://doi.org/10.1042/BJ20081318>
- Eggermont, A.M.M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.04.030>
- Erapazoglou, Z., Walker, O., Haguenaer-Tsapis, R., 2014. Versatile roles of k63-linked ubiquitin chains in trafficking. *Cells* 3, 1027–1088. <https://doi.org/10.3390/cells3041027>
- Etienne-Manneville, S., Hall, A., 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629–635. <https://doi.org/10.1038/nature01148>
- Fallahi-Sichani, M., Becker, V., Izar, B., Baker, G.J., Lin, J.-R., Boswell, S.A., Shah, P., Rotem, A., Garraway, L.A., Sorger, P.K., 2017. Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via

reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Mol Syst Biol* 13, 905. <https://doi.org/10.15252/msb.20166796>

Farriol-Mathis, N., Garavelli, J.S., Boeckmann, B., Duvaud, S., Gasteiger, E., Gateau, A., Veuthey, A.-L., Bairoch, A., 2004. Annotation of post-translational modifications in the Swiss-Prot knowledge base. *Proteomics* 4, 1537–1550. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300764>

Fedorenko, I.V., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., Messina, J.L., Smalley, K.S.M., 2015. BRAF Inhibition Generates a Host-Tumor Niche that Mediates Therapeutic Escape. *J Invest Dermatol* 135, 3115–3124. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.329>

Fei, C., Li, Z., Li, C., Chen, Y., Chen, Z., He, X., Mao, L., Wang, X., Zeng, R., Li, L., 2013. Smurf1-mediated Lys29-linked nonproteolytic polyubiquitination of axin negatively regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Mol Cell Biol* 33, 4095–4105. <https://doi.org/10.1128/MCB.00418-13>

Finley, D., 2009. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 477–513. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607>

Finn, L., Markovic, S.N., Joseph, R.W., 2012. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Medicine* 10, 23. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-23>

Flach, E.H., Rebecca, V.W., Herlyn, M., Smalley, K.S.M., Anderson, A.R.A., 2011. Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. *Mol Pharm* 8, 2039–2049. <https://doi.org/10.1021/mp200421k>

Flaherty, K.T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L.V., Hassel, J.C., Rutkowski, P., Mohr, P., Dummer, R., Trefzer, U., Larkin, J.M.G., Utikal, J., Dreno, B., Nyakas, M., Middleton, M.R., Becker, J.C., Casey, M., Sherman, L.J., Wu, F.S., Ouellet, D., Martin, A.-M., Patel, K., Schadendorf, D., METRIC Study Group, 2012. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 367, 107–114. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203421>

Förster, A., Masters, E.I., Whitby, F.G., Robinson, H., Hill, C.P., 2005. The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol Cell* 18, 589–599. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.016>

Foster, C.T., Gualdrini, F., Treisman, R., 2017. Mutual dependence of the MRTF-SRF and YAP-TEAD pathways in cancer-associated fibroblasts is indirect and mediated by cytoskeletal dynamics. *Genes Dev* 31, 2361–2375. <https://doi.org/10.1101/gad.304501.117>

Frantz, C., Stewart, K.M., Weaver, V.M., 2010. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science* 123, 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>

Frassanito, M.A., Cusmai, A., Iodice, G., Dammacco, F., 2001. Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* 97, 483–489. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.2.483>

Fu, H.-L., Valiathan, R.R., Arkwright, R., Sohail, A., Mihai, C., Kumarasiri, M., Mahasenan, K.V., Mobashery, S., Huang, P., Agarwal, G., Fridman, R., 2013. Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling. *J Biol Chem* 288, 7430–7437. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.444158>

Furue, M., Ito, T., Wada, N., Wada, M., Kadono, T., Uchi, H., 2018. Melanoma and Immune Checkpoint Inhibitors. *Curr Oncol Rep* 20, 29. <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0676-z>

- Gao, L., Zhu, D., Wang, Q., Bao, Z., Yin, S., Qiang, H., Wieland, H., Zhang, J., Teichmann, A., Jia, J., 2021. Proteome Analysis of USP7 Substrates Revealed Its Role in Melanoma Through PI3K/Akt/FOXO and AMPK Pathways. *Front Oncol* 11, 650165. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.650165>
- Garg, P., Yang, S., Liu, A., Pallero, M.A., Buchsbaum, D.J., Mosher, D.F., Murphy-Ullrich, J.E., Goldblum, S.E., 2011. Thrombospondin-1 opens the paracellular pathway in pulmonary microvascular endothelia through EGFR/ErbB2 activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301, L79-90. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00287.2010>
- Gatti, M., Pinato, S., Maiolica, A., Rocchio, F., Prato, M.G., Aebbersold, R., Penengo, L., 2015. RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage. *Cell Rep* 10, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.021>
- Gautron, A., Bachelot, L., Aubry, M., Leclerc, D., Quémener, A.M., Corre, S., Rambow, F., Paris, A., Tardif, N., Leclair, H.M., Marin-Bejar, O., Coulouarn, C., Marine, J.-C., Galibert, M.-D., Gilot, D., 2021. CRISPR screens identify tumor-promoting genes conferring melanoma cell plasticity and resistance. *EMBO Mol Med* 13, e13466. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013466>
- Geiss-Friedlander, R., Melchior, F., 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 947–956. <https://doi.org/10.1038/nrm2293>
- Girard, C.A., Lecacheur, M., Ben Jouira, R., Berestjuk, I., Diazzi, S., Prod'homme, V., Mallavialle, A., Larbret, F., Gesson, M., Schaub, S., Pisano, S., Audebert, S., Mari, B., Gaggioli, C., Leucci, E., Marine, J.-C., Deckert, M., Tartare-Deckert, S., 2020. A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma. *Cancer Res* 80, 1927–1941. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2914>
- Glickman, M.H., Ciechanover, A., 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373–428. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2001>
- Goldberg, A.L., Cascio, P., Saric, T., Rock, K.L., 2002. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39, 147–164. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(02\)00098-6](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(02)00098-6)
- Gorantla, V.C., Kirkwood, J.M., 2014. State of melanoma: an historic overview of a field in transition. *Hematol Oncol Clin North Am* 28, 415–435. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2014.02.010>
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., Finley, D., 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7, 1062–1067. <https://doi.org/10.1038/80992>
- Grou, C.P., Pinto, M.P., Mendes, A.V., Domingues, P., Azevedo, J.E., 2015. The de novo synthesis of ubiquitin: identification of deubiquitinases acting on ubiquitin precursors. *Sci Rep* 5, 12836. <https://doi.org/10.1038/srep12836>
- Gutzmer, R., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Robert, C., Lewis, K., Protsenko, S., Pereira, R.P., Eigentler, T., Rutkowski, P., Demidov, L., Manikhas, G.M., Yan, Y., Huang, K.-C., Uyei, A., McNally, V., McArthur, G.A., Ascierto, P.A., 2020. Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAFV600 mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 395, 1835–1844. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30934-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30934-X)



- Haage, A., Schneider, I.C., 2014. Cellular contractility and extracellular matrix stiffness regulate matrix metalloproteinase activity in pancreatic cancer cells. *FASEB J* 28, 3589–3599. <https://doi.org/10.1096/fj.13-245613>
- Haas, L., Elewaut, A., Gerard, C.L., Umkehrer, C., Leiendecker, L., Pedersen, M., Krecioch, I., Hoffmann, D., Novatchkova, M., Kuttke, M., Neumann, T., da Silva, I.P., Witthock, H., Cuendet, M.A., Carotta, S., Harrington, K.J., Zuber, J., Scolyer, R.A., Long, G.V., Wilmott, J.S., Michielin, O., Vanharanta, S., Wiesner, T., Obenauf, A.C., 2021. Acquired resistance to anti-MAPK targeted therapy confers an immune-evasive tumor microenvironment and cross-resistance to immunotherapy in melanoma. *Nat Cancer* 2, 693–708. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00221-9>
- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., Dikic, I., 2003. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5, 461–466. <https://doi.org/10.1038/ncb983>
- Halder, G., Johnson, R.L., 2011. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 138, 9–22. <https://doi.org/10.1242/dev.045500>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hartman, M.A., Spudich, J.A., 2012. The myosin superfamily at a glance. *J Cell Sci* 125, 1627–1632. <https://doi.org/10.1242/jcs.094300>
- Hartmann, T.N., Burger, J.A., Glodek, A., Fujii, N., Burger, M., 2005. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* 24, 4462–4471. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208621>
- Hauschild, A., Grob, J.-J., Demidov, L.V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Miller, W.H., Kaempgen, E., Martín-Algarra, S., Karaszewska, B., Mauch, C., Chiarion-Sileni, V., Martin, A.-M., Swann, S., Haney, P., Mirakhur, B., Guckert, M.E., Goodman, V., Chapman, P.B., 2012. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 380, 358–365. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60868-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60868-X)
- Hearing, V.J., 2011. Determination of melanin synthetic pathways. *J Invest Dermatol* 131, E8–E11. <https://doi.org/10.1038/skinbio.2011.4>
- Hicke, L., Schubert, H.L., Hill, C.P., 2005. Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 610–621. <https://doi.org/10.1038/nrm1701>
- Hirata, E., Girotti, M.R., Viros, A., Hooper, S., Spencer-Dene, B., Matsuda, M., Larkin, J., Marais, R., Sahai, E., 2015. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin  $\beta$ 1/FAK signaling. *Cancer Cell* 27, 574–588. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.008>
- Hochstrasser, M., 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458, 422–429. <https://doi.org/10.1038/nature07958>
- 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., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J.M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A., Urba, W.J., 2010. Improved survival with

- ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363, 711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., Jentsch, S., 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135–141. <https://doi.org/10.1038/nature00991>
- Hoek, K.S., Schlegel, N.C., Brafford, P., Sucker, A., Ugurel, S., Kumar, R., Weber, B.L., Nathanson, K.L., Phillips, D.J., Herlyn, M., Schadendorf, D., Dummer, R., 2006. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* 19, 290–302. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00322.x>
- Homan, C.C., Kumar, R., Nguyen, L.S., Haan, E., Raymond, F.L., Abidi, F., Raynaud, M., Schwartz, C.E., Wood, S.A., Gecz, J., Jolly, L.A., 2014. Mutations in USP9X are associated with X-linked intellectual disability and disrupt neuronal cell migration and growth. *Am J Hum Genet* 94, 470–478. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.02.004>
- Hu, M., Li, P., Li, M., Li, W., Yao, T., Wu, J.-W., Gu, W., Cohen, R.E., Shi, Y., 2002. Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell* 111, 1041–1054. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01199-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01199-6)
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., Pan, D., 2005. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell* 122, 421–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.007>
- Huang, W., Lv, X., Liu, C., Zha, Z., Zhang, H., Jiang, Y., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., Guan, K.-L., 2012. The N-terminal phosphodegron targets TAZ/WWTR1 protein for SCF $\beta$ -TrCP-dependent degradation in response to phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. *J Biol Chem* 287, 26245–26253. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.382036>
- Hugo, W., Shi, H., Sun, L., Piva, M., Song, C., Kong, X., Moriceau, G., Hong, A., Dahlman, K.B., Johnson, D.B., Sosman, J.A., Ribas, A., Lo, R.S., 2015. Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell* 162, 1271–1285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.061>
- Hugo, W., Zaretsky, J.M., Sun, L., Song, C., Moreno, B.H., Hu-Lieskovan, S., Berent-Maoz, B., Pang, J., Chmielowski, B., Cherry, G., Seja, E., Lomeli, S., Kong, X., Kelley, M.C., Sosman, J.A., Johnson, D.B., Ribas, A., Lo, R.S., 2017. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* 168, 542. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.010>
- Humphrey, J.D., Dufresne, E.R., Schwartz, M.A., 2014. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 802–812. <https://doi.org/10.1038/nrm3896>
- Hynes, R.O., 2009. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* 326, 1216–1219. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00971-6)
- Ingallina, E., Sorrentino, G., Bertolio, R., Lisek, K., Zannini, A., Azzolin, L., Severino, L.U., Scaini, D., Mano, M., Mantovani, F., Rosato, A., Bicciato, S., Piccolo, S., Del Sal, G., 2018. Mechanical cues control mutant p53 stability through a mevalonate-RhoA axis. *Nat Cell Biol* 20, 28–35. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0009-8>

- Iwai, L.K., Payne, L.S., Luczynski, M.T., Chang, F., Xu, H., Clinton, R.W., Paul, A., Esposito, E.A., Gridley, S., Leitinger, B., Naegle, K.M., Huang, P.H., 2013. Phosphoproteomics of collagen receptor networks reveals SHP-2 phosphorylation downstream of wild-type DDR2 and its lung cancer mutants. *Biochem J* 454, 501–513. <https://doi.org/10.1042/BJ20121750>
- Iyer, K.V., Pulford, S., Mogilner, A., Shivashankar, G.V., 2012. Mechanical activation of cells induces chromatin remodeling preceding MKL nuclear transport. *Biophys J* 103, 1416–1428. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.08.041>
- Izbicki, G., Segel, M.J., Christensen, T.G., Conner, M.W., Breuer, R., 2002. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 83, 111–119. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2002.00220.x>
- Jin, P., Jan, L.Y., Jan, Y.-N., 2020. Mechanosensitive Ion Channels: Structural Features Relevant to Mechanotransduction Mechanisms. *Annual Review of Neuroscience* 43, 207–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050509>
- 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., Caponigro, G., Hieronymus, H., Murray, R.R., Salehi-Ashtiani, K., Hill, D.E., Vidal, M., Zhao, J.J., Yang, X., Alkan, O., Kim, S., Harris, J.L., Wilson, C.J., Myer, V.E., Finan, P.M., Root, D.E., Roberts, T.M., Golub, T., Flaherty, K.T., Dummer, R., Weber, B.L., Sellers, W.R., Schlegel, R., Wargo, J.A., Hahn, W.C., Garraway, L.A., 2010. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 468, 968–972. <https://doi.org/10.1038/nature09627>
- Johnson, R., Halder, G., 2014. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* 13, 63–79. <https://doi.org/10.1038/nrd4161>
- Johnston, S.C., Larsen, C.N., Cook, W.J., Wilkinson, K.D., Hill, C.P., 1997. Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution. *EMBO J* 16, 3787–3796. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3787>
- Joyce, M.H., Lu, C., James, E.R., Hegab, R., Allen, S.C., Suggs, L.J., Brock, A., 2018. Phenotypic Basis for Matrix Stiffness-Dependent Chemoresistance of Breast Cancer Cells to Doxorubicin. *Frontiers in Oncology* 8.
- Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., Boot-Handford, R.P., 2007. Collagens at a glance. *J Cell Sci* 120, 1955–1958. <https://doi.org/10.1242/jcs.03453>
- Kalluri, R., 2016. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 16, 582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>
- Kannan, K., Sharpless, N.E., Xu, J., O’Hagan, R.C., Bosenberg, M., Chin, L., 2003. Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1221–1225. <https://doi.org/10.1073/pnas.0336397100>
- Kapadia, B., Nanaji, N.M., Bhalla, K., Bhandary, B., Lapidus, R., Beheshti, A., Evens, A.M., Gartenhaus, R.B., 2018. Fatty Acid Synthase induced S6Kinase facilitates USP11-eIF4B complex formation for sustained oncogenic translation in DLBCL. *Nat Commun* 9, 829. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03028-y>
- Karakashev, S.V., Reginato, M.J., 2015. Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy. *Cancer Manag Res* 7, 253–264. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S58285>

- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8, 221–228. <https://doi.org/10.1038/ng1194-221>
- Ke, H., Augustine, C.K., Gandham, V.D., Jin, J.Y., Tyler, D.S., Akiyama, S.K., Hall, R.P., Zhang, J.Y., 2013. CYLD inhibits melanoma growth and progression through suppression of the JNK/AP-1 and  $\beta$ 1-integrin signaling pathways. *J Invest Dermatol* 133, 221–229. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.253>
- Keely, P.J., 2011. Mechanisms by which the extracellular matrix and integrin signaling act to regulate the switch between tumor suppression and tumor promotion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16, 205–219. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9226-0>
- Khoronenkova, S.V., Dianov, G.L., 2012. Regulation of USP7/HAUSP in response to DNA damage: yet another role for ATM. *Cell Cycle* 11, 2409–2410. <https://doi.org/10.4161/cc.20800>
- Kim, Miju, Kim, Minchul, Park, S.-J., Lee, C., Lim, D.-S., 2016. Role of Angiomotin-like 2 mono-ubiquitination on YAP inhibition. *EMBO Rep* 17, 64–78. <https://doi.org/10.15252/embr.201540809>
- Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., Harper, J.W., Gygi, S.P., 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell* 44, 325–340. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.025>
- Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., Iwai, K., 2006. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J* 25, 4877–4887. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601360>
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., Goldberg, A.L., 1999. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 274, 3363–3371. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3363>
- Komander, D., Clague, M.J., Urbé, S., 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 550–563. <https://doi.org/10.1038/nrm2731>
- Komander, D., Rape, M., 2012. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81, 203–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060310-170328>
- Koontongkaew, S., 2013. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer* 4, 66–83. <https://doi.org/10.7150/jca.5112>
- Kozar, I., Margue, C., Rothengatter, S., Haan, C., Kreis, S., 2019. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1871, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.02.002>
- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., Peter, M., 2008. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol* 10, 602–610. <https://doi.org/10.1038/ncb1723>
- Kwasna, D., Abdul Rehman, S.A., Natarajan, J., Matthews, S., Madden, R., De Cesare, V., Weidlich, S., Virdee, S., Ahel, I., Gibbs-Seymour, I., Kulathu, Y., 2018. Discovery and Characterization of ZUFSP/ZUP1, a Distinct Deubiquitinase Class Important for Genome Stability. *Mol Cell* 70, 150–164.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.023>

- Laurent, T.C., Fraser, J.R.E., 1992. Hyaluronan1. *The FASEB Journal* 6, 2397–2404. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.7.1563592>
- LeBlanc, L., Ramirez, N., Kim, J., 2021. Context-dependent roles of YAP/TAZ in stem cell fates and cancer. *Cell Mol Life Sci* 78, 4201–4219. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03781-2>
- Lee, C., Prakash, S., Matouschek, A., 2002. Concurrent translocation of multiple polypeptide chains through the proteasomal degradation channel. *J Biol Chem* 277, 34760–34765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204750200>
- Lee, K., Florens, L., Swanson, S., Washburn, M., Workman, J., 2005. The Deubiquitylation Activity of Ubp8 Is Dependent upon Sgf11 and Its Association with the SAGA Complex. *Molecular and cellular biology* 25, 1173–82. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.1173-1182.2005>
- Lehoux, S., Lemarié, C.A., Esposito, B., Lijnen, H.R., Tedgui, A., 2004. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* 109, 1041–1047. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000115521.95662.7A>
- Lei, Q.-Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.-Y., Bai, F., Pei, X.-H., Zhao, S., Xiong, Y., Guan, K.-L., 2008. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol Cell Biol* 28, 2426–2436. <https://doi.org/10.1128/MCB.01874-07>
- Leight, J.L., Wozniak, M.A., Chen, S., Lynch, M.L., Chen, C.S., 2012. Matrix rigidity regulates a switch between TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 23, 781–791. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0537>
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Wenginger, W., Yamauchi, M., Gasser, D.L., Weaver, V.M., 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>
- Li, L., Liu, T., Li, Y., Wu, C., Luo, K., Yin, Y., Chen, Y., Nowsheen, S., Wu, J., Lou, Z., Yuan, J., 2018. The deubiquitinase USP9X promotes tumor cell survival and confers chemoresistance through YAP1 stabilization. *Oncogene* 37, 2422–2431. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0134-2>
- Li, Y., Fanous, M.J., Kilian, K.A., Popescu, G., 2019. Quantitative phase imaging reveals matrix stiffness-dependent growth and migration of cancer cells. *Sci Rep* 9, 248. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36551-5>
- Li, Y., Reverter, D., 2021. Molecular Mechanisms of DUBs Regulation in Signaling and Disease. *Int J Mol Sci* 22, 986. <https://doi.org/10.3390/ijms22030986>
- Li, Z., Cheng, Z., Ragothama, C., Cui, Z., Liu, K., Li, X., Jiang, C., Jiang, W., Tan, M., Ni, X., Pandey, A., Liu, J.O., Dang, Y., 2018. USP9X controls translation efficiency via deubiquitination of eukaryotic translation initiation factor 4A1. *Nucleic Acids Res* 46, 823–839. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1226>
- Liu, J., Fukunaga-Kalabis, M., Li, L., Herlyn, M., 2014. Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. *Arch Biochem Biophys* 563, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.023>
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., Zhao, J.J., 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8, 627–644. <https://doi.org/10.1038/nrd2926>

- Long, G.V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., Grob, J.-J., Chiarion-Sileni, V., Lebbe, C., Mandalà, M., Millward, M., Arance, A., Bondarenko, I., Haanen, J.B.A.G., Hansson, J., Utikal, J., Ferraresi, V., Kovalenko, N., Mohr, P., Probachai, V., Schadendorf, D., Nathan, P., Robert, C., Ribas, A., DeMarini, D.J., Irani, J.G., Swann, S., Legos, J.J., Jin, F., Mookerjee, B., Flaherty, K., 2015. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 386, 444–451. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60898-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60898-4)
- Lu, P., Weaver, V.M., Werb, Z., 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 196, 395–406. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>
- Madhunapantula, S.V., Mosca, P.J., Robertson, G.P., 2011. The Akt signaling pathway: an emerging therapeutic target in malignant melanoma. *Cancer Biol Ther* 12, 1032–1049. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.12.18442>
- Maier, S., Lutz, R., Gelman, L., Sarasa-Renedo, A., Schenk, S., Grashoff, C., Chiquet, M., 2008. Tenascin-C induction by cyclic strain requires integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1150–1162. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.013>
- Martin, A.C., Gelbart, M., Fernandez-Gonzalez, R., Kaschube, M., Wieschaus, E.F., 2010. Integration of contractile forces during tissue invagination. *J Cell Biol* 188, 735–749. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910099>
- Mason, B.N., Starchenko, A., Williams, R.M., Bonassar, L.J., Reinhart-King, C.A., 2013. Tuning three-dimensional collagen matrix stiffness independently of collagen concentration modulates endothelial cell behavior. *Acta Biomater* 9, 4635–4644. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.007>
- Masoomian, B., Shields, J.A., Shields, C.L., 2018. Overview of BAP1 cancer predisposition syndrome and the relationship to uveal melanoma. *J Curr Ophthalmol* 30, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.joco.2018.02.005>
- Massella, D., Argenziano, M., Ferri, A., Guan, J., Giraud, S., Cavalli, R., Barresi, A.A., Salaün, F., 2019. Bio-Functional Textiles: Combining Pharmaceutical Nanocarriers with Fibrous Materials for Innovative Dermatological Therapies. *Pharmaceutics* 11. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080403>
- Massoumi, R., Kuphal, S., Hellerbrand, C., Haas, B., Wild, P., Spruss, T., Pfeifer, A., Fässler, R., Bosserhoff, A.K., 2009. Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J Exp Med* 206, 221–232. <https://doi.org/10.1084/jem.20082044>
- Matsumoto, M.L., Wickliffe, K.E., Dong, K.C., Yu, C., Bosanac, I., Bustos, D., Phu, L., Kirkpatrick, D.S., Hymowitz, S.G., Rape, M., Kelley, R.F., Dixit, V.M., 2010. K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Mol Cell* 39, 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.001>
- Maurer, T., Wertz, I.E., 2016. Length Matters: MINDY Is a New Deubiquitinase Family that Preferentially Cleaves Long Polyubiquitin Chains. *Mol Cell* 63, 4–6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.027>
- McArthur, G.A., Chapman, P.B., Robert, C., Larkin, J., Haanen, J.B., Dummer, R., Ribas, A., Hogg, D., Hamid, O., Ascierto, P.A., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Lorigan, P., Lebbé, C., Jouary, T., Schadendorf, D., O'Day, S.J., Kirkwood, J.M., Eggermont, A.M., Dréno, B., Sosman, J.A., Flaherty, K.T., Yin, M., Caro, I., Cheng, S., Trunzer, K., Hauschild, A., 2014. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol* 15, 323–332. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70012-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70012-9)

- Metzger, M.B., Hristova, V.A., Weissman, A.M., 2012. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* 125, 531–537. <https://doi.org/10.1242/jcs.091777>
- Mevissen, T.E.T., Hospenthal, M.K., Geurink, P.P., Elliott, P.R., Akutsu, M., Arnaudo, N., Ekkebus, R., Kulathu, Y., Wauer, T., El Oualid, F., Freund, S.M.V., Ovaa, H., Komander, D., 2013. OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis. *Cell* 154, 169–184. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.046>
- Mevissen, T.E.T., Komander, D., 2017. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 159–192. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044916>
- Meyaard, L., 2008. The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *J Leukoc Biol* 83, 799–803. <https://doi.org/10.1189/jlb.0907609>
- Mhaidly, R., Mechta-Grigoriou, F., 2021. Role of cancer-associated fibroblast subpopulations in immune infiltration, as a new means of treatment in cancer. *Immunol Rev* 302, 259–272. <https://doi.org/10.1111/imr.12978>
- Miller, A.J., Mihm, M.C., 2006. Melanoma. *N Engl J Med* 355, 51–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052166>
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., Treisman, R., 2003. Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL. *Cell* 113, 329–342. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00278-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00278-2)
- Miranda, M.Z., Bialik, J.F., Speight, P., Dan, Q., Yeung, T., Szászi, K., Pedersen, S.F., Kapus, A., 2017. TGF- $\beta$ 1 regulates the expression and transcriptional activity of TAZ protein via a Smad3-independent, myocardin-related transcription factor-mediated mechanism. *J Biol Chem* 292, 14902–14920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780502>
- Miskolczi, Z., Smith, M.P., Rowling, E.J., Ferguson, J., Barriuso, J., Wellbrock, C., 2018. Collagen abundance controls melanoma phenotypes through lineage-specific microenvironment sensing. *Oncogene* 37, 3166–3182. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0209-0>
- Moriceau, G., Hugo, W., Hong, A., Shi, H., Kong, X., Yu, C.C., Koya, R.C., Samatar, A.A., Khanlou, N., Braun, J., Ruchalski, K., Seifert, H., Larkin, J., Dahlman, K.B., Johnson, D.B., Algazi, A., Sosman, J.A., Ribas, A., Lo, R.S., 2015. Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. *Cancer Cell* 27, 240–256. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.018>
- Moroishi, T., Park, H.W., Qin, B., Chen, Q., Meng, Z., Plouffe, S.W., Taniguchi, K., Yu, F.-X., Karin, M., Pan, D., Guan, K.-L., 2015. A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes Dev* 29, 1271–1284. <https://doi.org/10.1101/gad.262816.115>
- Moulleron, S., Guettler, S., Langer, C.A., Treisman, R., McDonald, N.Q., 2008. Molecular basis for G-actin binding to RPEL motifs from the serum response factor coactivator MAL. *The EMBO Journal* 27, 3198–3208. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.235>
- Mouw, J.K., Ou, G., Weaver, V.M., 2014. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 771–785. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>
- Muehlich, S., Wang, R., Lee, S.-M., Lewis, T.C., Dai, C., Prywes, R., 2008. Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated

- kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Mol Cell Biol* 28, 6302–6313. <https://doi.org/10.1128/MCB.00427-08>
- Mueller, T.D., Feigon, J., 2003. Structural determinants for the binding of ubiquitin-like domains to the proteasome. *EMBO J* 22, 4634–4645. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg467>
- 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., Kemper, K., Goding, C.R., McDermott, U., Blank, C., Haanen, J., Graeber, T.G., Ribas, A., Lo, R.S., Peeper, D.S., 2014. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 5, 5712. <https://doi.org/10.1038/ncomms6712>
- Murphy-Ullrich, J.E., Sage, E.H., 2014. Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol* 37, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.07.005>
- Nakatsu, F., Sakuma, M., Matsuo, Y., Arase, H., Yamasaki, S., Nakamura, N., Saito, T., Ohno, H., 2000. A Di-leucine signal in the ubiquitin moiety. Possible involvement in ubiquitination-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 275, 26213–26219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M907720199>
- Nallet-Staub, F., Marsaud, V., Li, L., Gilbert, C., Dodier, S., Bataille, V., Sudol, M., Herlyn, M., Mauviel, A., 2014. Pro-invasive activity of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 134, 123–132. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.319>
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.-K., Attar, N., Sazegar, H., Chodon, T., Nelson, S.F., McArthur, G., Sosman, J.A., Ribas, A., Lo, R.S., 2010. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973–977. <https://doi.org/10.1038/nature09626>
- Nijman, S.M.B., Luna-Vargas, M.P.A., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M.G., Sixma, T.K., Bernards, R., 2005. A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes. *Cell* 123, 773–786. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.007>
- O'Connor, R.S., Hao, X., Shen, K., Bashour, K., Akimova, T., Hancock, W.W., Kam, L.C., Milone, M.C., 2012. Substrate rigidity regulates human T cell activation and proliferation. *J Immunol* 189, 1330–1339. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102757>
- Ohanna, M., Biber, P., Deckert, M., 2022. Emerging Role of Deubiquitinating Enzymes (DUBs) in Melanoma Pathogenesis. *Cancers (Basel)* 14, 3371. <https://doi.org/10.3390/cancers14143371>
- Orgaz, J.L., Crosas-Molist, E., Sadok, A., Perdrix-Rosell, A., Maiques, O., Rodriguez-Hernandez, I., Monger, J., Mele, S., Georgouli, M., Bridgeman, V., Karagiannis, P., Lee, R., Pandya, P., Boehme, L., Wallberg, F., Tape, C., Karagiannis, S.N., Malanchi, I., Sanz-Moreno, V., 2020. Myosin II Reactivation and Cytoskeletal Remodeling as a Hallmark and a Vulnerability in Melanoma Therapy Resistance. *Cancer Cell* 37, 85-103.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.12.003>
- Pan, D., 2010. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* 19, 491–505. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011>
- Panciera, T., Azzolin, L., Cordenonsi, M., Piccolo, S., 2017. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 758–770. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.87>
- Panciera, T., Citron, A., Di Biagio, D., Battilana, G., Gandin, A., Giulitti, S., Forcato, M., Bicciato, S., Panzetta, V., Fusco, S., Azzolin, L., Totaro, A., Dei Tos, A.P., Fassan, M., Vindigni, V., Bassetto, F., Rosato, A., Brusatin, G., Cordenonsi, M., Piccolo, S., 2020. Reprogramming normal cells into tumour precursors



requires ECM stiffness and oncogene-mediated changes of cell mechanical properties. *Nat Mater* 19, 797–806. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0615-x>

Pankov, R., Yamada, K.M., 2002. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* 115, 3861–3863. <https://doi.org/10.1242/jcs.00059>

Paraiso, K.H.T., Xiang, Y., Rebecca, V.W., Abel, E.V., Chen, Y.A., Munko, A.C., Wood, E., Fedorenko, I.V., Sondak, V.K., Anderson, A.R.A., Ribas, A., Palma, M.D., Nathanson, K.L., Koomen, J.M., Messina, J.L., Smalley, K.S.M., 2011. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res* 71, 2750–2760. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2954>

Parekh, A., Ruppender, N.S., Branch, K.M., Sewell-Loftin, M.K., Lin, J., Boyer, P.D., Candiello, J.E., Merryman, W.D., Guelcher, S.A., Weaver, A.M., 2011. Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophys J* 100, 573–582. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.3733>

Parsons, J.L., Dianova, I.I., Khoronenkova, S.V., Edelman, M.J., Kessler, B.M., Dianov, G.L., 2011. USP47 is a deubiquitylating enzyme that regulates base excision repair by controlling steady-state levels of DNA polymerase  $\beta$ . *Mol Cell* 41, 609–615. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.016>

Payne, S.L., Hendrix, M.J.C., Kirschmann, D.A., 2007. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer—a prospect. *J Cell Biochem* 101, 1338–1354. <https://doi.org/10.1002/jcb.21371>

Perri, R.T., Kay, N.E., McCarthy, J., Vessella, R.L., Jacob, H.S., Furcht, L.T., 1982. Fibronectin enhances in vitro monocyte-macrophage-mediated tumoricidal activity. *Blood* 60, 430–435.

Piccolo, S., Dupont, S., Cordenonsi, M., 2014. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev* 94, 1287–1312. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014>

Pickart, C.M., Eddins, M.J., 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695, 55–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.019>

Pickart, C.M., Fushman, D., 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8, 610–616. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.09.009>

Pickup, M.W., Mouw, J.K., Weaver, V.M., 2014. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 15, 1243–1253. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>

Platz, A., Egyhazi, S., Ringborg, U., Hansson, J., 2008. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol* 1, 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.12.003>

Pollard, T.D., Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00120-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00120-x)

Potu, H., Kandarpa, M., Peterson, L.F., Durham, A., Donato, N.J., Talpaz, M., 2021. Downregulation of SOX2 by inhibition of Usp9X induces apoptosis in melanoma. *Oncotarget* 12, 160–172. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27869>

Potu, H., Peterson, L.F., Kandarpa, M., Pal, A., Sun, H., Durham, A., Harms, P.W., Hollenhorst, P.C., Eskiocak, U., Talpaz, M., Donato, N.J., 2017. Usp9x regulates Ets-1 ubiquitination and stability to control NRAS expression and tumorigenicity in melanoma. *Nat Commun* 8, 14449. <https://doi.org/10.1038/ncomms14449>

- Potu, H., Peterson, L.F., Pal, A., Verhaegen, M., Cao, J., Talpaz, M., Donato, N.J., 2014. Usp5 links suppression of p53 and FAS levels in melanoma to the BRAF pathway. *Oncotarget* 5, 5559–5569. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2140>
- Poulikakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., Salton, M., Dahlman, K.B., Tadi, M., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., Kelley, M.C., Misteli, T., Chapman, P.B., Sosman, J.A., Graeber, T.G., Ribas, A., Lo, R.S., Rosen, N., Solit, D.B., 2011. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480, 387–390. <https://doi.org/10.1038/nature10662>
- Provenzano, P.P., Keely, P.J., 2011. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. *J Cell Sci* 124, 1195–1205. <https://doi.org/10.1242/jcs.067009>
- Py, B.F., Kim, M.-S., Vakifahmetoglu-Norberg, H., Yuan, J., 2013. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol Cell* 49, 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.009>
- Pylayeva, Y., Gillen, K.M., Gerald, W., Beggs, H.E., Reichardt, L.F., Giancotti, F.G., 2009. Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* 119, 252–266. <https://doi.org/10.1172/JCI37160>
- Rambow, F., Rogiers, A., Marin-Bejar, O., Aibar, S., Femel, J., Dewaele, M., Karras, P., Brown, D., Chang, Y.H., Debiec-Rychter, M., Adriaens, C., Radaelli, E., Wolter, P., Bechter, O., Dummer, R., Levesque, M., Piris, A., Frederick, D.T., Boland, G., Flaherty, K.T., van den Oord, J., Voet, T., Aerts, S., Lund, A.W., Marine, J.-C., 2018. Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* 174, 843–855.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.025>
- Ramos, A., Camargo, F.D., 2012. The Hippo signaling pathway and stem cell biology. *Trends Cell Biol* 22, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.04.006>
- Rane, S.G., Cosenza, S.C., Mettus, R.V., Reddy, E.P., 2002. Germ line transmission of the Cdk4(R24C) mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. *Mol Cell Biol* 22, 644–656. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.2.644-656.2002>
- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C.R., Alaibac, M., 2014. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo* 28, 1005–1011.
- Rathore, M., Girard, C., Ohanna, M., Tichet, M., Ben Jouira, R., Garcia, E., Larbret, F., Gesson, M., Audebert, S., Lacour, J.-P., Montaudié, H., Prod'Homme, V., Tartare-Deckert, S., Deckert, M., 2019. Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-κB signaling pathway. *Oncogene* 38, 5873–5889. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0848-9>
- Read, J., Wadt, K.A.W., Hayward, N.K., 2016. Melanoma genetics. *J Med Genet* 53, 1–14. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103150>
- Renatus, M., Parrado, S.G., D'Arcy, A., Eidhoff, U., Gerhartz, B., Hassiepen, U., Pierrat, B., Riedl, R., Vinzenz, D., Worpenberg, S., Kroemer, M., 2006. Structural basis of ubiquitin recognition by the deubiquitinating protease USP2. *Structure* 14, 1293–1302. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.06.012>

- Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., Wilkinson, K.D., 2009. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78, 363–397. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526>
- Rice, A.J., Cortes, E., Lachowski, D., Cheung, B.C.H., Karim, S.A., Morton, J.P., Del Río Hernández, A., 2017. Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* 6, e352. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.54>
- Ridley, A.J., Whiteside, J.R., McMillan, T.J., Allinson, S.L., 2009. Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *Int J Radiat Biol* 85, 177–195. <https://doi.org/10.1080/09553000902740150>
- Robert, C., Schachter, J., Long, G.V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., Larkin, J., Lorigan, P., Neyns, B., Blank, C.U., Hamid, O., Mateus, C., Shapira-Frommer, R., Kosh, M., Zhou, H., Ibrahim, N., Ebbinghaus, S., Ribas, A., KEYNOTE-006 investigators, 2015. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 372, 2521–2532. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503093>
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L., 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761–771. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(94\)90462-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(94)90462-6)
- Ronau, J.A., Beckmann, J.F., Hochstrasser, M., 2016. Substrate specificity of the ubiquitin and Ubl proteases. *Cell Res* 26, 441–456. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.38>
- Rovera, C., Berestjuk, I., Lecacheur, M., Tavernier, C., Diazi, S., Pisano, S., Irondelle, M., Mallavialle, A., Albregues, J., Gaggioli, C., Girard, C.A., Passeron, T., Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Prod'homme, V., 2022. Secretion of IL1 by Dedifferentiated Melanoma Cells Inhibits JAK1-STAT3-Driven Actomyosin Contractility of Lymph Node Fibroblastic Reticular Cells. *Cancer Res* 82, 1774–1788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-0501>
- S, G., F, S., Ms, C., P, P., R, Z., C, M., P, B., Cf, M., 2005. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 41. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.03.034>
- Sahtoe, D.D., Sixma, T.K., 2015. Layers of DUB regulation. *Trends Biochem Sci* 40, 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.05.002>
- Sanghvi-Shah, R., Weber, G.F., 2017. Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5.
- Sapmaz, A., Berlin, I., Bos, E., Wijdeven, R.H., Janssen, H., Konietzny, R., Akkermans, J.J., Erson-Bensan, A.E., Koning, R.I., Kessler, B.M., Neefjes, J., Ovaa, H., 2019. USP32 regulates late endosomal transport and recycling through deubiquitylation of Rab7. *Nat Commun* 10, 1454. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09437-x>
- Schiemann, B.J., Neil, J.R., Schieman, W.P., 2003. SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system. *Mol Biol Cell* 14, 3977–3988. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-01-0001>
- Schönherr, E., Hausser, H.J., 2000. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol* 7, 89–101. <https://doi.org/10.1155/2000/31748>

- Schulman, B.A., Harper, J.W., 2009. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 319–331. <https://doi.org/10.1038/nrm2673>
- Schulz, S., Chachami, G., Kozaczekiewicz, L., Winter, U., Stankovic-Valentin, N., Haas, P., Hofmann, K., Urlaub, H., Ovaa, H., Wittbrodt, J., Meulmeester, E., Melchior, F., 2012. Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO Rep* 13, 930–938. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.125>
- Schwarzbauer, J.E., DeSimone, D.W., 2011. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a005041. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005041>
- Shain, A.H., Bastian, B.C., 2016. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 16, 345–358. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>
- Shaul, Y.D., Seger, R., 2007. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.005>
- Shi, H., Moriceau, G., Kong, X., Lee, M.-K., Lee, H., Koya, R.C., Ng, C., Chodon, T., Scolyer, R.A., Dahlman, K.B., Sosman, J.A., Kefford, R.F., Long, G.V., Nelson, S.F., Ribas, A., Lo, R.S., 2012. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun* 3, 724. <https://doi.org/10.1038/ncomms1727>
- Shrivastava, A., Radziejewski, C., Campbell, E., Kovac, L., McGlynn, M., Ryan, T.E., Davis, S., Goldfarb, M.P., Glass, D.J., Lemke, G., Yancopoulos, G.D., 1997. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* 1, 25–34. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80004-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80004-0)
- Sieminski, A.L., Hebbel, R.P., Gooch, K.J., 2004. The relative magnitudes of endothelial force generation and matrix stiffness modulate capillary morphogenesis in vitro. *Exp Cell Res* 297, 574–584. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.035>
- Sims, J.J., Cohen, R.E., 2009. Linkage-specific avidity defines the lysine 63-linked polyubiquitin binding preference of Rap80. *Mol Cell* 33, 775–783. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.011>
- Smith, D.M., Chang, S.-C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., Goldberg, A.L., 2007. Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell* 27, 731–744. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.033>
- Somogyi, K., Rørth, P., 2004. Evidence for tension-based regulation of Drosophila MAL and SRF during invasive cell migration. *Dev Cell* 7, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.05.020>
- Sorokin, L., 2010. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, 712–723. <https://doi.org/10.1038/nri2852>
- Sottile, J., Hocking, D.C., 2002. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 13, 3546–3559. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-01-0048>
- Spratt, D.E., Walden, H., Shaw, G.S., 2014. RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochem J* 458, 421–437. <https://doi.org/10.1042/BJ20140006>
- Stahl, J.M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J.Q., Bosenberg, M.W., Kester, M., Sandirasegarane, L., Robertson, G.P., 2004. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 64, 7002–7010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1399>

- Stramer, B.M., Mori, R., Martin, P., 2007. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol* 127, 1009–1017. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700811>
- Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W., Kalluri, R., 2006. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 5, 1640–1646. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.12.3354>
- Sun, K., Battle, M.A., Misra, R.P., Duncan, S.A., 2009. Hepatocyte expression of serum response factor is essential for liver function, hepatocyte proliferation and survival, and postnatal body growth in mice. *Hepatology* 49, 1645–1654. <https://doi.org/10.1002/hep.22834>
- Sun, M., Chi, G., Li, P., Lv, S., Xu, Juanjuan, Xu, Z., Xia, Y., Tan, Y., Xu, Jiayi, Li, L., Li, Y., 2018. Effects of Matrix Stiffness on the Morphology, Adhesion, Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Int J Med Sci* 15, 257–268. <https://doi.org/10.7150/ijms.21620>
- Sun, Z., Guo, S.S., Fässler, R., 2016. Integrin-mediated mechanotransduction. *Journal of Cell Biology* 215, 445–456. <https://doi.org/10.1083/jcb.201609037>
- Swatek, K.N., Komander, D., 2016. Ubiquitin modifications. *Cell Res* 26, 399–422. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.39>
- Tanaka, K., 2009. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 12–36. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.12>
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C., Karamanos, N.K., 2016. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 97, 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K., 2010. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting: Proteoglycans as potential pharmacological targets. *FEBS Journal* 277, 3904–3923. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07800.x>
- Thomas, G., Burnham, N.A., Camesano, T.A., Wen, Q., 2013. Measuring the mechanical properties of living cells using atomic force microscopy. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/50497>
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.M., 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19, 94–102. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.94>
- Tichet, M., Prod'Homme, V., Fenouille, N., Ambrosetti, D., Mallavialle, A., Cerezo, M., Ohanna, M., Audebert, S., Rocchi, S., Giaccherio, D., Boukari, F., Allegra, M., Chambard, J.-C., Lacour, J.-P., Michiels, J.-F., Borg, J.-P., Deckert, M., Tartare-Deckert, S., 2015. Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat Commun* 6, 6993. <https://doi.org/10.1038/ncomms7993>
- Tobin, D.J., 2006. Biochemistry of human skin--our brain on the outside. *Chem Soc Rev* 35, 52–67. <https://doi.org/10.1039/b505793k>
- Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K., Iwai, K., 2009. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat Cell Biol* 11, 123–132. <https://doi.org/10.1038/ncb1821>

- Topalian, S.L., Sznol, M., McDermott, D.F., Kluger, H.M., Carvajal, R.D., Sharfman, W.H., Brahmer, J.R., Lawrence, D.P., Atkins, M.B., Powderly, J.D., Leming, P.D., Lipson, E.J., Puzanov, I., Smith, D.C., Taube, J.M., Wigginton, J.M., Kollia, G.D., Gupta, A., Pardoll, D.M., Sosman, J.A., Hodi, F.S., 2014. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 32, 1020–1030. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.0105>
- Torrino, S., Grasset, E.M., Audebert, S., Belhadj, I., Lacoux, C., Haynes, M., Pisano, S., Abélanet, S., Brau, F., Chan, S.Y., Mari, B., Oldham, W.M., Ewald, A.J., Bertero, T., 2021. Mechano-induced cell metabolism promotes microtubule glutamylation to force metastasis. *Cell Metabolism* 33, 1342-1357.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.05.009>
- Tsao, H., Niendorf, K., 2004. Genetic testing in hereditary melanoma. *J Am Acad Dermatol* 51, 803–808. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.04.045>
- Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K.M., Lay, J., Wong, D.J.L., Atefi, M., Shirazi, R., Wang, X., Braas, D., Grasso, C.S., Palaskas, N., Ribas, A., Graeber, T.G., 2018. Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* 33, 890-904.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.017>
- van der Veen, A.G., Ploegh, H.L., 2012. Ubiquitin-Like Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 323–357. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-093010-153308>
- Verfaillie, A., Imrichova, H., Atak, Z.K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., Christiaens, V., Svetlichnyy, D., Luciani, F., Van den Mooter, L., Claerhout, S., Fiers, M., Journe, F., Ghanem, G.-E., Herrmann, C., Halder, G., Marine, J.-C., Aerts, S., 2015. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun* 6, 6683. <https://doi.org/10.1038/ncomms7683>
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., Koonin, E.V., Deshaies, R.J., 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611–615. <https://doi.org/10.1126/science.1075898>
- Vierstra, R.D., 2012. The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiol* 160, 2–14. <https://doi.org/10.1104/pp.112.200667>
- Vigneron, N., Van den Eynde, B.J., 2014. Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex. *Biomolecules* 4, 994–1025. <https://doi.org/10.3390/biom4040994>
- Vihinen, P., Kähäri, V.-M., 2002. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 99, 157–166. <https://doi.org/10.1002/ijc.10329>
- Villanueva, J., Infante, J.R., Krepler, C., Reyes-Urbe, P., Samanta, M., Chen, H.-Y., Li, B., Swoboda, R.K., Wilson, M., Vultur, A., Fukunaba-Kalabis, M., Wubbenhorst, B., Chen, T.Y., Liu, Q., Sproesser, K., DeMarini, D.J., Gilmer, T.M., Martin, A.-M., Marmorstein, R., Schultz, D.C., Speicher, D.W., Karakousis, G.C., Xu, W., Amaravadi, R.K., Xu, X., Schuchter, L.M., Herlyn, M., Nathanson, K.L., 2013. Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. *Cell Rep* 4, 1090–1099. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.023>
- Vinay, D.S., Ryan, E.P., Pawelec, G., Talib, W.H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W.K., Whelan, R.L., Kumara, H.M.C.S., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A.G., Amin, A., Helferich, W.G., Boosani, C.S., Guha, G., Ciriolo, M.R., Chen, S., Mohammed, S.I., Azmi, A.S., Keith, W.N., Bilsland, A., Bhakta, D., Halicka, D., Fujii, H., Aquilano, K., Ashraf, S.S., Newsheen, S., Yang, X., Choi, B.K., Kwon, B.S., 2015.

Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol* 35 Suppl, S185–S198. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2015.03.004>

Visse, R., Nagase, H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827–839. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>

Vogel, W., Gish, G.D., Alves, F., Pawson, T., 1997. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1, 13–23. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80003-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80003-9)

Vollrath, M.A., Kwan, K.Y., Corey, D.P., 2007. The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu Rev Neurosci* 30, 339–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112917>

Waizenegger, I.C., Baum, A., Steurer, S., Stadtmüller, H., Bader, G., Schaaf, O., Garin-Chesa, P., Schlattl, A., Schweifer, N., Haslinger, C., Colbatzky, F., Mousa, S., Kalkuhl, A., Kraut, N., Adolf, G.R., 2016. A Novel RAF Kinase Inhibitor with DFG-Out-Binding Mode: High Efficacy in BRAF-Mutant Tumor Xenograft Models in the Absence of Normal Tissue Hyperproliferation. *Mol Cancer Ther* 15, 354–365. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0617>

Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A.J., Baumeister, W., 1998. 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol* 121, 19–29. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3958>

Wang, D.-Z., Li, S., Hockemeyer, D., Sutherland, L., Wang, Z., Schrott, G., Richardson, J.A., Nordheim, A., Olson, E.N., 2002. Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14855–14860. <https://doi.org/10.1073/pnas.222561499>

Wang, J.H.-C., Lin, J.-S., 2007. Cell traction force and measurement methods. *Biomech Model Mechanobiol* 6, 361–371. <https://doi.org/10.1007/s10237-006-0068-4>

Wang, Y., McNiven, M.A., 2012. Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. *J Cell Biol* 196, 375–385. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105153>

Wang, Y., Song, M., Zhou, P., Wang, J., Zheng, J., Xu, H., 2021. TNFAIP3-upregulated RIP3 exacerbates acute pancreatitis via activating NLRP3 inflammasome. *Int Immunopharmacol* 100, 108067. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108067>

Weake, V.M., Workman, J.L., 2008. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* 29, 653–663. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.014>

Weder, G., Hendriks-Balk, M.C., Smajda, R., Rimoldi, D., Liley, M., Heinzelmann, H., Meister, A., Mariotti, A., 2014. Increased plasticity of the stiffness of melanoma cells correlates with their acquisition of metastatic properties. *Nanomedicine* 10, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.07.007>

Wegener, K.L., Partridge, A.W., Han, J., Pickford, A.R., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H., Campbell, I.D., 2007. Structural Basis of Integrin Activation by Talin. *Cell* 128, 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.048>

Wei, Y., Jiang, Z., Lu, J., 2021. USP22 promotes melanoma and BRAF inhibitor resistance via YAP stabilization. *Oncol Lett* 21, 394. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12655>

- Wells, J.M., Gaggar, A., Blalock, J.E., 2015. MMP generated matrikines. *Matrix Biol* 44–46, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.016>
- Wesley, R.B., Meng, X., Godin, D., Galis, Z.S., 1998. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 432–440. <https://doi.org/10.1161/01.atv.18.3.432>
- Whittaker, S.R., Theurillat, J.-P., Van Allen, E., Wagle, N., Hsiao, J., Cowley, G.S., Schadendorf, D., Root, D.E., Garraway, L.A., 2013. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov* 3, 350–362. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0470>
- Winograd-Katz, S.E., Fässler, R., Geiger, B., Legate, K.R., 2014. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 273–288. <https://doi.org/10.1038/nrm3769>
- Wu, H., Goel, V., Haluska, F.G., 2003. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 22, 3113–3122. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206451>
- Wu, Q., Guo, J., Liu, Y., Zheng, Q., Li, X., Wu, C., Fang, D., Chen, X., Ma, L., Xu, P., Xu, X., Liao, C., Wu, M., Shen, L., Song, H., 2021. YAP drives fate conversion and chemoresistance of small cell lung cancer. *Sci Adv* 7, eabg1850. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg1850>
- Xiang, M., Liang, L., Kuang, X., Xie, Z., Liu, J., Zhao, S., Su, J., Chen, X., Liu, H., 2021. Pharmacological inhibition of USP7 suppresses growth and metastasis of melanoma cells in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 25, 9228–9240. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16834>
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., Peng, J., 2009. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137, 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.041>
- Y, J., J, P., N, S., F, C., Je, E., R, K., P, L., 2017. Vimentin intermediate filaments control actin stress fiber assembly through GEF-H1 and RhoA. *Journal of cell science* 130. <https://doi.org/10.1242/jcs.196881>
- Yao, T., Cohen, R.E., 2002. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403–407. <https://doi.org/10.1038/nature01071>
- Ye, Y., Akutsu, M., Reyes-Turcu, F., Enchev, R.I., Wilkinson, K.D., Komander, D., 2011. Polyubiquitin binding and cross-reactivity in the USP domain deubiquitinase USP21. *EMBO Rep* 12, 350–357. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.17>
- Ye, Y., Rape, M., 2009. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 755–764. <https://doi.org/10.1038/nrm2780>
- Yeung, T., Georges, P.C., Flanagan, L.A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., Janmey, P.A., 2005. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil Cytoskeleton* 60, 24–34. <https://doi.org/10.1002/cm.20041>
- Yoon, S., Seger, R., 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21–44. <https://doi.org/10.1080/02699050500284218>
- You, J., Pickart, C.M., 2001. A HECT domain E3 enzyme assembles novel polyubiquitin chains. *J Biol Chem* 276, 19871–19878. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100034200>



- Young, K., Minchom, A., Larkin, J., 2012. BRIM-1, -2 and -3 trials: improved survival with vemurafenib in metastatic melanoma patients with a BRAF(V600E) mutation. *Future Oncol* 8, 499–507. <https://doi.org/10.2217/fon.12.43>
- Yu, H., Mashtalir, N., Daou, S., Hammond-Martel, I., Ross, J., Sui, G., Hart, G.W., Rauscher, F.J., Drobetsky, E., Milot, E., Shi, Y., Affar, E.B., 2010. The ubiquitin carboxyl hydrolase BAP1 forms a ternary complex with YY1 and HCF-1 and is a critical regulator of gene expression. *Mol Cell Biol* 30, 5071–5085. <https://doi.org/10.1128/MCB.00396-10>
- Yuan, W.-C., Lee, Y.-R., Lin, S.-Y., Chang, L.-Y., Tan, Y.P., Hung, C.-C., Kuo, J.-C., Liu, C.-H., Lin, M.-Y., Xu, M., Chen, Z.J., Chen, R.-H., 2014. K33-Linked Polyubiquitination of Coronin 7 by Cul3-KLHL20 Ubiquitin E3 Ligase Regulates Protein Trafficking. *Mol Cell* 54, 586–600. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.035>
- Yurchenco, P.D., Amenta, P.S., Patton, B.L., 2004. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol* 22, 521–538. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2003.10.006>
- Yutao, X., Geru, W., Xiaojun, B., Tao, G., Aiqun, M., 2006. Mechanical stretch-induced hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes is mediated by beta(1)-integrin-microtubule signaling pathways. *Eur J Heart Fail* 8, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2005.05.014>
- Zanotelli, M.R., Reinhart-King, C.A., 2018. Mechanical Forces in Tumor Angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1092, 91–112. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-95294-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-95294-9_6)
- Zhang, C., Qian, H., Liu, K., Zhao, W., Wang, L., 2019. A Feedback Loop Regulation Of LINC01433 And YAP Promotes Malignant Behavior In Gastric Cancer Cells. *Onco Targets Ther* 12, 7949–7962. <https://doi.org/10.2147/OTT.S222903>
- Zhang, L., Zhou, F., Drabsch, Y., Gao, R., Snaar-Jagalska, B.E., Mickanin, C., Huang, H., Sheppard, K.-A., Porter, J.A., Lu, C.X., ten Dijke, P., 2012. USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- $\beta$  type I receptor. *Nat Cell Biol* 14, 717–726. <https://doi.org/10.1038/ncb2522>
- Zhang, W., Liu, H.T., 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9–18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>
- Zhang, Y., Fan, Y., Jing, X., Zhao, L., Liu, T., Wang, L., Zhang, L., Gu, S., Zhao, X., Teng, Y., 2021. OTUD5-mediated deubiquitination of YAP in macrophage promotes M2 phenotype polarization and favors triple-negative breast cancer progression. *Cancer Lett* 504, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.02.003>
- Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.-Y., Guan, K.-L., 2010. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev* 24, 72–85. <https://doi.org/10.1101/gad.1843810>
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.-C., Guan, K.-L., 2007. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21, 2747–2761. <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>
- Zhao, X., Fiske, B., Kawakami, A., Li, J., Fisher, D.E., 2011. Regulation of MITF stability by the USP13 deubiquitinase. *Nat Commun* 2, 414. <https://doi.org/10.1038/ncomms1421>

Zhou, Y., Kastritis, P.L., Dougherty, S.E., Bouvette, J., Hsu, A.L., Burbaum, L., Mosalaganti, S., Pfeffer, S., Hagen, W.J.H., Förster, F., Borgnia, M.J., Vogel, C., Beck, M., Bartesaghi, A., Silva, G.M., 2020. Structural impact of K63 ubiquitin on yeast translocating ribosomes under oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, 22157–22166. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005301117>

# Annexes

**Role of the deubiquitinase USP9X in melanoma invasion and mechanotransduction through YAP stabilization**

**Background:** The ubiquitin proteasome system (UPS) is a crucial mechanism that regulates protein degradation. It uses ubiquitin chain as a tag for proteasomal degradation. Deubiquitinases (DUBs) are ubiquitin specific proteases that remove ubiquitin from their targets, thus preventing their degradation, and together with UPS ensuring protein homeostasis. In cancer, DUBs can be hijacked to stabilize oncogenes or to activate oncogenic signaling pathways, thereby enhancing the proliferative and/or invasive properties of tumor cells. Cutaneous melanoma is a very aggressive cancer with a high propensity to form metastasis and strong resistance to targeted therapies. Recently our lab showed that extracellular matrix (ECM) stiffening and mechanotransduction play a significant role in proliferation and resistance to treatment through the activation of the mechanosensor YAP. In this study, we investigated the role of DUBs in melanoma cell invasive properties and mechanotransduction pathways.

**Key findings:** We transfected invasive melanoma cells with a library of small interfering RNA targeting 95 human DUBs and performed a scratch assay, which identified USP9X as a novel regulator of melanoma cell motility. We next confirmed that USP9X depletion with siRNA/shRNA or pharmacological inhibition with G9 impaired melanoma cell migration and invasion. Interestingly, bioinformatical analysis showed an interaction between USP9X and YAP and a correlation between USP9X expression and YAP signature genes in melanoma. Furthermore, biochemical analysis of USP9X expression and activity (DUB Trap assay) conducted on melanoma cells plated on collagen matrices with various stiffness revealed that both USP9X and YAP protein expression was increased on stiff substrates compared to soft substrates. We thus hypothesized that USP9X regulate the levels of YAP in melanoma cells through its DUB activity. To test this, we showed that YAP expression decreased at protein level but not at mRNA level upon USP9X depletion in melanoma cells. Using a GST-TUBE (Tandem Ubiquitin Binding Entities) pulldown approach, we observed an increased poly-ubiquitination of YAP in cells treated with G9 in the presence of proteasome inhibitor, suggesting that USP9X is stabilizing YAP by preventing its proteasomal degradation. Consistent with a role of USP9X in melanoma mechanotransduction upstream of YAP we showed that USP9X localization is dictated by the matrix stiffness and that its inhibition impairs YAP nuclear translocation. Finally we showed that, similar to YAP depletion, USP9X depletion impaired the contraction of 3D collagen matrices mediated by invasive melanoma cells.

**Conclusion:** Our study indicates that the deubiquitinase USP9X represents a novel regulator of melanoma cell invasion and mechanotransduction pathways through stiffness-dependent stabilization of the mechanosensor YAP. We also propose USP9X as a potential “mechano-DUB” in melanoma.

## **2021 : GDR Micronit, prix de la meilleure présentation orale :**

### **The deubiquitinase USP9X controls melanoma cell migration and mechanotransduction through YAP stabilization.**

**Introduction :** The Ubiquitin-Proteasome-System (UPS) uses ubiquitin to address for proteasomal degradation. Deubiquitinases (DUBs) remove ubiquitin from their targets to prevent their degradation and with the UPS, they are gatekeepers of protein homeostasis. DUBs can be hijacked to modulate oncogenic pathways, enhancing cell proliferation and/or invasion. Cutaneous melanoma exhibits a high propensity to form metastasis that are highly resistant to targeted therapies. We have recently shown that extracellular matrix (ECM) stiffening and mechanotransduction play a major role in proliferation, migration and drug-resistance of melanoma cells through the mechanosensor YAP.

**Methods :** To identify DUBs involved in melanoma mechanotransduction, we used cell lines cultivated on collagen matrices with various stiffnesses combined with an activity-based ubiquitin probe for profiling DUB activity.

**Results :** Using this approach and quantitative proteomic, we identified USP9X as a DUB whose activity is increased by collagen stiffness. In silico analysis further revealed that YAP belongs to the USP9X interactome and showed a correlation between USP9X expression and YAP transcriptional signature in melanoma. We thus hypothesized that USP9X regulates YAP levels in melanoma cells through its DUB activity. Consistently, siRNA-mediated depletion and pharmacological inhibition of USP9X decreased YAP expression at protein but not mRNA levels. Conversely knockdown of the YAP E3 ligase  $\beta$ TRCP increased YAP protein expression. A GST-TUBE pulldown approach revealed that combined USP9X and proteasome inhibition increased YAP poly-ubiquitination, indicating that USP9X deubiquitinates YAP to prevent its proteasomal degradation. In line with a role of USP9X in mechanotransduction upstream of YAP, USP9X targeting was found to impair stiffness-induced responses including YAP nuclear translocation and transcriptional activity, cell migration and invasion, force-mediated cell contractility and increased resistance to anti-BRAF targeted therapies. Finally, using bioluminescent melanoma cells stably depleted for USP9X in an experimental lung invasion assay, we found that USP9X knockdown impairs melanoma cell migration in vivo.

**Conclusion and Perspectives :** Our results reveal an original role of USP9X in melanoma invasiveness and mechanoresistance through stiffness-dependent stabilization of YAP. We therefore propose USP9X as a “mechano-DUB” in melanoma.

**The mechanically-activated deubiquitinase USP9X controls melanoma invasiveness and drug response through YAP stabilization**

Deubiquitinases (DUBs) remove ubiquitin from their targets to prevent their degradation and with the UPS, they are gatekeepers of protein homeostasis. DUBs can be hijacked to modulate oncogenic pathways, enhancing cell proliferation and/or invasion. Cutaneous melanoma exhibits a high propensity to form metastasis that are highly resistant to targeted therapies. We have recently shown that extracellular matrix (ECM) stiffening and mechanotransduction play a major role in proliferation, migration and drug-resistance of melanoma cells through the mechanosensor YAP.

To identify DUBs involved in melanoma mechanotransduction, we used cell lines cultivated on collagen matrices with various stiffnesses combined with an activity-based ubiquitin probe for profiling DUB activity. Using this approach and quantitative proteomic, we identified USP9X as a DUB whose activity is increased by collagen stiffness. In silico analysis further revealed that YAP belongs to the USP9X interactome and showed a correlation between USP9X expression and YAP transcriptional signature in melanoma. We thus hypothesized that USP9X regulates YAP levels in melanoma cells through its DUB activity. Consistently, siRNA-mediated depletion and pharmacological inhibition of USP9X decreased YAP expression at protein but not mRNA levels. Conversely knockdown of the YAP E3 ligase  $\beta$ TRCP increased YAP protein expression. A GST-TUBE pulldown approach revealed that combined USP9X and proteasome inhibition increased YAP poly-ubiquitination, indicating that USP9X deubiquitinates YAP to prevent its proteasomal degradation. In line with a role of USP9X in mechanotransduction upstream of YAP, USP9X targeting was found to impair stiffness-induced responses including YAP nuclear translocation and transcriptional activity, cell migration and invasion. Using bioluminescent melanoma cells stably depleted for USP9X in an experimental lung invasion assay, we found that USP9X knockdown impairs melanoma cell migration *in vivo*. Targeting USP9X enhances BRAF inhibitor efficacy, counteracts drug-induced collagen remodeling and delays tumor relapse *in vivo*.

Our results reveal an original role of USP9X in melanoma invasiveness and mechanoresistance through stiffness-dependent stabilization of YAP. We therefore propose USP9X as a “mechano-DUB” in melanoma.

## Posters

### Présentation d'un poster à la Cancéropôle PACA 2021 :

#### **Role of the deubiquitinase USP9X in melanoma invasion and mechanotransduction through YAP stabilization**

**Background:** The ubiquitin proteasome system (UPS) is a crucial mechanism that regulates protein degradation. It uses ubiquitin chain as a tag for proteasomal degradation. Deubiquitinases (DUBs) are ubiquitin specific proteases that remove ubiquitin from their targets, thus preventing their degradation, and together with UPS ensuring protein homeostasis. In cancer, DUBs can be hijacked to stabilize oncogenes or to activate oncogenic signaling pathways, thereby enhancing the proliferative and/or invasive properties of tumor cells. Cutaneous melanoma is a very aggressive cancer with a high propensity to form metastasis and highly resistant to targeted therapies. Recently our lab showed that extracellular matrix (ECM) stiffening and mechanotransduction play a significant role in proliferation and resistance to treatment through the activation of the mechanosensor YAP. In this study, we investigated the role of DUBs in melanoma cell invasive properties and mechanotransduction pathways.

**Key findings:** We transfected invasive melanoma cells with a library of small interfering RNA targeting 95 human DUBs and performed a scratch assay, which identified the DUB USP9X as a novel regulator of melanoma cell motility. We next confirmed that either USP9X depletion with siRNA or its pharmacological inhibition with G9 impaired melanoma cell migration and invasion in Boyden chamber assay. Interestingly, bioinformatical analysis showed an interaction between USP9X and YAP and a correlation between USP9X and YAP signature gene in melanoma

we found that impaired cell migration of USP9X-depleted melanoma cells was associated with a marked decreased of YAP expression and co-transcriptional activity. In addition, biochemical analysis of USP9X expression and activity (DUB Trap assay) conducted on melanoma cells plated on collagen matrices with various stiffness revealed that both USP9X and YAP protein expression was increased on stiff substrates compared to soft substrates. We thus hypothesized that USP9X may regulate the levels of YAP in melanoma cells through its DUB activity. To test this, we first showed that YAP expression decreased at protein level but not at mRNA level upon USP9X depletion in melanoma cells. Using an immunoprecipitation approach, we next observed an increased poly-ubiquitination of YAP in cells treated with G9 in the presence of proteasome inhibitor bortezomib, suggesting that USP9X is stabilizing YAP by preventing its proteasomal degradation. This observation was further confirmed in a pulldown approach using GST-TUBE (Tandem Ubiquitin Binding Entities). Finally, consistent with a role of USP9X in melanoma mechanotransduction upstream of YAP, we showed that, similar to YAP depletion, USP9X depletion impaired the contraction of 3D collagen matrices mediated by invasive melanoma cells.

**Conclusion:** Together, our study indicates that the deubiquitinase USP9X represents a novel regulator of melanoma cell invasion and mechanotransduction pathways through stiffness-dependent stabilization of the mechanosensor YAP. We also propose USP9X as a potential "mechano-DUB" in melanoma.

## Evènements

### Participation à l'élaboration et à la tenue du stand « C3M Science Park » à la fête de la science 2021 à Nice.

## Publications

## **Deubiquitinating enzyme PSMD14 controls cell survival and drives sensitivity to MAPK pathway inhibitors through histone H2A ubiquitination in melanoma**

M. Ohanna<sup>1,2\*</sup>, P. Biber<sup>1,2</sup>, S. Diazzi<sup>1,2</sup>, L. Lefevre<sup>1,2</sup>, F. Larbret<sup>1,2</sup>, R. Didier<sup>1,2</sup>, S. Audebert<sup>3</sup>, L. Larue<sup>4</sup>, S. Tartare-Deckert<sup>1,2</sup>, and M. Deckert<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France

<sup>2</sup>Team Microenvironment, Signalling and Cancer », Equipe labellisée Ligue contre la Cancer

<sup>3</sup>Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille, France

<sup>4</sup>Institut Curie, PSL Research University, CNRS, INSERM, Orsay, France.

Keywords: skin cancer, melanoma, deubiquitinase, PSMD14, histone modification, oncohistone, apoptosis, DNA damage, targeted therapy

\*Correspondence: Mickael Ohanna, Inserm UMR1065 / C3M, 151 Route de Ginestière BP 2 3194, F-06204 Nice cedex 3 France. Phone: 33 (0) 4 89 15 38 53; email: [Ohanna@unice.fr](mailto:Ohanna@unice.fr); Marcel Deckert, Inserm UMR1065 / C3M, 151 Route de Ginestière BP 2 3194, F-06204 Nice cedex 3 France. Phone: 33 (0)6 18 18 22 73; email: [deckert@unice.fr](mailto:deckert@unice.fr)

## Abstract

---

Advanced melanoma is the deadliest form of skin cancer. Targeted therapies against BRAF mutated melanoma and immune checkpoints have shown remarkable clinical efficacy. However, such treatments are limited to patient subsets and relapses invariably occur. Globally, more than 50% of melanoma patients need additional treatments, warranting the development of novel therapies. Post-translational modification of proteins by ubiquitin coordinates essential cellular functions, including protein homeostasis and trafficking, transcriptional regulation and DNA damage response. Deubiquitinating enzymes (DUBs) are important components of the ubiquitin cascade. However, their functional significance in the pathogenesis of cutaneous melanoma remains poorly understood. We used a genetic screen with a small interfering RNA library targeting human DUBs to identify the proteasome-associated DUB, PSMD14 (proteasome 26S subunit, non-ATPase 14) as a novel critical regulator of melanoma tumor growth, survival and drug resistance. Analysis of gene expression data from cohorts of melanoma patients correlated high levels of PSMD14 with melanoma progression and with a shorter survival rate in metastatic melanoma patients. PSMD14 inhibition with siRNA or with the inhibitor quinoline-8-thiol (8TQ) dramatically suppressed melanoma cell proliferation and viability of a panel of melanoma cell lines harboring different mutational status of BRAF, NRAS and NF1. PSMD14 inhibition also abrogated the development of BRAFi/MEKi drug tolerant cells and overcame acquired resistance to MAPK-targeting therapies both in vitro and in vivo. We investigated the PSMD14 interactome using affinity purification and mass spectrometry and identified histone H2A variants as PSMD14 interacting proteins. We provided evidence that targeting PSMD14 in melanoma cells exerts a cytotoxic action through DNA damage response involving nuclear accumulation of phosphorylated histone H2A and increased monoubiquitination of histone H2A (UbH2A) and UbH2A-dependent repression of the pro-survival protein MCL1. Importantly, targeted therapies, which decreased PSMD14 and MCL1 expression, also increased H2A monoubiquitination, suggesting that melanoma cells acquire drug resistance partially through PSMD14-dependent H2A regulation. Finally, we found that depletion of the H2A ubiquitin ligase RNF2 reversed H2A monoubiquitination and cell death induced both by PSMD14 targeting and BRAFi/MEKi treatment. We propose that PSMD14 is a novel DUB of histone H2A that plays a critical role in the maintenance of melanoma genomic stability and cancer cell adaptation to targeted therapies. Therefore, PSMD14 represents an attractive novel therapeutic target for melanoma treatment.



Cancer cells distinguish their ability to divide indefinitely and to escape programmed cell death from normal cells (Hanahan, 2022). Cancer is qualified as an evolutionary process in which an alteration of the capacity in the intracellular renewal of proteins (proteostasis) contributes fully from the tumor initiation to the tumor growth phase with the maintenance of an active proliferation until metastatic propagation. In addition, adaptive acquisition of proteostatic mechanisms allows the tumor cell to change their phenotype as a response to their microenvironment and various aggressions, such as oncogenic stress, therapeutic anticancer and immune response. The fundamental questions about how and why adaptive proteostasis perturbations happen and affect disease emergence and progression, remains an important part of cancer progression. Melanoma is one of these cancers in which cell cycle dysregulation is one of the crucial hallmark traits defining the aggressive nature of the pathology (Miller and Mihm, 2006; Rambow et al., 2019; Shain and Bastian, 2016). The distinguishing features of aggressive behavior of melanoma cells are related with genetic alterations in the BRAF and NRAS genes, resulting in constitutive activation of mitogenic pathways such as the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway as well as constitutive activation of growth factor receptors, such as c-Kit, PDGFR- $\alpha$ , EGFR and subsequent stimulation of transcription factors, such as MYC, hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) also induced by PI3K/AKT/mTOR and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling (Wellbrock et al., 2004) (Holderfield et al., 2014) (Cancer Genome Atlas, 2015). This progress has allowed for a subset of patients to target specific cell cycle regulators and particularly the development of targeted molecular therapies based on the blockade of the altered MAPK pathway, such as BRAFV600E/MEK inhibitors (vemurafenib/trametinib). As a promising strategy in the treatment of melanoma, these drugs have significantly improved patient survival. Nevertheless, after a tumor response phase, a persistence and then resistance phase to systemic treatments occurs, in which a proportion of cells will be subjected to an active cycle and thus feeding the tumor growth (Flaherty et al., 2012; Long et al., 2016) (Rambow et al., 2018). These drug tolerant sources of cells, which over the longer term participate in relapse, derive from the genetic capacity of melanoma to adapt its differentiation state (Tsoi et al., 2018; Widmer et al., 2012), to the hostile microenvironment, to resist treatment, to suppress immunosurveillance mechanisms, and to disseminate (Shaffer et al., 2017; Tsoi et al., 2018). Besides genetic alterations, the complex melanoma gene expression landscape is additionally regulated through several epigenetic mechanisms including chromatin methylation, modification, and remodeling, and cues from the tumor microenvironment affect the survival, proliferation, and invasive potential of melanoma cells by altering additional signaling pathways (Straussman et al., 2012; Young et al., 2017) (Konstantinov et al., 2016). In cases of melanoma with no BRAF mutations (more than 50% of the total), treatment with antibodies blocking the functions of the immune checkpoints PD-1 and CTLA-4 has become a first line therapeutic

regimen (Eggermont et al., 2014). Immunotherapy also appears as a second line of treatment in the cases of innate and acquired resistance to BRAF/MEK inhibitors. However, most patients do not fully respond to immunotherapies. In this light, given limited current anti-melanoma therapies and the need to identify and develop new approaches (Eggermont et al., 2014), increasing evidence indicates that to support preservation of survival, their intrinsic plasticity and address genetic and non-genetic exigencies, melanoma cells must adapt the homeostatic pathways that control their global proteome, an obvious source of vulnerability to trigger the development of targeted anti-cancer drugs.

The ubiquitin-proteasome system (UPS) plays a critical role in protein quality control and cancer proteostasis (Balch et al., 2008; Finley, 2009). The UPS is composed of proteolytic multiprotein complexes called proteasomes acting downstream a cascade of E1, E2 and E3 enzymes that activate ubiquitin residues and add them to mutant/aged/misfolded proteins targeted for destruction by proteasomes (Finley, 2009). The removal of ubiquitin moieties from protein substrates is catalyzed by a family of more than 90 ubiquitin-specific proteases called deubiquitinases (DUBs) that participate to key cellular processes (Nijman et al., 2005; Reyes-Turcu et al., 2009). Evidences suggest that aberrant expression, mutations or dysfunction of DUBs are associated with the pathogenesis of neoplastic diseases (Kumari et al., 2017), underscoring the therapeutic potential of targeting DUBs in cancer (Ohanna et al., 2022). In melanoma, the mutation of genes associated with ubiquitination, such as BAP1, FBXW7 and PARK2, are frequently identified (Ma et al., 2017). Several DUBs have been directly implicated in melanoma tumorigenesis and therapeutic response. For example, USP13 was shown to regulate the stability of the microphthalmia-associated transcription factor (MITF) that is essential for melanocyte development and melanogenesis (Zhao et al., 2011). In NRAS mutant melanomas, USP9X has been identified as an important modulator of NRAS expression via the stabilization of ETS-1 (Potu et al., 2017). In BRAF mutant melanoma cells, USP5 inhibition promoted p53 and FAS expression, thereby potentiating targeted therapies (Potu et al., 2014). Other DUBs such as USP8 (Jeong et al., 2017) and USP15 (Zou et al., 2014) are overexpressed in melanoma and participate to disease progression or antitumor responses. Within a set of DUBs, USP7 removal is crucial in tumor development of BRAF and NRAS mutant melanoma PDX, favoring senescence through RRM2 polyubiquitination. Some DUBs are intrinsic components of the proteasome (Schnell and Hanna, 2022). In this context, we have shown that targeting USP14 exerts a broad anti-melanoma via a strong reticulum stress and a caspase-independent cell death (Didier et al., 2018). Recently melanoma proliferative and migratory function has been controlled by PSMD14, a 19S regulatory particle subunit of 26S proteasomes, through SMAD3 stability and transcriptional activity (Yokoyama et al., 2020). In the other hand, the repression of CYLD by the EMT transcription factor Snail1 resulted in proliferation and invasion of melanoma cells (Massoumi et al., 2009), further illustrating the complexity of DUB functions in melanoma pathogenesis. To date, the role of DUBs in melanoma remains undefined in to the control of survival / proliferation processes (Ohanna et al., 2022).

Using a genetic screen to identify new DUBs involved in melanoma cell proliferation and/or survival, we identify PSMD14 (the non-ATPase 14 regulatory subunit of the 26S proteasome), as crucial to melanoma proliferation and survival. Although many reports have implied antiproliferative effects on other types of cancer, we report an impact of PSMD14 deletion on the efficiency and selectivity of melanoma cell proliferation, proposing its relevance as a valuable therapeutic target. We show that expression levels of PSMD14 are significantly related to advanced disease stages and shorter survival in patients with metastatic melanoma. We report for the first time that PSMD14 depletion and pharmacological inhibition of PSMD14 (PSMD14i) alter the proliferation and viability of melanoma cells with different mutational status in vitro, and reduce the growth of BRAF and NRAS mutant mouse melanomas in vivo. Cellular pathways involved in proliferation (CDK2, P21), DNA damage (gamma H2A) and apoptosis, are predominantly impaired after PSMD14 depletion, which are central to melanoma cell proliferation and survival. Though a promising target, with specific therapeutic inhibitors tested in several cancer types even in melanoma, the function of PSMD14 in melanoma is poorly elucidated (Yokoyama et al., 2020) (Li et al., 2017). To reveal PSMD14 mechanisms in melanoma proliferation and survival, we identified the histone H2A variant as a novel binding partner and functional target of PSMD14 through mass spectrometry profiling. First established as an epigenetic marker, mono-ubiquitination of histone H2A (UbH2A), mediated by the ubiquitin ligase RNF2 (RING1B), regulates transcription initiation and elongation, transcriptional silencing of anti-apoptotic genes and DNA repair (Zhang et al., 2017) (He et al., 2019). Here we reported for the first time that both PSMD14 activity and its expression levels control the level of UbH2A, irrespective of its role on the proteolytic activity of the 26S proteasome, thus offering another H2A regulator layer. The high UbH2A levels initiated either by the loss of PSMD14 or its activity, resulting in transcriptional alterations of specific target genes reported to be modulated by UbH2A such as MCL1 anti-apoptotic factor. We demonstrate that RNF2 loss, re-establishes the PSMD14 loss-associated proliferation arrest and death, decreases the level of UbH2A and the pro-survival genes Bcl2 and Mcl1, uncovering a role for UbH2A level control in PSMD14-mediated melanoma proliferation and survival.

The dynamics of histone post-translational modifications is a major non-genetic mechanism observable during therapeutic treatment, we show for the first time that the level of UbH2A follows the tumor efficacy of therapies targeting the oncogenic MAPK pathway (BRAFi/MEKi). Modulation of UbH2A and PSMD14 levels altered both early response and the occurrence of refractive cells to targeted therapy in vivo. Hence, we showed the persistent anti-tumor effect exhibited by PSMD14 (PSMD14i) inhibition could be efficiently administered together with BRAFi/MEKi, suggesting a new combination therapy for melanoma. These findings imply that UbH2A level serves as key node linking several markers of PSMD14-mediated cell proliferation and highlights a pivotal impact in targeting post-translational alterations of H2A in melanoma treatment.

## Proteasomal deubiquitinating enzyme PSMD14, as a critical gene for proliferation/survival and as a prognostic factor in melanoma.

---

We undertook an unbiased genetic screen to identify deubiquitinating enzyme superfamily members (DUBs) that melanoma cell proliferation and survival. We used 501Mel cells as a representative BRAF mutated melanoma cell line harbouring a proliferative phenotype (Widmer et al., 2012). A human DUB siRNA library consisting of pools of four oligonucleotide sequences targeting 98 human DUBs (Dharmacon siGENOME® SMARTpool® siRNA Library- Human Deubiquitinating Enzymes) and non-targeting siRNAs were transfected into 501Mel cells and cell proliferation was followed for 72h by live-cell imaging of cell confluence (Figure 1A). We then assembled our results into a rank order based on the effect of each pools of siDUBs on cell proliferation at 96h compared to the mean of non-targeting control siRNA conditions (Figure 1b). Importantly, our screen confirmed the importance of USP14 for the regulation melanoma cell proliferation in agreement with our previous studies (Didier et al., 2018), thereby validating our approach. Nevertheless, the knockdown of 7 additional DUBs, resulted in a more severe inhibition of 501Mel cell proliferation after 72h (>50% inhibition of cell proliferation). Utilizing the Achilles data (DepMap Public 20Q3), which provides the genome-wide CRISPR knockout screen data, shows that out of the 7 screening genes, PSMD14 (also known as RPN11 and POH1) scored the most negative CERES, which indicates its role as an essential gene for cell viability in melanoma cells (Figure C) (Tsherniak et al., 2017). In addition, PSMD14 is essential in pan-cancer cells as well particularly in melanoma cells (Figure supp A). PSMD14 is a Zn<sup>2+</sup>-dependent metalloisopeptidase of the JAMM family, an intrinsic component of the 19S regulatory particle of the proteasome that prevents the degradation of ubiquitinated proteins but has also been recently reported to play a role in tumour growth and melanoma cell migration (Gallery et al., 2007; Spataro et al., 2002) (Yokoyama et al., 2020). We therefore hypothesized that PSMD14 may constitute a key contributor of melanoma biology and therapeutic response. Differential mRNA and protein expressions from both GEPIA and HPA databases revealed that PSMD14 was upregulated in melanoma tissue samples compared to normal tissue samples (Figure 1 supp B/C). Analysis of expression in public datasets (GSE8401 and GSE46517) further revealed an elevated expression of PSMD14 in malignant melanoma as compared to primary melanoma (Figure supp D). PSMD14 expression was also significantly correlated with melanoma progression as indicated by the higher expression detected in metastatic melanoma compared to benign skin lesions (nevi) (Figure supp1 E). TCGA dataset analysis reveals that PSMD14 is altered in 9% of melanoma cases with predominantly higher RNA levels and high PSMD14 levels were also significantly associated as poor outcomes in melanoma patients (P=0.0079) (Figure supp1 E, Figure 1 supp1 F). Finally, GSEA analysis conducted on TCGA melanoma patient gene expression datasets indicated that PSMD14 levels are positively correlated with gene signatures of cell cycle checkpoints, cell proliferation and metabolic pathways, pathways that have been implicated in melanoma progression (Figure 1 supp1 H). Together,

these results identify PSMD14 as a novel potential target, as prognostic factor and may play an important role in melanoma pathogenesis.

Previous studies have shown that PSMD14 confers a growth advantage in several types of cancer including melanoma (Chen et al., 2017; D'Arcy et al., 2015; Gallery et al., 2007; Luo et al., 2017) (Yokoyama et al., 2020). To further investigate the role of PSMD14 in melanoma, we knocked down PSMD14 in BRAF mutant cell lines 501Mel and A375 by using three independent siRNA sequences and monitored cell proliferation by live-cell imaging. Consistent with the results of our screen, all three siPSMD14 sequences severely reduced melanoma cell proliferation after 30h to 48h of transfection (Figure 1 D/E). Growth inhibition induced by PSMD14 depletion was associated with the downregulation of the cell-cycle dependent kinase CDK2 and a strong induction of the CDK inhibitor p21Cip1 (Figure 1D). A massive accumulation of polyubiquitylated proteins was also observed in PSMD14 depleted melanoma cells (Figure 1 supp I), in agreement with previous studies that have attributed to PSMD14/RPN11 a major role in deubiquitination and proteasome-mediated protein degradation (Verma et al., 2002). Clonogenic growth is a hallmark of malignant cells. We therefore performed a colony formation assay with melanoma cell lines depleted or not of PSMD14. Compared with cells transfected with control siRNA, A375 and 501Mel cells transfected with PSMD14 siRNAs were no longer capable of forming colonies after 7 days, indicating that PSMD14 expression is required for melanoma clonogenic growth (Figure1 suppJ/K). We next examined the role of PSMD14 on cell survival of a collection of melanoma cell lines with diverse mutational status and metastatic potential and representative of three major subtypes of melanoma based on the frequency of BRAF, NRAS and NF1 mutations (Cancer Genome Atlas, 2015). PSMD14 was knocked down in seven melanoma cell lines harbouring activating mutations in BRAF (WM793, WM9, G361) and in NRAS (Sbcl2, WM2032) or hemizygous deletion of NF1 (MEWO), as well as in two short term cultures from metastatic melanoma with BRAFV600E mutations (M029 and MM099) (Figure 1F). After 72h the crystal violet staining of cell cultures was quantified. Compared to siCtrl, we found that PSMD14 depletion strongly reduced melanoma cell viability regardless of the type of oncogenic driver mutation and regardless of their transcriptional cell state and their metastatic potential. PSMD14 is apparently required for the proliferative function of melanoma cells, so the acquisition of PSMD14 overexpression in A375 is sufficient to promote proliferation and long-term colony formation (Figure 1 supN & Figure 1 sup O). Conversely, the introduction of the mutant version of PSMD14, with a substitution of the two reactive histidines of the MPN/JAMM motif (His113/115Ala) (Figure 1 supp L), prevents cell proliferation and the emergence of cellular clones ( Figure 1 supp N/O/P). Western blot profiling shows that both wild type and mutant protein levels of exogenous PSMD14 were clearly overexpressed in A375 (Figure 1 supp M). These results suggest that PSMD14 controls melanoma cell proliferation, a function that is both dependent on its expression but requires a functional JAMM motif. Thus, we investigated PSMD14 activity on melanoma survival by using quinoline-8-thiol (8TQ- PSMD14i as

a selective inhibitor of the JAMM domain of PSMD14, recently described (Perez et al., 2017). PSMD14i exhibited the similar 50% inhibition of cell growth (IC<sub>50</sub> - 0.25 to 0.75 μM) across a variety of human melanoma cell lines (MM099, MM029, Sbc12, 501Mel, WM9 and MEWO), short-term cultured cells or on murine lines (Yumm1.7 and MaNras) (Figure 1G). This result is consistent with those previously reported on a melanoma cell from NCI-60 human tumour cell lines (Li et al., 2017) and we report that PSMD14i (8TQ) markedly inhibited melanoma cell viability irrespective of the mutational status or the disease stage. Western blot reveals mechanism of this sustained dose-dependent inhibition or loss of PSMD14 function is responsible for both accumulation of high molecular weight ubiquitin conjugates as previously described (Figure 1 supp I/Q), but also induces apoptosis with caspase 3 activation and poly ADP-ribose polymerase (PARP) cleavage (Figure 1H) and increased Annexin V/PI propidium labelling analysed by flow cytometry (Figure 1 supp R). Evaluation of anti-cancer activity and efficacy of PSMD14i and PSMD14 depletion on a 3D spheroid multicellular model results in a significant regression of spheroids size an indicator of proliferative inhibition (Figure 1 supp T) and a decline in cell viability through increased incorporation of ethidium homodimer-1 from compromised cell membranes and loss of fluorescence of calcein AM marker of metabolically viable cells (green fluorescence), whereas the 10-day-old control spheroids remained viable (Figure 1 supp S). Thus, regardless of in vitro culture designs, these findings are consistent and point to a key function of both PSMD14 activity and its expression on critical tumour cell proliferation and survival processes. Apoptosis induction was associated to DNA damage, assessed by phosphorylated histone H2AX accumulation at 48h of PSMD14i treatment in the two distinct melanoma lines (Figure 1i) or following PSMD14 depletion (Figure 1 supp U) visible by a significant increase of nuclear localized damage foci (Figure 1J). Keeping in mind a possible translation of our observations to the clinic, we tested the anti-tumoral impact of PSMD14i treatment on the tumor growth rate of Yumm1.7 cells and MaNRas cells, which derive from BrafV600E/Pten null/cdkn2a null mice (Meeth et al., 2016) and NRasQ61K mice (Petit et al., 2019), respectively, after s.c. injection in C57BL/6 mice (Meeth et al., 2016). Importantly, both Yumm1.7 and MaNRAS cells showed similar sensitivity to PSMD14 inhibition compared to human melanoma cells (Figure 4C). PSMD14i treatment following the formation of tumors of 1 mm<sup>3</sup> in volume, leads to a reduction of both Yumm1.7 and MaNRAS tumor growth in tumor growth (Figure 1 K). Immunostaining analysis of YUMM1.7 tumor sections following PSMD14i treatment compared to control tumor (vehicle) is associated with decrease in proliferation markers (Ki67) and conversely an increase in apoptotic and DNA damage markers, cleaved caspase 3 and γ-H2AX respectively (Figure 1 L). Altogether, these results demonstrate that PSMD14 plays a critical role in melanoma cell survival in vitro and in vivo regardless of the oncogenic mutation.

#### **PSMD14 interact and modulated UbH2A**

---

Overall, many questions remain on the mechanisms by which PSMD14 affects melanoma cell homeostasis, fate, proliferation, and survival. Some of these functions may be related to the proteins that PSMD14 interacts with. To identify new candidate PSMD14 interaction partners and further investigate the molecular function of PSMD14, we subsequently performed immunoaffinity purification experiments in a human malignant melanoma A375 cell line stably express HA-PSMD14 or HA-GFP followed by a mass spectrometry (MS) proteomics approach. The MS raw files acquired with data MaxQuant Software have identify 705 distinct interacting proteins in triplicate proteomics analysis of every condition represented by at least one unique peptide. The results plotted several significant differences in protein abundance between HA-PSMD14 and HA-GFP expressed sample (Figure supp 2A). We establish an ontological enrichment analysis of PSMD14-associated proteins after immunoprecipitation. The analysis of gene ontology (GO) significantly shows a significant clustering of biological process associated with protein deubiquitination (GO:0016579), proteasome assembly (GO:0043248) with identification of constituent of protein proteasome like PSMD7,PSMD6,PSMD12,PSMD11,PSMD13 which is consistent with the results reported previously in yeast proteasome (Lander et al., 2012). Further, Protein functions associated with chromatin remodelling and DNA damage (GO:0006342: chromatin silencing ; GO:0006303 : double-strand break repair via nonhomologous end joining, GO:0040029 regulation of gene expression, epigenetic) included included several histone implicated in chromatin structure and modification (H2A,H2AFX, H2B, H3B,H4) (Figure 2A). This Proteomic analysis suggests that PSMD14 may be involved in epigenetic regulation such as DNA/RNA or histone modification and chromatin remodeling. Based on the list of specific hits, STRING analyses of newly-identified, known, and predicted protein–protein-interactions of PSMD14 and its binding partners revealed a network of proteasome assembly and histone proteins with abundant functional relations between most members identified (<http://string-db.org>) (von Mering et al., 2005) (Figure 2B). PPI analysis, revealed multiple PSMD14-associated complexes outside to proteasomal assembly which suggest previously unknown functions of PSMD14. Additionally, the STRING network analyses placed Histone variant in a functional node with proteasome assembly and PSMD14 as well as other proteins involved in DNA replication and repair. Moreover, the mass spec results revealed increased potential interactions of PSMD14 with metabolic enzymes (ALDO, ENO1), ribosome complex (e.g., eEF1A1, Rps11, Rps27A), and components of the cytoskeleton (complete list in the suppl). No such peptide was identified in control enhanced GFP pulldowns, strongly suggesting the specificity of the interaction partners. Histone ubiquitination is a critical epigenetic mechanism regulating DNA-driven processes such as gene transcription and DNA damage repair. Moreover, H2A and ubiquitination state has been implicated in tumorigenesis and melanoma progression (Rai et al., 2015) (Barbour et al., 2020). To further support this deduction of the potential interaction of PSMD14 with histone variant proteins, we exploited analysis from recently published PSMD14 interactome dataset in two cancer types (Wang et al., 2019) (Sun et al., 2021a). Exploitation of these datasets reveal that histones are found to interact with PSMD14, suggesting conserved

patterns of interaction between histone proteins and PSMD14 in several cancer types even in the chromatin-bound histones fraction in yeast (Challa et al., 2021) (Figure 2C). This finding led us to hypothesize that PSMD14 might interact with variant histone H2A and facilitate histone deubiquitination and acts as the inverse role of the main E3 ubiquitin ligases, known to mediate monoubiquitination of H2A and transcription repression (Figure D). To address H2A binding to PSMD14, co-immunoprecipitation assays were performed A375 cell line expressed HA-PSMD14 proteins. In addition to a number of proteins known to co-immunoprecipitate with PSMD14, PSMD12 and PSMD7, we identified H2A partners as PSMD14-interacting protein candidates (Figure 2 E). Furthermore, interactions between PSMD14 and H2A was tested by the pull-down HA-based assay using Flag-tagged H2A and HA-tagged PSMD14 in HEK. As shown Figure 2F, HA-PSMD14 was purified by HA-beads, more importantly, Flag-H2A was also pulled down with PSMD14, confirming the direct interaction between PSMD14 and histone H2A. Taken together, these data suggest that H2A is a *bona fide* interactor of PSMD14 and showed that it is not specific to melanoma cells. we next investigated whether the level ubiquitination conjugates to H2A was specifically due to the catalytic DUB activity of PSMD14. Although ubiquitination has been observed on H2A lysine residues K129 and K15, ubiquitination predominately occurs on H2A lysine residue K119 (abbreviated as UbH2A). we generated PSMD14-protease inactivated H113A/H115A (Histine substituted termed JAMMM), two-point mutations in zinc-binding protein that contains JAMM motif which abrogated deubiquitination, previously describe like catalytically dead mutants of PSMD14 (Gallery et al., 2007) (Verma et al., 2002). The transfection of wild-type PSMD14 in HEK cells decreased UbH2A levels, which is up regulated after 6h of PSMD14i treatment. In contrast, transfection of HA-PSMD14 JAMMM mutant maintained high level of UbH2A compared to wild-type form (Figure 2G). In addition, melanoma cells treated by PSMD14i (8TQ) resulted on up regulation of UbH2A level in both dose and time dependent manners but did not affect H2A level (Figure 2H). Conversely, PSMD14 depletion increase the abundance of UbH2A (Figure 2I), independent to proteasome activity, after MG132 treatment (Figure 2G), suggesting PSMD14 level and deubiquitination-associated enzymatic activity regulates levels of H2A ubiquitination independently of its intrinsic role in the 26 proteasome system. This result was in agreement with previously observations obtained in HEK cells, as PSMD14 be part of DUBs family identified to be able to deubiquitinate H2A in vitro (Li et al., 2019b). We demonstrate that PSMD14 levels and its activity mediate this balance between hypo- and hyper-H2AK119ub1

### PSMD14 depletion-related cell death depends on UbH2A level

---

PSMD14 appears to be a novel compound modifying the H2A ubiquitination (UbH2A) state, which remained a critical epigenetic mechanism to control chromatin-based nuclear processes such as gene transcription, DNA Replication and Repair and has an impact on the transduction of essential intra-cellular signals for cell proliferation and survival(Cai et al., 2021). To integrate the transcriptional role of PSMD14



dependent on H2A ubiquitination in proliferation and survival, we reused publicly available data from the studies of Zhang et al 2017 and He et al 2019 on gene silencing induced by histone H2A ubiquitination (He et al., 2019) (Zhang et al., 2017). We selected 27 genes for which a Gene Ontology (GO) analysis shows their involvement in regulatory apoptotic process (MCL1, BCL2, STEAP3, KCNMA1, TNFRSF19, TNFRSF10A, NF2, JAK2, DKK1, TBX3), initiation and transcription (TGFA, SOX2, HMGA2, NFATC1, NFATC2), cellular metabolism (HMGA2, PFKFB3), cell proliferation (WNT10, SPP1) and the homeotic genes (HOXC4, HOXA1, HOXB1, HOXD11, HOXB7) (Figure 3A supp). The identification of candidate genes is based on the occupancy of transcription initiation sites by binding of the ubiquitinated form of H2A by immunoprecipitation and chromatin sequencing (ChIP-seq) and are significantly involved in melanoma progression from previous data related to PSMD14. Using the TCGA dataset, the signature of UbH2A regulated genes are positively correlated with PSMD14 expression ( $R = 0.37443$   $p = 3.329e-17$ ) (Figure 3A). conversely this gene set signature of UbH2A binding appeared to correlate negatively with RNF2/Ring1B expression the subunit of the repressive Polycomb 1 complex (PRC1) that catalyses the ubiquitination of H2A ( $R = -0.3251$   $p = 3.972e-13$ ), indicating that PSMD14 and RING1b are most likely functioning in the same pathway in opposite directions to regulate the expression of these genes (Figure supp 3B). Subsequently analysis of a set of UbH2A-dependent genes are found to vary in expression according to PSMD14 expression and activity, so acquisition of the wild type of PSMD14 in A375 enhances the expression of these genes and are reduced by the mutant form of PSMD14 (JAMMM) (Figure 3B). This result is consistent not only at the transcript level but also at the protein level, with expression of the wild type of PSMD14 as compared to the control or mutant vector (JAMM) resulting in an increase in MCL1 expression coupled with a decrease in the levels of H2A ubiquitination (UbH2A) (Figure 3C). In addition, MCL1 expression is dependent on PSMD14 dose-expression associated with the degree of H2A ubiquitination (UbH2A) (Figure 3D) in HEK (Figure 3D). This PSMD14 and MCL1 proteins correlation was also found in 30 distinct melanoma strains ( $r = 0.362$   $p\text{-value} = 6.64e-2$  [depmap.org/](http://depmap.org/)), also in most of the TCGA cancer lists (Figure supp C & D). MCL1 is an anti-apoptotic protein and high expression in melanoma cells is related to tumour progression as well as to targeted therapy resistance (Fofaria et al., 2015). In an examination of the amount of MCL1 protein and messenger as well as the UbH2A-dependent gene set are impaired upon depletion of PSMD14 in A375 (Figure 3E and 3F). Subsequently, we sought to address the extent to which the ubiquitination of the H2A variant is functionally involved in PSMD14 depletion-induced death and proliferation arrest. The RING1B ubiquitin ligase (RNF2) known to promote ubiquitination of H2A, was knocked out in melanoma cells lacking PSMD14 leading as readout a drop of ubiquitination level of H2A (Figure 3G). This dual inhibition, as compared to PSMD14 depletion, resulted in a significant decrease in cell death visualised in real time (Figure 3H) also a reduction of apoptotic markers such as PARP cleavage and restoration of protein expression of MCL1 and BCL2 (Figure 3G). In addition, the proliferative assay performed on three distinct melanoma lines shows that a combined PSMD14 and RNF2 depletion appears to partially reverse the arrest of proliferation

induced by PSMD14 deletion alone or relative to the control (Figure 3I). Overall, these results indicate that the PSMD14-related cell death mechanism is mediated by UbH2A-dependent transcriptional control of survival genes.

#### PSMD14/UbH2A axis are implicated in MAPK inhibitor response.

---

As we have shown that PSMD14, by modulating the ubiquitinated form of the H2A variant, promotes melanoma proliferation and survival, we next asked whether this axis contributes to the melanoma response to MAPK inhibition. Functional enrichment of genes in eleven melanoma cell lines exposed to MAPK pathway inhibitor from the GSE98314 data set, using GO annotation of Biological Processes (BP) revealed, common network previously observed an up-regulation of the fatty acid-related metabolic process or down-regulation of the most significantly enriched genes in the category of glycolysis, cell cycle, DNA repair process, followed interestingly by the GO family associated with deubiquitinase proteins (GO:0016579) NES = -2.030 P = 3.01E-16) and UbH2A signature genes (NES = -1.79 , P =0.000081) (Figure 4 - Figure 4A supp) (Ryu et al., 2011) (Ahn et al., 2019). To provide a more detailed overview of the expression patterns of gene specific of deubiquitinase proteins ontology, the heap-map of the hierarchical expression genes found that in eleven melanoma, BRAFv600E pathway affect drastically PSMD14 expression (Figure 4B). Similar observation on PSMD14 expression is significantly down regulated on data set (GSE35230) from melanoma cells under mono and/or combo therapy targeted therapy to MEK1/2 Kinase inhibitor (GSK212-trametinb) with BRAF inhibitor (GSK436-BRAF inhibitor) (Figure 4B Supp) (Greger et al., 2012). Besides bioinformatics analysis, we showed that PSMD14 level was dramatically down regulated after exposure to combination of BRAFi and MEKi in A375 cell line. This diminution is visualized to protein level but also in mRNA level after melanoma cell treatment with BRAFi/MEKi (Figure C et Figure C supp). To investigate the degree of correlation between the level PSMD14 and UbH2A and whether an increase in target therapy in melanoma concentration affects this degree. We further examined the effect of combination on the ubiquitylation of endogenous H2A and the level of PSMD14. We observed under dose dependant treatment of BRAFi/MEKi which induce a progressive strong inhibition of P-ERK1/2 we observe a up regulation of ubiquitinated form of H2A and a down regulation of PSMD14 (Figure 4C). Furthermore, the level of UbH2A and the diminution of PSMD14 is associated to the degree of viability induce by combination BRAFi/MEKi and apoptosis (Figure 4Dsupp). To analyze the effect of the increased of MAPKi concentration on cell growth and death, we monitored cellular density in the absence or presence of the inhibitor over 2-day period using Incucyte system (Figure 4D supp). Compared with the low dose, highest dose combination which induce strongly up regulation of UbH2A level in A375 associated to stop in cell proliferation and had an enhanced effect on cells death. Thus, we suggested that ubiquitylation of H2A is an important event in BRAF signalling pathway and in response to target therapy. To further elucidate the function of PSMD14/UbH2A after BRAF signalling treatment, we explored whether the change in the ubiquitylation of

H2A plays a role in response to drug treatment. To manipulate the level of UbH2A in cells, the reduction, or the up regulation of global UbH2A level is maintained after in RNF2(RING1B) and PSMD14 down regulation respectively and A375 are exposed to BRAF inhibitor and MEKi for 48h (Figure 4D). Exposing parental sensitive cells to RNF2 depletion reduced the efficacy of BRAF/MEK inhibition, and these effects were most significant after 14 days (Figure 4B supp) and produces drug tolerance. Inversely effect is observed in PSMD14 depleted melanoma cells with absence of persistence and resistance cell line apparition in long-term BRAFi/MEKi treatment (Figure 4D supp & Figure 4F supp ). We next examined combination treatment with vemurafenib/cobimetinib and PSMD14 depletion in melanoma cells. The combined treatment significantly enhanced apoptosis, visualized and quantified by an increase in real time cell death marker (Figure 4E/4Esupp) associated with PARP cleavage coupled with an elevated level of UbH2A compared to either agent alone upon short term treatment with mitogen-activated protein kinase (MAPKi) inhibitor (Figure 4F). Moreover, PSMD14 inh in combination with and BRAFi/MEKi treatment also significantly have a synergic effect on melanoma cell lines (Figure 4G supp) and associated with a concomitant decrease in the size of the colonies after long treatment (Figure 4H /Figure 4Fsupp). At this stage, we are trying to establish the possibility of PSMD14 as a gene implicated for monitoring BRAFi resistance and relapse due the control of transcriptional network governed by UbH2A. To further investigate the function of PSMD14 in the modulation of melanoma response to MAPKi. A375 melanoma cells stably overexpressed PSMD14 under dose dependant of the combination BRAFi/MEKi are less sensitive to compared control A375 GFP melanoma cells (Figure 4G). Moreover, ectopic expression of PSMD14 significantly stimulate the colony formation capacity of melanoma cell lines in the presence of BRAFi/MEKi over the 21-day experimental time course (Figure 4H). Importantly, the colony number was reduced by 90% in cells expressed PSMD14 mutant form or under PSMD14i following BRAFi/MEKi treatment, indicating a synergistic effect upon combined inhibition of BRAF and PSMD14 (Figure 4H). Relationships between PSMD14 genes and MAPKi response, have been provide by using assistance web cellMinerCDB (<https://discover.nci.nih.gov/cellminerfdb/>). PSMD14 expression significant negative correlated with BRAF inhibitors (Vemurafenib- 761431  $r=-0,83$ ,  $p=0.0059$ ) in The National Cancer Institute 60 (NCI-60) cell line datasets in skin melanoma suggested that PSMD14 expression as a causal determinant of response to MAPK-targeted anticancer agents (Figure 4Hsupp). In order to ascertain the hypothesis, the role of PSMD14 in melanoma to therapeutic response we evaluated PSMD14 expression in differentiated lines (M229 and M238 – GSE75299) were exposed to chronic exposure to BRAFi and analyzed at different days of treatment until resistance acquisition (Song et al., 2017). We observed in both cell lines a down regulation of PSMD14 in early response and increased during the phase of drug-tolerant proliferating persister cells until arrive to similar level or upper in resistance phase (Figure 4I). Western blot analysis of PSMD14 have been performed in A375 during early, adaptive proliferative and resistance phase to MAPKi. Like previously, in the first phase treatment PSMD14 is down regulated associated to an increase of UbH2A, this ration is established in

adaptive/proliferation phase (Figure 4J). Moreover, similar results are observed on published scRNA-seq data analysis from BRAF-mutant PDX model undergoing BRAF and MEK inhibition, PSMD14 expression is significantly downregulated on correlation with UbH2A signature genes during the initial phase treatment and partially or totally restored during relapse in resistant melanoma cells (GSE116237) (Rambow et al., 2018) (Figure 4K). To evaluate the clinical relevance of the axis PSMD14 /UbH2A in melanomas from patients who develop acquired resistance to MAPK inhibitor treatment, we compared their expression levels pre- and post-treatment tumour biopsies, following progression on treatment (GSE65186) (Hugo et al., 2015). The expression of UbH2A signature genes is significantly increased in relapse samples and PSMD14 is increased in 44% of patients resistant to MAPKi treatment (48%, n = 21) (Figure 4I supp). Given the importance of gene signatures implicated in melanoma phenotype switching acquired resistance to BRAF inhibition (Tsoi et al., 2018). Thus by using the TCGA database, PSMD14 expression is in inverse correlation to melanocyte differentiation markers Dopachrome Tautomerase (DCT), Melan-A/MART1, Tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein-1 (TYRP1); and positively correlated with melanoma-initiating cells NGFR and the receptor tyrosine kinase AXL (Figure 4J supp). Many of these genes have been associated with both enhanced tumor invasion and resistance to MAPK pathway inhibitors (Muller et al., 2014) (Konieczkowski et al., 2014). Moreover, among 52 cell lines previously categorized on their differentiation states (Undifferentiated, Neural crest-like, Transitory, or Melanocytic - <http://systems.crump.ucla.edu/dediff>), PSMD14 expression is significantly expressed in dedifferentiated cells (Figure 4K supp) suggesting PSMD14 role in MAPKi melanoma response (Tsoi et al., 2018). To translate the bench results into clinical practice, the effect of PSMD14i in melanoma cells in combination with BRAF/MEK inhibitors was further explored. The in vivo experiments showed that compared with vehicle or MAPKi, the combined administration of MAPKi and PSMD14i significantly inhibited the early response growth of xenografts and relapse phase observed on MAPKi treatment alone, suggesting that PSMD14i improved the chemotherapeutic efficacy in melanoma (Figure 4L). Overall, these findings indicate that PSMD14 inh could serve as a promising adjuvant to increase target therapy in melanoma. Together, these data in vivo and in vitro support the modulation of PSMD14/UbH2A gene signature in contributing to relapse, suggesting their involvement in establishing drug-tolerant and/or resistant phenotypes in vivo. Finally, based on cellular, biochemical and bioinformatics approaches, we propose a novel biological role for the deubiquitinating enzyme PSMD14 to interact and modulate histone H2A ubiquitination, an epigenetic player of transcriptional repression involved in melanoma cell survival, DNA damage and proliferation (Figure 4M). Sustaining low levels of H2A mono-ubiquitination, by high levels of PSMD14, both maintains and contributes to improving cell survival and MAPK targeting therapy resistance. Conversely, deep PSMD14 downregulation coupled with increased UbH2A leads to cell proliferation arrest, death, DNA damage and synergizes with MAPK-targeted therapies by significantly affecting the initial response to treatment and reduces the appearance of resistant melanoma cells (Figure 4M).

## Discussion

---

Since altered progression of the cell cycle leading to uncontrolled proliferation remains a fundamental feature of melanoma (Shen et al., 2014) (Hanahan, 2022), our targeting to this vulnerability spot using a library of siRNAs directed against Deubiquitinases (DUBs) *in vivo* remain on an interesting approach both for their involve of key actors of cell cycle regulation (Park et al., 2019) (Ohanna et al., 2022) and for developing novel therapeutic agent against cancer, particularly melanoma (Xu and McArthur, 2016) (D'Arcy et al., 2015). Considering the role of protein deubiquitination processes, the reverse process of ubiquitination is a post-translational modification, which affects almost all cellular functions such as apoptosis, cell cycle progression and transcription. The DUBs contribute to the removal of ubiquitin from target proteins and are implicated in the maturation, recycling and modification of ubiquitin. There is growing evidences linking deubiquitinating enzymes (DUBs) to melanoma progression and dissemination (Didier et al., 2018) (Ohanna et al., 2022). In this study, we have identified and investigated the top-ranked gene from genetic screening combined with directed bioinformatics analysis that out of the seven DUB families, zinc metalloprotease PSMD14, a 19S regulatory particle subunit of 26S proteasomes, has a crucial and essential role in melanoma cell proliferation/survival processes and its expression was related to melanoma grade and poor prognosis. PSMD14 research has been documented to be involved in the tumorigenesis of many cancers and recently in melanoma however its mechanism of action has not yet been uncovered (Yokoyama et al., 2020).

initially described PSMD14 is alone essential in *Saccharomyces cerevisiae* and mammals, both in terms of deubiquitination activity and its stabilizing role in proteasome structure (Verma et al., 2002) (Gallery et al., 2007). Our assay has identified USP14 which is another proteasome-related DUB that was previously investigated by our team (Didier et al., 2018). The loss of USP14 is linked to an anti-proliferative phenotype in melanoma cells. However USP14 has less weight on the anti proliferative effect than PSMD14 which is part of the proteasome subunit. This suggested that despite a similar effect on proliferation, USP14 has functions distinct from those of the proteasome constituents. This is consistent with reports that USP14 and PSMD14 are in competition to bind the substrate ubiquitin signal with differing ubiquitin release kinetics (Bashore et al., 2015). As suspect, PSMD14 function on proliferation and survival was initially and fundamentally highly conserved during evolution (Maytal-Kivity et al., 2002). We sought to knock down PSMD14 in various types of melanoma carrying mutations and all attempts led to cell death after 5 rounds of doubling. *In vivo* experimental data analysis shows that PSMD14 is one of the hits whose inactivation leads to the dramatic inhibition of tumor growth in the two metastatic melanoma PDXs carrying BRAF (MM27) or NRAS (MM13) mutations (Granieri et al., 2022). These data support the role of PSMD14 as an oncogene in melanoma, in a genetic background independent manner. Most recently, with a genome-wide

RNA interference (RNAi) screen in A375, PSMD14 was one of 622 genes whose alteration was shown to be essential for melanoma survival along with cell cycle, translation and ribosome regulators (Smith et al., 2022). Bioinformatic examination of a wide range of PSMD14 knockout cancer cell lines indicated PSMD14 to be an essential gene for cell survival (Meyers et al., 2017) (Doherty et al., 2022). As an aside, two additional DUBs PRPF8 and USP36 have been identified in our screen and have been reported to be essential for proliferation in cancer cell lines within the DepMap (Doherty et al., 2022). Both of these non-proteasome candidates correlate respectively with splicing factors and control the stability of MYC (Sun et al., 2015) or EZH2 (Histone-lysine N-methyltransferase) (Li et al., 2019a) and may present for similar functions to PSMD14 identical substrates or part of the same interaction network in the PPID data or co-dependent relationships in the DepMap, providing additional confidence in the validity of our approach and subsequently to be considered promising therapeutical targets in melanoma.

Furthermore, we report the direct impact of PSMD14 deletion and study the essentiality on specific cancer cell types. By comparing DepMap data between collections of cell lines that had been split based on tissue of tumor origin, PSMD14 has a greater impact on the proliferation of melanoma cell lines than any other tumor type in the DepMap. Our results suggests the value of further examining PSMD14 in skin cancer and points to its pivotal role in the proliferation and survival within melanoma cells.

We examined the prognostic potential value of PSMD14 in melanoma and report that both RNA and protein expression levels were significantly higher in tumor tissues than in normal tissues using GEPIA and Proteome Atlas online database analysis on immunohistochemical data. In two independent datasets the expression data of PSMD14 shows a notable profile difference in metastasis tumors compared to primary tumors/nevi. This result is reinforced by the identification of PSMD14 mRNA changes by in situ hybridization (ISH/TMA) in melanoma samples as compared to normal tissues and belongs to the previously described DuBs such as USP10, USP11 and USP22, which are associated with a more aggressive and invasive phenotype related to clinico-pathological parameters (Luise et al., 2011). However, no such parameters as Breslow depth value, T/N/M stages and Clark level, have been associated with PSMD14 expression. In our screening these DUBs have no impact on the proliferation of melanoma cells. The expression of PSMD14 as a bad prognostic is not restricted to melanoma but is found in several types of human cancers, including hepatocellular carcinoma (HCC) (Lv et al., 2020) esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) (Jing et al., 2021b), osteosarcoma (Gong and Wei, 2022) lung adenocarcinoma (Zhang et al., 2020) and breast cancer (Lee et al., 2022), This suggests that PSMD14 could be considered as an emerging biomarker potential prognostic marker to forecast metastatic potential and therapy response. Yet, due to the uncharacterized direct substrates of PSMD14, the underlying mechanisms by which PSMD14 inhibition exerts anticancer effects are unclear and remain uncertain in melanoma.

Molecular events proposed in previous studies implicates PSMD14 in tumor cells able to alter the stability of key players involved in cell cycle/senescence and survival pathways such as the transcription factor E2F1 (E2F1) and its target genes survivin and forkhead box M1 (FOXO1) in hepatocellular carcinoma, lung carcinoma (Byrne et al., 2010) (Wang et al., 2015) (Jing et al., 2021a), the ErbB2 receptor (Liu et al., 2009), c-jun (Nabhan and Ribeiro, 2006), the microphthalmia-associated transcription factor (MITF) (Schwarz et al., 2010) and more particularly in melanoma PSMD14 participates in the control of p27Kip1 (p27) expression by modulating the stabilization and activation of SMAD3 (Yokoyama et al., 2020). Our results are consistent with these previous observations, the cell cycle arrest observed in the absence of PSMD14 in melanoma cells is enrolled with a decrease in CDK2, MITF, E2F1 mRNA and an increase in p27 protein. In contrast, the decrease in E2F1 or MITF was transcriptionally driven suggesting that PSMD14 is able to have a distinct substrate repertoire depending on the pathology. We show that the presence of an intact JAMM motif, the region responsible for the DUB catalytic activity of PSMD14, is necessary to maintain melanoma both 2D and 3D proliferation of melanoma cells in vitro. In spite of the extensive evidences of PSMD14 controlling cell cycle and tumor growth in various tumors, as well as various molecular pathways, the functional roles and specificity of PSMD14 remain to be explored in melanoma. To explore possible functional mechanisms involved in melanoma malignant progression related to PSMD14 expression, a co-dependent genes associated with enrichment analysis (GSEA) from skin cancer TCGA, revealed that high expression of PSMD14 is positively associated with cell cycle related gene alterations (HALLMARK\_G2M\_CHECKPOINT and HALLMARK\_E2F\_TARGETS but also with altered metabolic signatures (TORC1/MYC signaling activation). Additional support from DUBportal (<https://labsyspharm.github.io/DuBportal>) strengthen this notion in a more general context derived from the loss of PSMD14 is not only involved in cell cycle (HALLMARK\_E2F\_TARGETS HALLMARK\_G2M\_CHECKPOINT) as earlier but also in DNA repair), chromosome organization (GO:0005694) and reactome related to epigenetic regulation of gene expression (PRC2 methylates histones and DNA). Previous reports have highlighted that among 19S subunits, specifically PSMD14 by localizing to DNA damage sites and engages in correct coordination of DNA damage response protein assemblies (Wang et al., 2009) (Tsolou et al., 2012). Likewise, we proved PSMD14 participates in the maintenance of genome integrity by affecting the phosphorylation (S139) of  $\gamma$ H2AX.  $\gamma$ H2AX, is a variant of the core histone protein H2A at the onset of DNA DSBs can respond to DSBs.  $\gamma$ H2AX has been considered to match the characteristics of a DNA damage sensor (Sharma et al., 2012). Under PSMD14 depletion,  $\gamma$ H2AX foci persist over time, with greater accumulation after 48 h even without exposure to DNA damage induction. the same result is achieved upon inactivation of its activity using PSMD14i (capzimin). This supports PSMD14 function in both replication and/or repair of endogenously generated DNA damage. In combination with serious cell damage, loss of cell viability dependant to PSMD-14 leads to dysregulation of apoptosis by increasing the protein levels of p53 and its targets such as p21 with PARP and caspase 3 cleavage, which have been previously identified in other cancer models. (Luo et

al., 2017) (Wang et al., 2018). We found cell death not affected by z-VAD (an inhibitor of apoptosis) or ROS inhibition but partially by the P53 pathway, a mechanism previously reported (Wang et al., 2018). We are not ruling out dependencies on pathways modulating cell death such as Paraptosis recently implicated by PSMD14 independently of its action on proteasome (Lee et al., 2022).

While in other cancers the cell cycle arrest/cell death and DNA damage phenotypes induced by loss of PSMD14 have been described, no research has investigated the underlying molecular mechanisms by interrogating the proteomic network of PSMD14 protein-protein interaction in melanoma. We report the identification of numerous substrate proteins of PSMD14 and particularly its interaction with histone variant H2A by participating in the control of the abundance of the monoubiquitination level on lysine 119 (K119), plays an important role in melanoma proliferation and survival. The PSMD14-related interactome reveals links to numerous variant histone proteins including macro-H2A.1 (H2AFY), HIST1H4A, HIST1H2AH. These variant histones package eukaryotic DNA into nucleosomes and undergo numerous post-translational modifications (PTMs) that regulate all processes mediated by chromatin dynamics, including transcription, DNA repair and replication (Bowman and Poirier, 2015). To strengthen this finding, by mining two existing large-scale PSMD14 protein-protein interaction databases in cancer cells as well as the Biogrid reference database (<https://thebiogrid.org/115508/table/homo-sapiens/psmd14.html>), histone variants appear among the candidate interactors. We therefore validated the histone variant H2A as a target protein of PSMD14. Intriguingly, these findings are consistent with the evidence of PSMD14 localization in the nucleus (and physical interactions with proteins enriched in heterochromatin or recruited to the chromatin fraction following DNA damage (Zukowski et al., 2019) (Challa et al., 2021). The proteomic analysis associated with PSMD14 has also identified several polypeptides substantially enriched in isolated H2A nucleosomes: BMX (RNA-binding motif protein, X chromosome), SF3B2 (Splicing factor #B subunit 2), SSRP1 (FACT complex subunit SSRP1). This results lend further credence to that PSMD14 is probably associated with a complex of proteins that have an affinity for H2A nucleosomes reinforcing its role in H2A chromatin remodeling (Zhang et al., 2017). By the way, PSMD14-related interactome analysis reveals an enrichment for the PSMD14 proteasome partner process previously shown to be essential for melanoma survival (Smith et al., 2022), is one of the genes that affects cell viability as well as other major hubs that connect cell viability networks to glycolysis (ALDO, ENO1) and RNA translation composed components of the translation initiation complex (EIFG4), which may coordinately regulate metabolic and cell viability responses. The involvement of several of these interacting proteins will be explored further. One of these PTMs is the monoubiquitylation of histone H2A (UbH2A) at lysine 119 occurring on 10% of total cellular H2A. Whereas this ubiquitination was observed on H2A lysine (K) residues 129 and K15, ubiquitination occurs primarily on H2AK119 (Kalb et al., 2014). H2A ubiquitination is an epigenetic mechanism by which cells adjust gene expression, DNA damage repair, chromatin structure and function, and cell identity and fate. Alterations in



histone ubiquitination level regulatory machinery are frequently altered in cancers, including melanoma pathology (Jeusset and McManus, 2019) (Mattioli and Penengo, 2021). To our knowledge Histone H2A monoubiquitination is highly dynamic and involves cycles of ubiquitination and subsequent deubiquitination. While monoubiquitination of histone H2A by the RING1B/RNF2 ligases belonging to the polycomb repressor complex 1 (PRC1) ring finger ligases leads to transcriptionally silent and compacted chromatin, many DuBs are involved in the opposite process, among them USP16, USP12, USP21, USP46, USP3, USP22 and especially BAP1, MYSM1, USP7 in melanoma (Sparmann and van Lohuizen, 2006) (Pijnappel and Timmers, 2008) (Wilms et al., 2017) (Su et al., 2021). Here we report that the ubiquitin-specific protease PSMD14 acts as a histone deubiquitinase to catalyze H2AK119. Using PSMD14 inactive mutant or its pharmacological inhibition as well as its depletion leads to increased UbH2A levels without affected protein levels of BAP1 or USP22, suggesting that although several DUBs share a common substrate and appear to play distinct roles in vivo. Since pharmacological proteolytic core inhibition of the 20S proteasome did not recapitulate these effects on UbH2A level, we have concluded PSMD14 acts as a new regulatory factor of histone H2A variant ubiquitination state through a non-proteasome-dependent mechanism. In concern with unraveling the relationship between PSMD14, altered ubiquitination of H2A is these consequences on transcriptional regulation. We issued a positive correlation of PSMD14 with genes specifically described to be target of the H2A ubiquitination state called "UbH2A signature". This signature inversely correlated with RNF2 (RING1B) belonging to the polycomb repressor complex (PRC1), suggestive of a new mechanism on the role of PSMD14 affecting uH2A-related transcription (Zhang et al., 2017). Subsequent supplementary genome-wide studies need to be conducted to characterise the UbH2A occupancy associated with the PSMD14 removal and the related transactional alterations in the genome and understand the functions of UbH2A modulators in melanoma. We have demonstrated that RNF2 participate in PSMD14 depletion-related cell death and proliferation. We have observed that loss of RNF2 alone does not impair proliferation of human melanoma cells, in contrast to what is observed in mouse cells more susceptible to this disruption (Rai et al., 2015). Deletion of RNF2 restores the degree of UbH2A to a basal level and improved viability of melanoma cells lacking PSMD14. H2A monoubiquitination by RNF2 is established to silence transcription at the promoters of specific genes such as MCL2 and BCL2 (He et al., 2019) (Cao et al., 2005; Wang et al., 2004). Here, apoptotic phenotype rescue by RNF2 loss in cells lacking PSMD14 is marked by re-expression of both BCL2 and MCL2 pro-survival genes. We have ourselves ascertained that MCL1 protein expression positively correlates with PSMD14 in publicly available expression datasets from melanoma. It is important to note that the melanoma cells that express the wild type of PSMD14 have higher levels of the pro-survival protein MCL-1. The MCL1 anti-apoptotic member has been shown in melanoma to be essential for melanoma survival, most refractory to cell death and impact of BRAF oncogene signaling (McKee et al., 2013; Tang et al., 1998). Consistent with this idea, acquisition of a gain in PSMD14 expression or activity provides a survival advantage in melanoma by promoting Mcl1 expression

through uH2A modulation and fully participates in melanoma pathology. Consequently, alterations in the level of UbH2A and its transcriptional control may contribute to a more comprehensive explanation for melanoma proliferation and cell death lacking tolerance to the loss of PSMD14. Although the question of whether and how the proteasome contributes to the regulation of heterochromatin is unclear and requires further investigation, some evidence suggests a role in maintaining heterochromatin structure (Qin et al. 2009). Here PSMD14, a 19S regulatory particle component of proteasomes, could be characterized as true chromatin remodeling factors directly involved in histone H2A mono-ubiquitination, a potential non-proteolytic role in transcription regulation. Further approaches would be interesting in case the H2A ubiquitination modification by PSMD14 leads to sequential events such as replacement of canonical histones by other histone variants or coexistence of several differently modified nucleosomes bearing other modifications. Thus, PSMD14 is able to bind to the JMJD2A protein, a transcriptional cofactor that catalyzes the demethylation of histones H3 lysine 9 and 36 (H3K9 and H3K36) (Butler et al., 2012) . Therefore, an additional function of PSMD14 related to its level might be to stimulate or repress gene transcription or to modulate association with the nuclear receptor co-repressor complex or direct binding to a transcription factor such as the tumor suppressor p53 (Wang et al., 2018). In melanoma we find this strong genetic correlation between PSMD14 and the chromatin modifiers: JMJD2A and HAT1 (histone acetyltransferase 1) reported to participated to cell proliferation (Li et al., 2020), cell death, metabolic rate (Gruber et al., 2019) and MAPKi resistance (Bugide et al., 2020).

Besides mutational landscaping in melanoma, Epigenetic alterations in chromatin through post-translational modifications (PTM) contribute to cellular plasticity, implying its role in mechanisms of therapeutic resistance in melanoma. In spite of a growing interest in the Molecular actors involved in the acetylation/methylation of histones leading to the clinical introduction of combination immunotherapies or targeted therapies with multiple classes of epigenetic drugs, histone ubiquitination regulation as key mechanisms whereby melanoma cells escape and develop resistance remain untested in this context. In this context, we proposed that the modification of the ubiquitination level of H2A might participate in both the elaboration of genetic diversity, consequently participating in the adaptive process, as well as in genomic instability leading to cell death and proliferation arrest. Our findings reveals for the first time that UbH2A levels are very dependent upon the dose of the MAPKi/MEKi combination; a strong initial response associated with a large increase in UbH2A causes cells to undergo a cell death programme, while at suboptimal doses sufficient to switch off the MAPK pathway, a proliferation arrest without the appearance of death markers results in a lower level of UbH2A. Our results show that cells can readily respond differently to MAPKi by initially modulating their UbH2A level and thus both bypass cell death and proliferation. while molecularly, the role of histone UbH2A has been described in the processes of pluripotency, differentiation and cell lineage commitment, this same strategy can be used by melanoma

cells to change the transcriptional profile necessary to produce cellular phenotypic diversity (Yang et al., 2014) (Tee and Reinberg, 2014). Melanoma resistant to therapy commonly undergoes dedifferentiation. We have observed that the strongest expression of PSMD14 is characterized by loss of melanocytic markers such as MLANA, DCT, and TYR and gain of molecular invasive markers such as NGFR (Fallahi-Sichani et al., 2017) (Denecker et al., 2014) (Rambow et al., 2018) These findings reshape that notion of a PSMD14 in therapy resistance processes observed and in invasion pathways previously described in melanoma and other cancer types (Sun et al., 2021b) (Yokoyama et al., 2020) . Furthermore, UbH2A genes signature and PSMD14 were reported to be modulated during drug treatment and increased in melanoma patients progressing after treatment with BRAF ± MEK inhibitor therapy. Modulating components of the regulatory UbH2AU axis by depletion of RNF2 or PSMD14 impacts on both the response to therapy and the emergence of cell resistance during MAPKi treatment. The occurrence of persistent cells upon treatment is enhanced after depletion of RNF2, inversely a total extinction after PSMD14 loss or activity. RNF2 is one of the ubiquitinases found to modulate the response to targeted therapies, and its loss of function promotes resistance to MAPKi drugs in mutant melanoma (Rai et al., 2015) (Strub et al., 2018). By using CRISPR-Cas9 data base, PSMD14 elimination impacts many genes involved in the adaptation phase of the cell state called MAPKi Escapeur, with a decrease of genes such as AXL, THBS1, MYL12A, ACTB and also the master genes involved in cell cycle and cell escape like CDC20, CDC6, CDK2, CDK2 (Yang et al., 2021). Therefore, we assumed that anti-tumor effect of MAPKi may be enhanced and synergistic with PSMD14 inhibitor. Our results showed that the combination of MAPKi and PSMD14i was able to synergetically inhibit proliferation in vitro and sustain long-term relapse-free in vivo , which is consistent with our hypothesis. Collectively, these large scale systematic analyses support a regulatory significance of the PSMD14/UbH2A axis for the establishment of melanoma cell proliferation and viability during and after BRAF inhibition.

## References

- Ahn, J.H., Hwang, S.H., Cho, H.S., and Lee, M. (2019). Differential Gene Expression Common to Acquired and Intrinsic Resistance to BRAF Inhibitor Revealed by RNA-Seq Analysis. *Biomol Ther (Seoul)* 27, 302-310.
- Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., and Kelly, J.W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319, 916-919.
- Barbour, H., Daou, S., Hendzel, M., and Affar, E.B. (2020). Polycomb group-mediated histone H2A monoubiquitination in epigenome regulation and nuclear processes. *Nat Commun* 11, 5947.
- Bashore, C., Dambacher, C.M., Goodall, E.A., Matyskiela, M.E., Lander, G.C., and Martin, A. (2015). Ubp6 deubiquitinase controls conformational dynamics and substrate degradation of the 26S proteasome. *Nat Struct Mol Biol* 22, 712-719.
- Bowman, G.D., and Poirier, M.G. (2015). Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics. *Chem Rev* 115, 2274-2295.

Bugide, S., Parajuli, K.R., Chava, S., Pattanayak, R., Manna, D.L.D., Shrestha, D., Yang, E.S., Cai, G., Johnson, D.B., and Gupta, R. (2020). Loss of HAT1 expression confers BRAFV600E inhibitor resistance to melanoma cells by activating MAPK signaling via IGF1R. *Oncogenesis* *9*, 44.

Butler, L.R., Densham, R.M., Jia, J., Garvin, A.J., Stone, H.R., Shah, V., Weekes, D., Festy, F., Beesley, J., and Morris, J.R. (2012). The proteasomal de-ubiquitinating enzyme POH1 promotes the double-strand DNA break response. *EMBO J* *31*, 3918-3934.

Byrne, A., McLaren, R.P., Mason, P., Chai, L., Dufault, M.R., Huang, Y., Liang, B., Gans, J.D., Zhang, M., Carter, K., *et al.* (2010). Knockdown of human deubiquitinase PSMD14 induces cell cycle arrest and senescence. *Exp Cell Res* *316*, 258-271.

Cai, G., Yang, Q., and Sun, W. (2021). RSF1 in cancer: interactions and functions. *Cancer Cell Int* *21*, 315.

Cancer Genome Atlas, N. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* *161*, 1681-1696.

Cao, R., Tsukada, Y., and Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* *20*, 845-854.

Challa, K., Schmid, C.D., Kitagawa, S., Cheblal, A., Iesmantavicius, V., Seeber, A., Amitai, A., Seebacher, J., Hauer, M.H., Shimada, K., *et al.* (2021). Damage-induced chromatome dynamics link Ubiquitin ligase and proteasome recruitment to histone loss and efficient DNA repair. *Mol Cell* *81*, 811-829 e816.

Chen, W., Guo, N., Qi, M., Dai, H., Hong, M., Guan, L., Huan, X., Song, S., He, J., Wang, Y., *et al.* (2017). Discovery, mechanism and metabolism studies of 2,3-difluorophenyl-linker-containing PARP1 inhibitors with enhanced in vivo efficacy for cancer therapy. *Eur J Med Chem* *138*, 514-531.

D'Arcy, P., Wang, X., and Linder, S. (2015). Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* *147*, 32-54.

Denecker, G., Vandamme, N., Akay, O., Koludrovic, D., Taminau, J., Lemeire, K., Gheldof, A., De Craene, B., Van Gele, M., Brochez, L., *et al.* (2014). Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ* *21*, 1250-1261.

Didier, R., Mallavialle, A., Ben Jouira, R., Domdom, M.A., Tichet, M., Auberger, P., Luciano, F., Ohanna, M., Tartare-Deckert, S., and Deckert, M. (2018). Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Mol Cancer Ther* *17*, 1416-1429.

Doherty, L.M., Mills, C.E., Boswell, S.A., Liu, X., Hoyt, C.T., Gyori, B., Buhrlage, S.J., and Sorger, P.K. (2022). Integrating multi-omics data reveals function and therapeutic potential of deubiquitinating enzymes. *Elife* *11*.

Eggermont, A.M., Spatz, A., and Robert, C. (2014). Cutaneous melanoma. *Lancet* *383*, 816-827.

Fallahi-Sichani, M., Becker, V., Izar, B., Baker, G.J., Lin, J.R., Boswell, S.A., Shah, P., Rotem, A., Garraway, L.A., and Sorger, P.K. (2017). Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Mol Syst Biol* *13*, 905.

Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* *78*, 477-513.

Flaherty, K.T., Hodi, F.S., and Fisher, D.E. (2012). From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* *12*, 349-361.

Fofaria, N.M., Frederick, D.T., Sullivan, R.J., Flaherty, K.T., and Srivastava, S.K. (2015). Overexpression of MCL1 confers resistance to BRAFV600E inhibitors alone and in combination with MEK1/2 inhibitors in melanoma. *Oncotarget* *6*, 40535-40556.

Gallery, M., Blank, J.L., Lin, Y., Gutierrez, J.A., Pulido, J.C., Rappoli, D., Badola, S., Rolfe, M., and Macbeth, K.J. (2007). The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability. *Mol Cancer Ther* *6*, 262-268.

Gong, Y., and Wei, Z.R. (2022). Identification of PSMD14 as a potential novel prognosis biomarker and therapeutic target for osteosarcoma. *Cancer Rep (Hoboken)* *5*, e1522.

Granieri, L., Marocchi, F., Melixetian, M., Mohammadi, N., Nicoli, P., Cuomo, A., Bonaldi, T., Confalonieri, S., Pisati, F., Giardina, G., *et al.* (2022). Targeting the USP7/RRM2 axis drives senescence and sensitizes melanoma cells to HDAC/LSD1 inhibitors. *Cell Rep* *40*, 111396.

Greger, J.G., Eastman, S.D., Zhang, V., Bleam, M.R., Hughes, A.M., Smitheman, K.N., Dickerson, S.H., Laquerre, S.G., Liu, L., and Gilmer, T.M. (2012). Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors

overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations. *Mol Cancer Ther* *11*, 909-920.

Gruber, J.J., Geller, B., Lipchik, A.M., Chen, J., Salahudeen, A.A., Ram, A.N., Ford, J.M., Kuo, C.J., and Snyder, M.P. (2019). HAT1 Coordinates Histone Production and Acetylation via H4 Promoter Binding. *Mol Cell* *75*, 711-724 e715.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* *12*, 31-46.

He, M., Chaurushiya, M.S., Webster, J.D., Kummerfeld, S., Reja, R., Chaudhuri, S., Chen, Y.J., Modrusan, Z., Haley, B., Dugger, D.L., *et al.* (2019). Intrinsic apoptosis shapes the tumor spectrum linked to inactivation of the deubiquitinase BAP1. *Science* *364*, 283-285.

Holderfield, M., Deuker, M.M., McCormick, F., and McMahon, M. (2014). Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer* *14*, 455-467.

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.

Jeong, M., Lee, E.W., Seong, D., Seo, J., Kim, J.H., Grootjans, S., Kim, S.Y., Vandenabeele, P., and Song, J. (2017). USP8 suppresses death receptor-mediated apoptosis by enhancing FLIPL stability. *Oncogene* *36*, 458-470.

Jeusset, L.M., and McManus, K.J. (2019). Developing Targeted Therapies That Exploit Aberrant Histone Ubiquitination in Cancer. *Cells* *8*.

Jing, C., Duan, Y., Zhou, M., Yue, K., Zhuo, S., Li, X., Liu, D., Ye, B., Lai, Q., Li, L., *et al.* (2021a). Blockade of deubiquitinating enzyme PSMD14 overcomes chemoresistance in head and neck squamous cell carcinoma by antagonizing E2F1/Akt/SOX2-mediated stemness. *Theranostics* *11*, 2655-2669.

Jing, C., Li, X., Zhou, M., Zhang, S., Lai, Q., Liu, D., Ye, B., Li, L., Wu, Y., Li, H., *et al.* (2021b). The PSMD14 inhibitor Thiolutin as a novel therapeutic approach for esophageal squamous cell carcinoma through facilitating SNAIL degradation. *Theranostics* *11*, 5847-5862.

Kalb, R., Mallery, D.L., Larkin, C., Huang, J.T., and Hiom, K. (2014). BRCA1 is a histone-H2A-specific ubiquitin ligase. *Cell Rep* *8*, 999-1005.

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.

Konstantinov, N.K., Ulf-Moller, C.J., and Dimitrov, S. (2016). Histone variants and melanoma: facts and hypotheses. *Pigment Cell Melanoma Res* *29*, 426-433.

Kumari, N., Jaynes, P.W., Saei, A., Iyengar, P.V., Richard, J.L.C., and Eichhorn, P.J.A. (2017). The roles of ubiquitin modifying enzymes in neoplastic disease. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* *1868*, 456-483.

Lander, G.C., Estrin, E., Matyskiela, M.E., Bashore, C., Nogales, E., and Martin, A. (2012). Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* *482*, 186-191.

Lee, H.J., Lee, D.M., Seo, M.J., Kang, H.C., Kwon, S.K., and Choi, K.S. (2022). PSMD14 Targeting Triggers Paraptosis in Breast Cancer Cells by Inducing Proteasome Inhibition and Ca(2+) Imbalance. *Int J Mol Sci* *23*.

Li, B., Yan, J., Phyu, T., Fan, S., Chung, T.H., Mustafa, N., Lin, B., Wang, L., Eichhorn, P.J.A., Goh, B.C., *et al.* (2019a). MELK mediates the stability of EZH2 through site-specific phosphorylation in extranodal natural killer/T-cell lymphoma. *Blood* *134*, 2046-2058.

Li, F., Han, H., Sun, Q., Liu, K., Lin, N., Xu, C., Zhao, Z., and Zhao, W. (2019b). USP28 regulates deubiquitination of histone H2A and cell proliferation. *Exp Cell Res* *379*, 11-18.

Li, J., Yakushi, T., Parlati, F., Mackinnon, A.L., Perez, C., Ma, Y., Carter, K.P., Colayco, S., Magnuson, G., Brown, B., *et al.* (2017). Capzimin is a potent and specific inhibitor of proteasome isopeptidase Rpn11. *Nat Chem Biol* *13*, 486-493.

Li, M., Cheng, J., Ma, Y., Guo, H., Shu, H., Huang, H., Kuang, Y., and Yang, T. (2020). The histone demethylase JMJD2A promotes glioma cell growth via targeting Akt-mTOR signaling. *Cancer Cell Int* *20*, 101.

Liu, H., Buus, R., Clague, M.J., and Urbe, S. (2009). Regulation of ErbB2 receptor status by the proteasomal DUB POH1. *PLoS One* *4*, e5544.

Long, G.V., Weber, J.S., Infante, J.R., Kim, K.B., Daud, A., Gonzalez, R., Sosman, J.A., Hamid, O., Schuchter, L., Cebon, J., *et al.* (2016). Overall Survival and Durable Responses in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib. *J Clin Oncol* *34*, 871-878.

Luise, C., Capra, M., Donzelli, M., Mazzarol, G., Jodice, M.G., Nuciforo, P., Viale, G., Di Fiore, P.P., and Confalonieri, S. (2011). An atlas of altered expression of deubiquitinating enzymes in human cancer. *PLoS One* *6*, e15891.

Luo, G., Hu, N., Xia, X., Zhou, J., and Ye, C. (2017). RPN11 deubiquitinase promotes proliferation and migration of breast cancer cells. *Mol Med Rep* *16*, 331-338.

Lv, J., Zhang, S., Wu, H., Lu, J., Lu, Y., Wang, F., Zhao, W., Zhan, P., Lu, J., Fang, Q., *et al.* (2020). Deubiquitinase PSMD14 enhances hepatocellular carcinoma growth and metastasis by stabilizing GRB2. *Cancer Lett* *469*, 22-34.

Ma, J., Guo, W., and Li, C. (2017). Ubiquitination in melanoma pathogenesis and treatment. *Cancer Med* *6*, 1362-1377.

Massoumi, R., Kuphal, S., Hellerbrand, C., Haas, B., Wild, P., Spruss, T., Pfeifer, A., Fassler, R., and Bosserhoff, A.K. (2009). Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J Exp Med* *206*, 221-232.

Mattioli, F., and Penengo, L. (2021). Histone Ubiquitination: An Integrative Signaling Platform in Genome Stability. *Trends Genet* *37*, 566-581.

Maytal-Kivity, V., Reis, N., Hofmann, K., and Glickman, M.H. (2002). MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem* *3*, 28.

McKee, C.S., Hill, D.S., Redfern, C.P., Armstrong, J.L., and Lovat, P.E. (2013). Oncogenic BRAF signalling increases MCL1 expression in cutaneous metastatic melanoma. *Exp Dermatol* *22*, 767-769.

Meeth, K., Wang, J.X., Micevic, G., Damsky, W., and Bosenberg, M.W. (2016). The YUMM lines: a series of congenic mouse melanoma cell lines with defined genetic alterations. *Pigment Cell Melanoma Res* *29*, 590-597.

Meyers, R.M., Bryan, J.G., McFarland, J.M., Weir, B.A., Sizemore, A.E., Xu, H., Dharia, N.V., Montgomery, P.G., Cowley, G.S., Pantel, S., *et al.* (2017). Computational correction of copy number effect improves specificity of CRISPR-Cas9 essentiality screens in cancer cells. *Nat Genet* *49*, 1779-1784.

Miller, A.J., and Mihm, M.C., Jr. (2006). Melanoma. *N Engl J Med* *355*, 51-65.

Muller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., Kong, X., Possik, P.A., Cornelissen-Steijger, P.D., Geukes Foppen, M.H., *et al.* (2014). Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* *5*, 5712.

Nabhan, J.F., and Ribeiro, P. (2006). The 19 S proteasomal subunit POH1 contributes to the regulation of c-Jun ubiquitination, stability, and subcellular localization. *J Biol Chem* *281*, 16099-16107.

Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* *123*, 773-786.

Ohanna, M., Biber, P., and Deckert, M. (2022). Emerging Role of Deubiquitinating Enzymes (DUBs) in Melanoma Pathogenesis. *Cancers (Basel)* *14*.

Park, J., Cho, J., Kim, E.E., and Song, E.J. (2019). Deubiquitinating Enzymes: A Critical Regulator of Mitosis. *Int J Mol Sci* *20*.

Perez, C., Li, J., Parlati, F., Rouffet, M., Ma, Y., Mackinnon, A.L., Chou, T.F., Deshaies, R.J., and Cohen, S.M. (2017). Discovery of an Inhibitor of the Proteasome Subunit Rpn11. *J Med Chem* *60*, 1343-1361.

Pijnappel, W.W., and Timmers, H.T. (2008). Dubbing SAGA unveils new epigenetic crosstalk. *Mol Cell* *29*, 152-154.

Potu, H., Peterson, L.F., Kandarpa, M., Pal, A., Sun, H., Durham, A., Harms, P.W., Hollenhorst, P.C., Eskiocak, U., Talpaz, M., *et al.* (2017). Usp9x regulates Ets-1 ubiquitination and stability to control NRAS expression and tumorigenicity in melanoma. *Nat Commun* *8*, 14449.

Potu, H., Peterson, L.F., Pal, A., Verhaegen, M., Cao, J., Talpaz, M., and Donato, N.J. (2014). Usp5 links suppression of p53 and FAS levels in melanoma to the BRAF pathway. *Oncotarget* *5*, 5559-5569.

Rai, K., Akdemir, K.C., Kwong, L.N., Fiziev, P., Wu, C.J., Keung, E.Z., Sharma, S., Samant, N.S., Williams, M., Axelrad, J.B., *et al.* (2015). Dual Roles of RNF2 in Melanoma Progression. *Cancer Discov* *5*, 1314-1327.

Rambow, F., Marine, J.C., and Goding, C.R. (2019). Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev* 33, 1295-1318.

Rambow, F., Rogiers, A., Marin-Bejar, O., Aibar, S., Femel, J., Dewaele, M., Karras, P., Brown, D., Chang, Y.H., Debiec-Rychter, M., *et al.* (2018). Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* 174, 843-855 e819.

Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., and Wilkinson, K.D. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78, 363-397.

Ryu, B., Moriarty, W.F., Stine, M.J., DeLuca, A., Kim, D.S., Meeker, A.K., Grills, L.D., Switzer, R.A., Eller, M.S., and Alani, R.M. (2011). Global analysis of BRAFV600E target genes in human melanocytes identifies matrix metalloproteinase-1 as a critical mediator of melanoma growth. *J Invest Dermatol* 131, 1579-1583.

Schnell, H.M., and Hanna, J. (2022). DUB-le vision: snapshots of the proteasome during substrate processing. *Trends Biochem Sci* 47, 903-905.

Schwarz, T., Sohn, C., Kaiser, B., Jensen, E.D., and Mansky, K.C. (2010). The 19S proteasomal lid subunit POH1 enhances the transcriptional activation by Mitf in osteoclasts. *J Cell Biochem* 109, 967-974.

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.

Shen, S., Wolfe, R., McLean, C.A., Haskett, M., and Kelly, J.W. (2014). Characteristics and associations of high-mitotic-rate melanoma. *JAMA Dermatol* 150, 1048-1055.

Smith, L.K., Parmenter, T., Kleinschmidt, M., Kusnadi, E.P., Kang, J., Martin, C.A., Lau, P., Patel, R., Lorent, J., Papadopoli, D., *et al.* (2022). Adaptive translational reprogramming of metabolism limits the response to targeted therapy in BRAF(V600) melanoma. *Nat Commun* 13, 1100.

Song, C., Piva, M., Sun, L., Hong, A., Moriceau, G., Kong, X., Zhang, H., Lomeli, S., Qian, J., Yu, C.C., *et al.* (2017). Recurrent Tumor Cell-Intrinsic and -Extrinsic Alterations during MAPKi-Induced Melanoma Regression and Early Adaptation. *Cancer Discov* 7, 1248-1265.

Sparmann, A., and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 846-856.

Spataro, V., Simmen, K., and Realini, C.A. (2002). The essential 26S proteasome subunit Rpn11 confers multidrug resistance to mammalian cells. *Anticancer Res* 22, 3905-3909.

Strub, T., Ghiraldini, F.G., Carcamo, S., Li, M., Wroblewska, A., Singh, R., Goldberg, M.S., Hasson, D., Wang, Z., Gallagher, S.J., *et al.* (2018). SIRT6 haploinsufficiency induces BRAF(V600E) melanoma cell resistance to MAPK inhibitors via IGF signalling. *Nat Commun* 9, 3440.

Su, D., Wang, W., Hou, Y., Wang, L., Yi, X., Cao, C., Wang, Y., Gao, H., Wang, Y., Yang, C., *et al.* (2021). Bimodal regulation of the PRC2 complex by USP7 underlies tumorigenesis. *Nucleic Acids Res* 49, 4421-4440.

Sun, T., Liu, Z., Bi, F., and Yang, Q. (2021a). Deubiquitinase PSMD14 promotes ovarian cancer progression by decreasing enzymatic activity of PKM2. *Mol Oncol*.

Sun, T., Liu, Z., Bi, F., and Yang, Q. (2021b). Deubiquitinase PSMD14 promotes ovarian cancer progression by decreasing enzymatic activity of PKM2. *Mol Oncol* 15, 3639-3658.

Sun, X.X., He, X., Yin, L., Komada, M., Sears, R.C., and Dai, M.S. (2015). The nucleolar ubiquitin-specific protease USP36 deubiquitinates and stabilizes c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 3734-3739.

Tang, L., Tron, V.A., Reed, J.C., Mah, K.J., Krajewska, M., Li, G., Zhou, X., Ho, V.C., and Trotter, M.J. (1998). Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 4, 1865-1871.

Tee, W.W., and Reinberg, D. (2014). Chromatin features and the epigenetic regulation of pluripotency states in ESCs. *Development* 141, 2376-2390.

Tsherniak, A., Vazquez, F., Montgomery, P.G., Weir, B.A., Kryukov, G., Cowley, G.S., Gill, S., Harrington, W.F., Pantel, S., Krill-Burger, J.M., *et al.* (2017). Defining a Cancer Dependency Map. *Cell* 170, 564-576 e516.

Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K.M., Lay, J., Wong, D.J.L., Atefi, M., Shirazi, R., Wang, X., *et al.* (2018). Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* 33, 890-904 e895.

Tsolou, A., Nelson, G., Trachana, V., Chondrogianni, N., Saretzki, G., von Zglinicki, T., and Gonos, E.S. (2012). The 19S proteasome subunit Rpn7 stabilizes DNA damage foci upon genotoxic insult. *IUBMB Life* *64*, 432-442.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., and Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* *298*, 611-615.

von Mering, C., Jensen, L.J., Snel, B., Hooper, S.D., Krupp, M., Foglierini, M., Jouffre, N., Huynen, M.A., and Bork, P. (2005). STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res* *33*, D433-437.

Wang, B., Hurov, K., Hofmann, K., and Elledge, S.J. (2009). NBA1, a new player in the Brca1 A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control. *Genes Dev* *23*, 729-739.

Wang, B., Ma, A., Zhang, L., Jin, W.L., Qian, Y., Xu, G., Qiu, B., Yang, Z., Liu, Y., Xia, Q., *et al.* (2015). POH1 deubiquitylates and stabilizes E2F1 to promote tumour formation. *Nat Commun* *6*, 8704.

Wang, B., Xu, X., Yang, Z., Zhang, L., Liu, Y., Ma, A., Xu, G., Tang, M., Jing, T., Wu, L., *et al.* (2019). POH1 contributes to hyperactivation of TGF-beta signaling and facilitates hepatocellular carcinoma metastasis through deubiquitinating TGF-beta receptors and caveolin-1. *EBioMedicine* *41*, 320-332.

Wang, C.H., Lu, S.X., Liu, L.L., Li, Y., Yang, X., He, Y.F., Chen, S.L., Cai, S.H., Wang, H., and Yun, J.P. (2018). POH1 Knockdown Induces Cancer Cell Apoptosis via p53 and Bim. *Neoplasia* *20*, 411-424.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* *431*, 873-878.

Wellbrock, C., Ogilvie, L., Hedley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D., Springer, C.J., and Marais, R. (2004). V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* *64*, 2338-2342.

Widmer, D.S., Cheng, P.F., Eichhoff, O.M., Belloni, B.C., Zipser, M.C., Schlegel, N.C., Javelaud, D., Mauviel, A., Dummer, R., and Hoek, K.S. (2012). Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res* *25*, 343-353.

Wilms, C., Kroeger, C.M., Hainzl, A.V., Banik, I., Bruno, C., Krikki, I., Farsam, V., Wlaschek, M., and Gatzka, M.V. (2017). MYSM1/2A-DUB is an epigenetic regulator in human melanoma and contributes to tumor cell growth. *Oncotarget* *8*, 67287-67299.

Xu, W., and McArthur, G. (2016). Cell Cycle Regulation and Melanoma. *Curr Oncol Rep* *18*, 34.

Yang, C., Tian, C., Hoffman, T.E., Jacobsen, N.K., and Spencer, S.L. (2021). Melanoma subpopulations that rapidly escape MAPK pathway inhibition incur DNA damage and rely on stress signalling. *Nat Commun* *12*, 1747.

Yang, W., Lee, Y.H., Jones, A.E., Woolnough, J.L., Zhou, D., Dai, Q., Wu, Q., Giles, K.E., Townes, T.M., and Wang, H. (2014). The histone H2A deubiquitinase Usp16 regulates embryonic stem cell gene expression and lineage commitment. *Nat Commun* *5*, 3818.

Yokoyama, S., Iwakami, Y., Hang, Z., Kin, R., Zhou, Y., Yasuta, Y., Takahashi, A., Hayakawa, Y., and Sakurai, H. (2020). Targeting PSMD14 inhibits melanoma growth through SMAD3 stabilization. *Sci Rep* *10*, 19214.

Zhang, L., Xu, H., Ma, C., Zhang, J., Zhao, Y., Yang, X., Wang, S., and Li, D. (2020). Upregulation of deubiquitinase PSMD14 in lung adenocarcinoma (LUAD) and its prognostic significance. *J Cancer* *11*, 2962-2971.

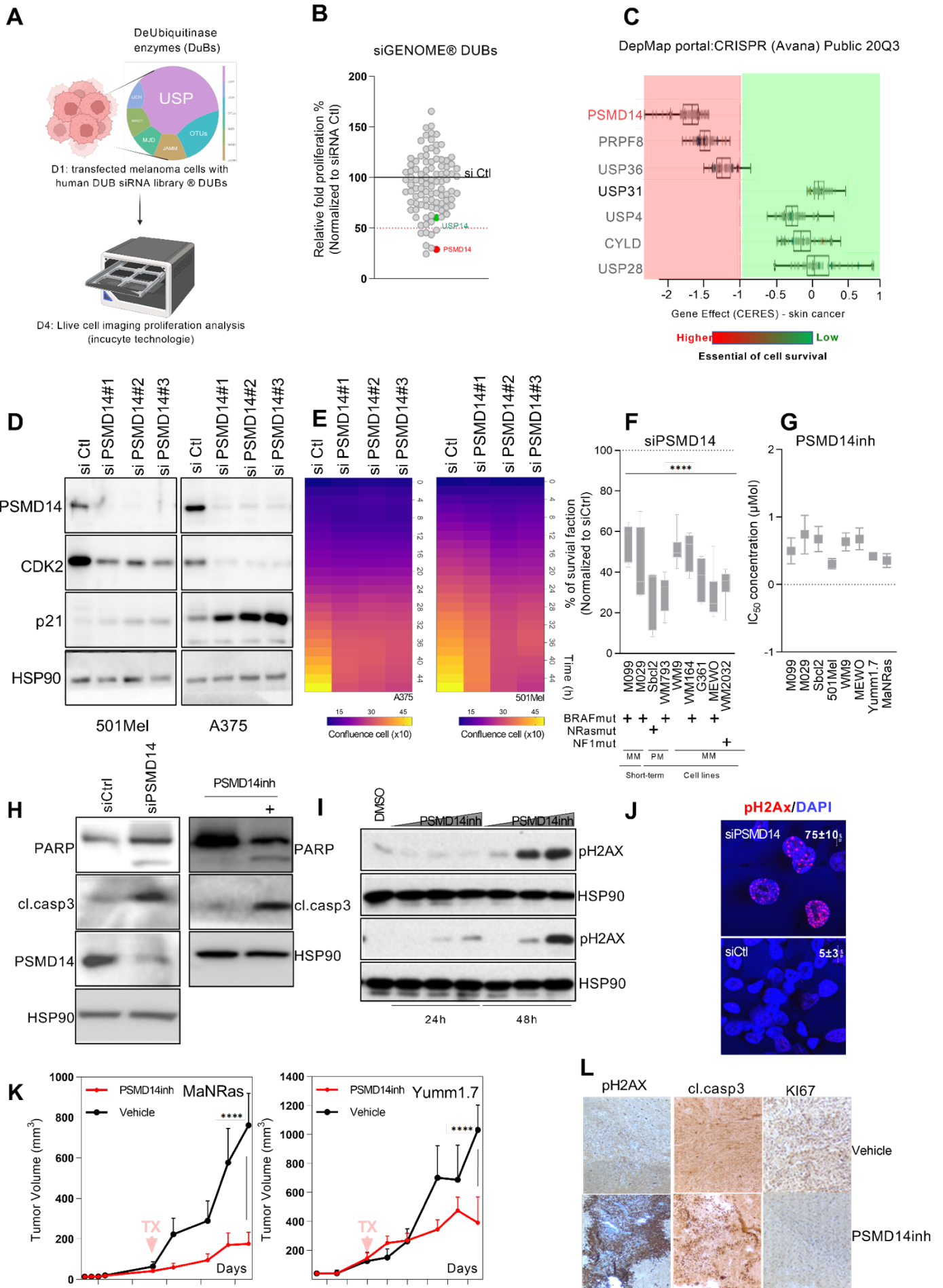
Zhang, Z., Jones, A.E., Wu, W., Kim, J., Kang, Y., Bi, X., Gu, Y., Popov, I.K., Renfrow, M.B., Vassilyeva, M.N., *et al.* (2017). Role of remodeling and spacing factor 1 in histone H2A ubiquitination-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, E7949-E7958.

Zhao, X., Fiske, B., Kawakami, A., Li, J., and Fisher, D.E. (2011). Regulation of MITF stability by the USP13 deubiquitinase. *Nat Commun* *2*, 414.

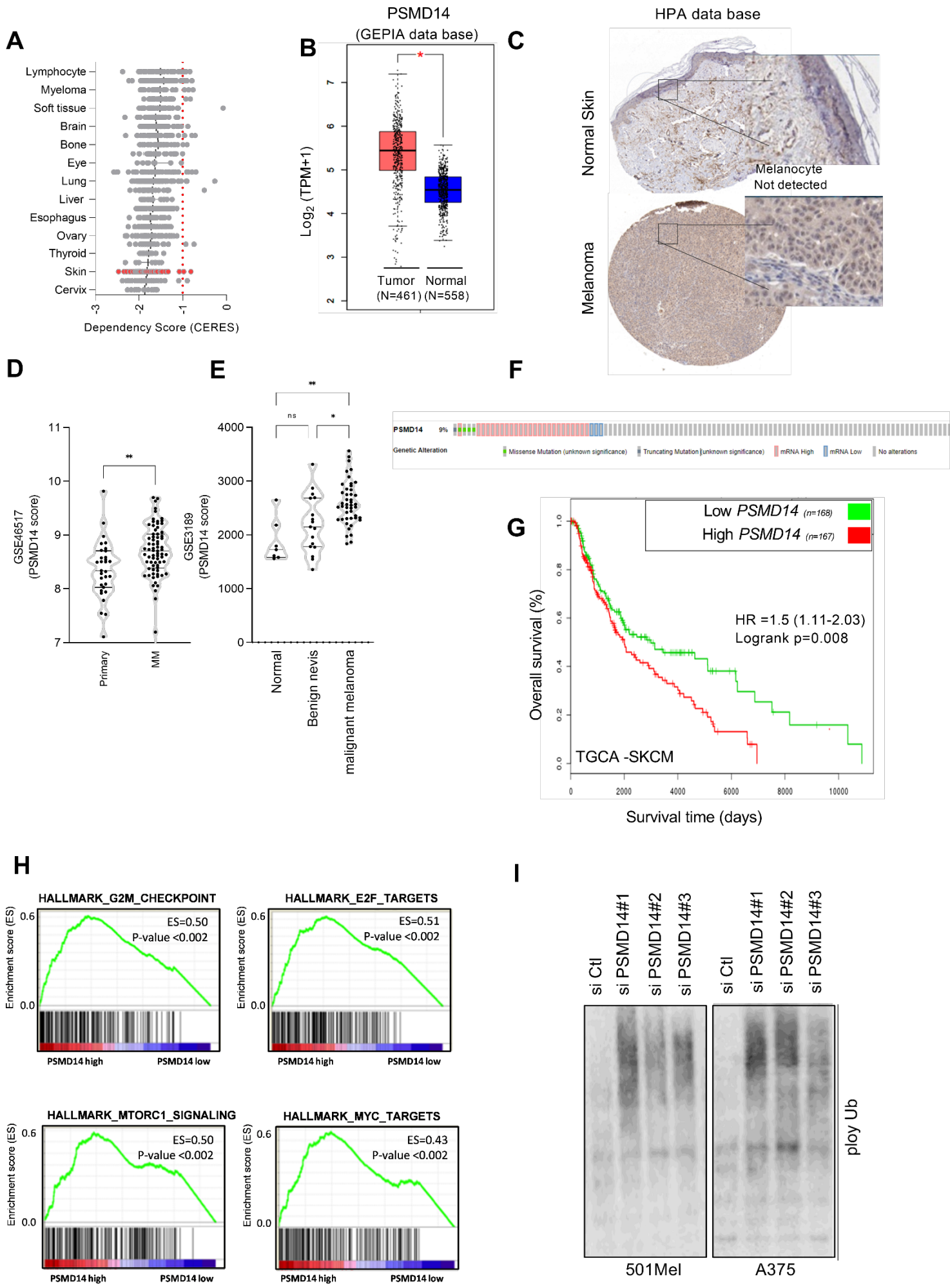
Zou, Q., Jin, J., Hu, H., Li, H.S., Romano, S., Xiao, Y., Nakaya, M., Zhou, X., Cheng, X., Yang, P., *et al.* (2014). USP15 stabilizes MDM2 to mediate cancer-cell survival and inhibit antitumor T cell responses. *Nat Immunol* *15*, 562-570.

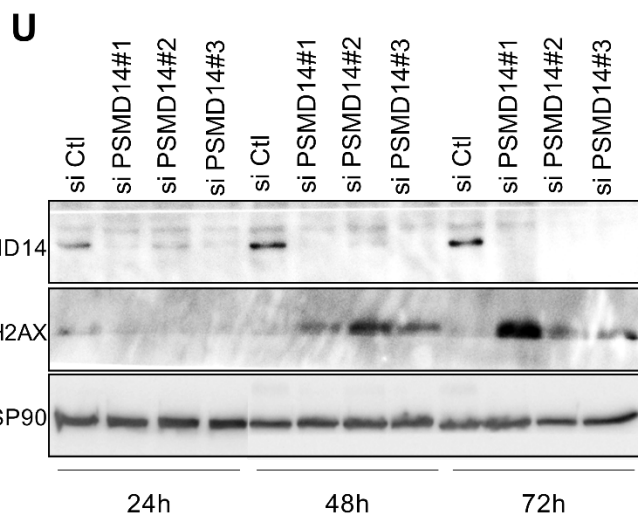
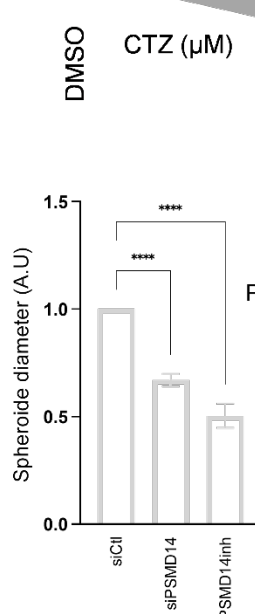
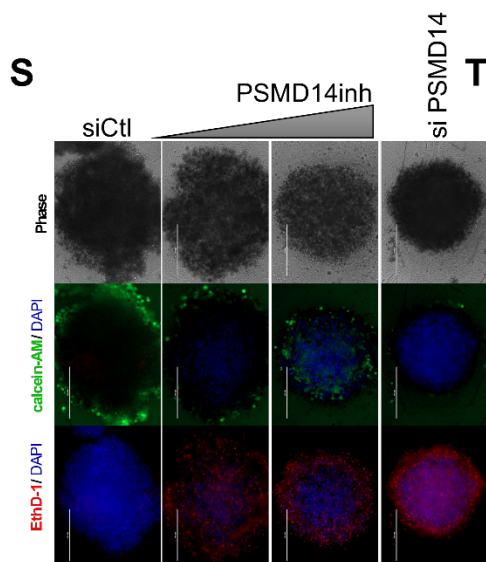
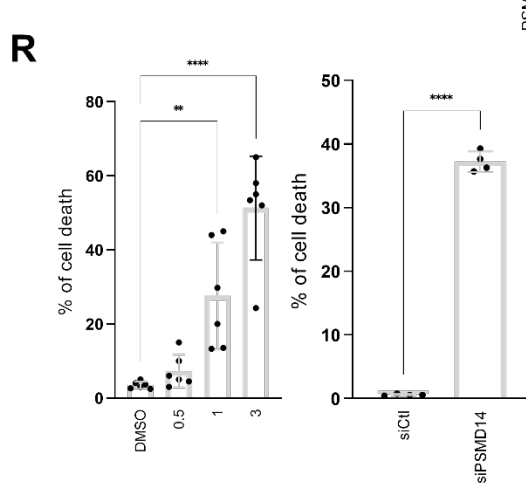
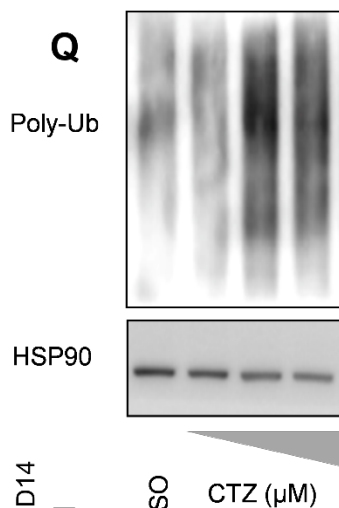
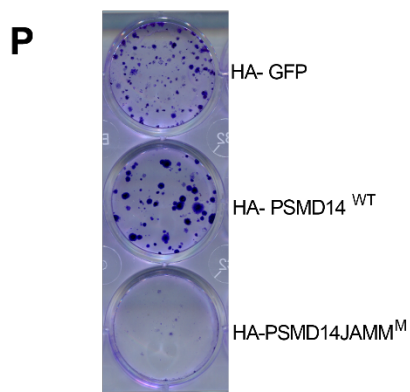
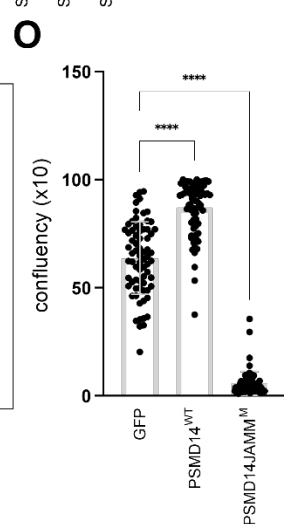
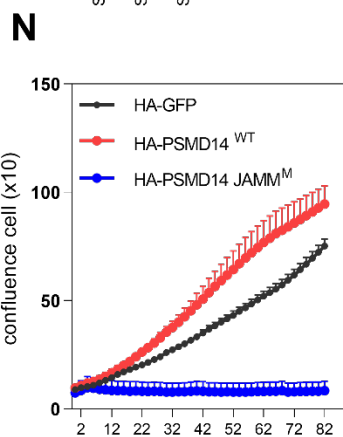
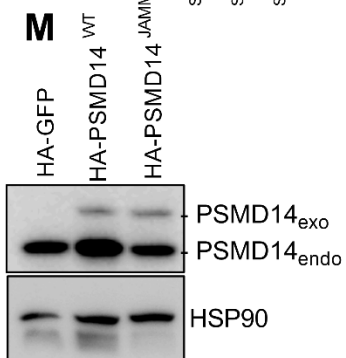
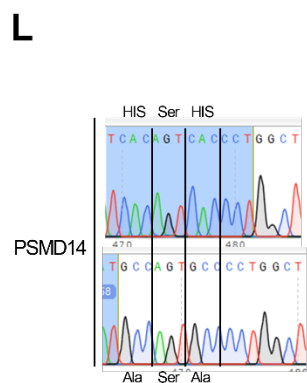
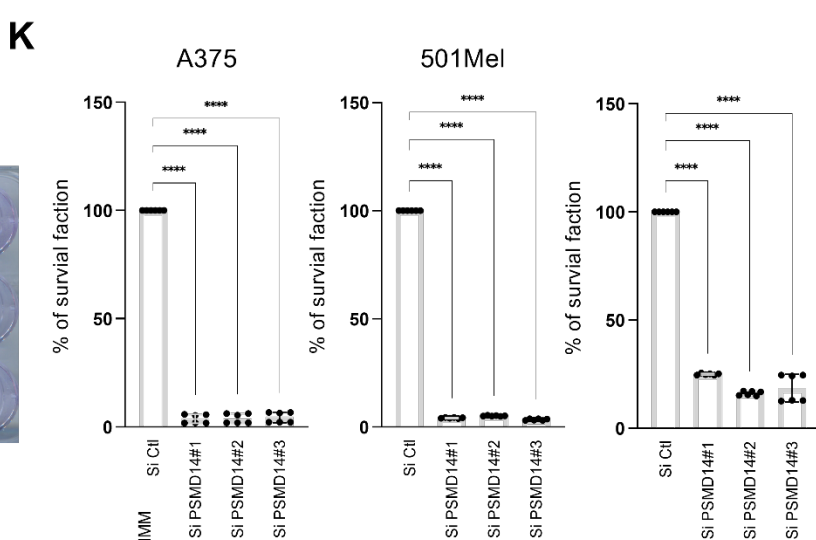
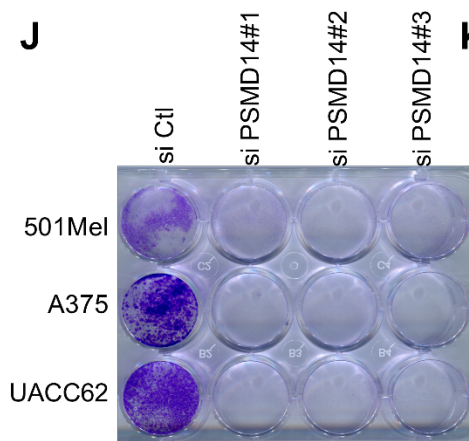
Zukowski, A., Phillips, J., Park, S., Wu, R., Gygi, S.P., and Johnson, A.M. (2019). Proteomic profiling of yeast heterochromatin connects direct physical and genetic interactions. *Curr Genet* *65*, 495-505.





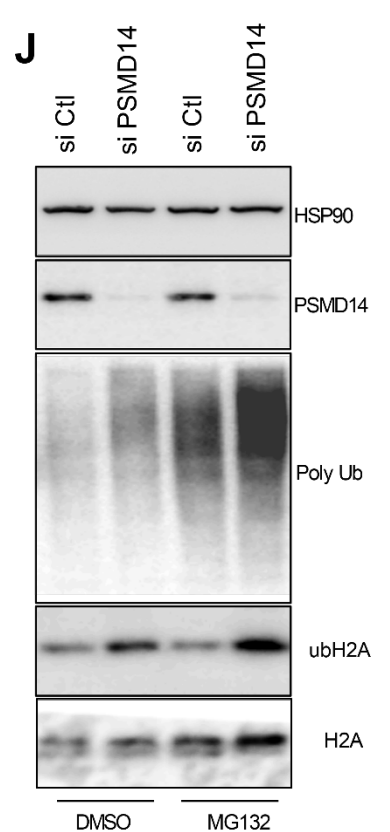
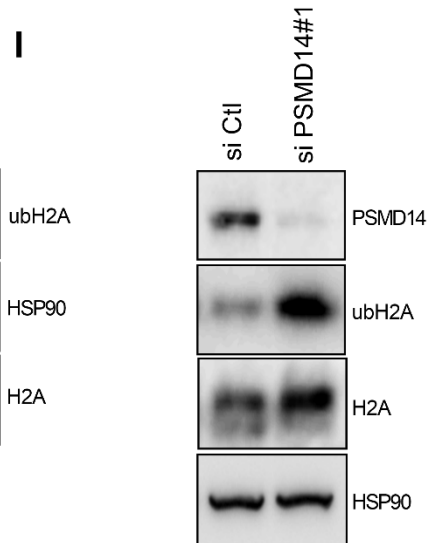
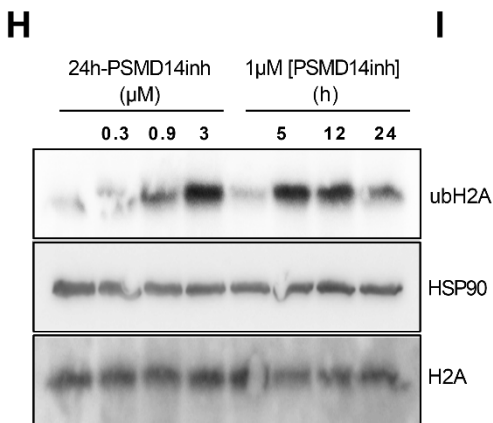
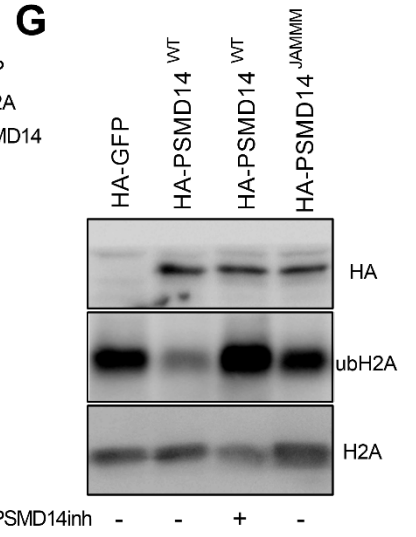
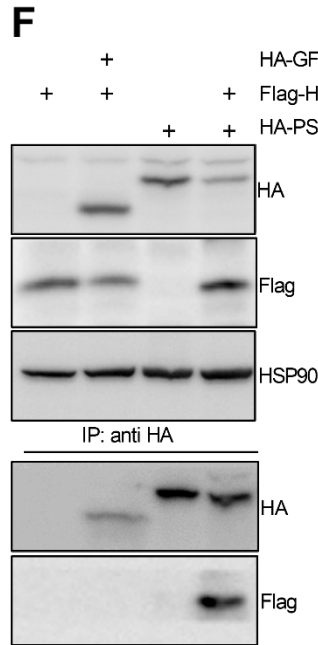
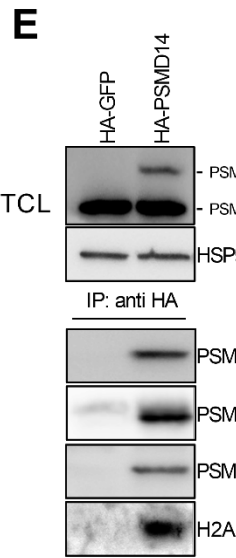
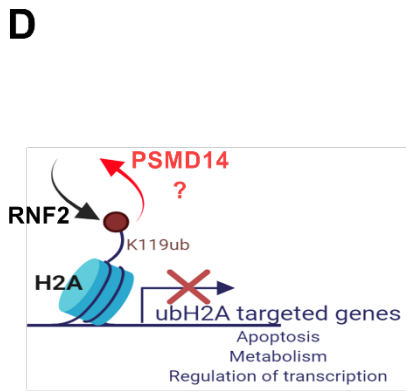
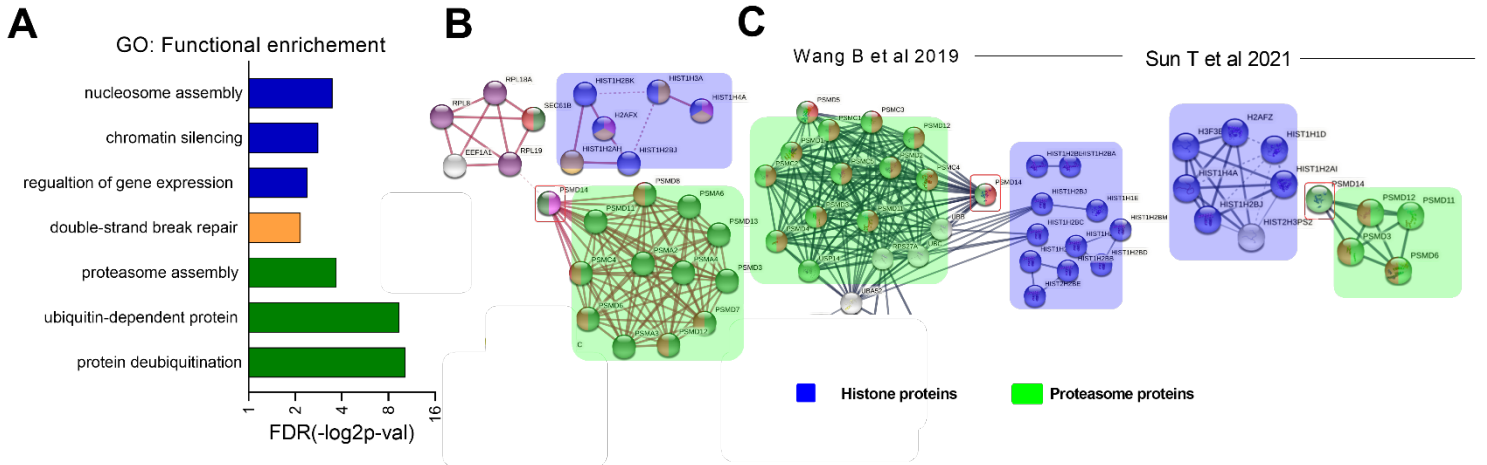
**Figure 1 - PSMD14 as a rogue gene essential in metastatic melanoma - A)** Schematic showing the screening in BRAF-mutant melanoma cells (501 Mel) for identifying DUBs on cell growth and survival. Proliferation rate in melanoma cell 501MEI. siRNA mediated knockdown of DUBs was carried out in 501MEI (siRNA at 100 nM) and proliferation analyse from incucyte technology after 96h are normalized to relative to control (non-targeting oligo) for each DUB contained in the library. **B)** Melanoma cell proliferation screen of a siRNA library targeting genome DUBs. 501Mel melanoma cells were transfected with non-targeting siRNA (siCTRL) or 98 siDUB pools (50nM) and cell confluence was imaged for 96h. Dot plots represent normalized cell proliferation of each siRNA after 72h relative to siCtl (representative of two screenings) **C)** Among the top hits, PSMD14 is the highly essential and selective for skin cancer cell growth and survival by using CRISPR screening data from The Cancer Dependency Map (DepMap). **D)** western blot for the expression of PSMD14, CDK2, p21 in 501Mel and A375 melanoma cells after using 3 different siRNA sequences targeting PSMD14 (siPSMD14#1, #2 and #3). HSP90 was used as loading control. **E)** time Course of confluence in heatmapp following PSMD14 removal (#1,#2 and #3) in two BRAFV600 melanoma lines versus control condition (siCtl). Estimation of survival fraction **F)** or IC50 **G)** after PSMD14 depletion or pharmacological inhibition with 8TQ (PSMD14inh), respectively. **H)** The level of proteolytic PARP and caspase-3 cleavage, a hallmark of apoptosis, is visualized by western blotting after PSMD14 depletion or inhibition. DNA damage  $\gamma$ -H2AX marker detection by westernblot after PSMD14inh exposure **I)** and foci quantification by immunofluorescence after PSMD14 depletion **J)**. **K)** Left:  $2 \times 10^5$  murine melanoma cells Yumm1.7 (derived from BrafV600E/Pten null/cdkn2a null mice) or right:  $4 \times 10^5$  murine melanoma MaNRas (NRasQ61K) were subcutaneously inoculated into both flanks of 6-week old C57Bl/6J female mice. After one week, mice were injected i.p 3 times per week with PSMD14inh (8TQ- 10 mg/kg) or vehicle. The tumor size was measured with a caliper and the tumor volume was determined. Data shown are mean  $\pm$  sd of tumor volume (n=12; \*\*\*, \*\*\* $P$ <0.001, 2way ANOVA). **L)** Representative images from KI67, phosphorylated histone H2AX and cleaved caspase 3 immunohistochemical staining after vehicle or PSMD14inh(8TQ) treatment of Yumm1.7 tumors (scale bar, 100  $\mu$ m).





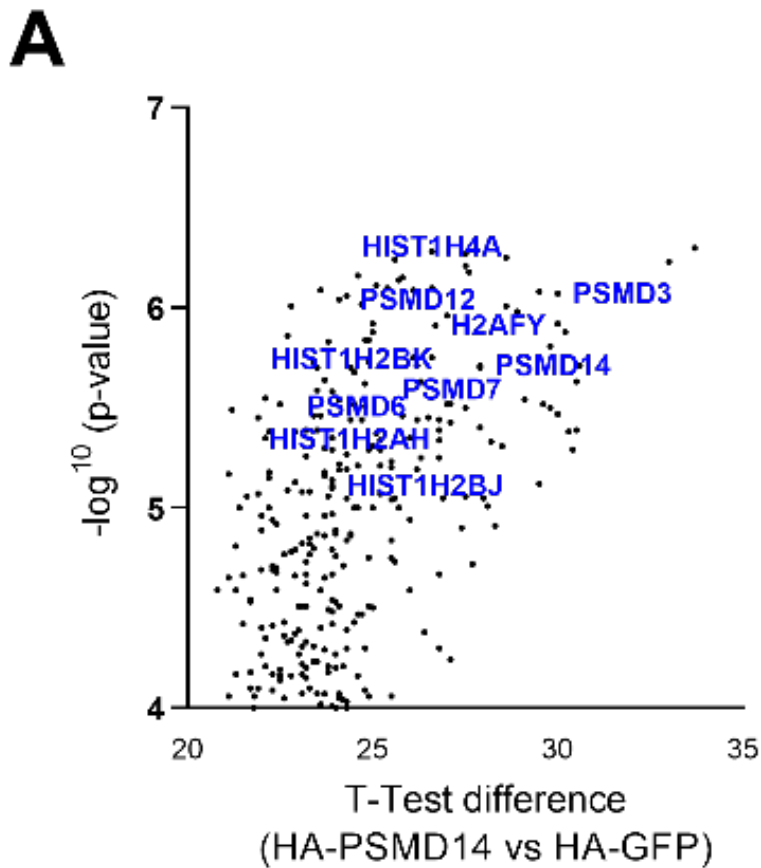
**Figure 1 supp - PSMD14 as a rogue gene essential in metastatic melanoma – A)** Dependency scores of PSMD14 across pan-cancer based on CRISPR (DepMap 21Q4) screening data by DepMap web portal (<https://depmap.org/portal/depmap>). A lowest CERES score indicates a high probability of the corresponding cancer lineage being most susceptible to PSMD14 depletion. A score of 0 indicated that a gene is not essential; similarly, a score of -1 is comparable to the median of all genes. Melanoma cell lines are highlighted in red and belong to the most affected cancers by the depletion of PSMD14. **B)** Boxplots showing *PSMD14* gene expression levels in primary melanoma tumors and normal skin tissues. GEPIA, gene expression profiling interactive analysis. \*,  $P < 0.05$ . **C)** A representative immune histochemistry (IHC) image of PSMD14 expression from the HPA database in normal tissue (melanocytes) and melanoma. PSMD14 protein expression was not detected in melanocytes. **D)** Scatter plots showing an increased expression of *PSMD14* in metastatic melanoma (MM) compared to primary melanoma (PM) (public GEO dataset GSE46157). **E)** Analysis of public dataset (GSE3189) correlates *PSMD14* expression with melanoma progression. **F)** PSMD14 alteration proportion in 363 patients Skin Cutaneous Melanoma samples (PanCancer) in the cBioPortal database. **G)** Kaplan-Meier overall survival curves in melanoma patients with high or low *PSMD14* expression. Data from TCGA (Skin Cutaneous melanoma (SKCM) dataset) were obtained through SurvExpress ( $p = 0.0079$ ; log-rank test). **H)** Gene set enrichment analysis (GSEA) in melanoma patient gene expression profiles from TCGA (SKCM) showed positive association between high expression of PSMD14 and the enrichment in hallmarks of cell cycle checkpoints, cell proliferation and metabolic pathways. **I)** poly-ubiquitinated proteins (poly-Ub) from A375 depleted for PSMD14 (#1, #2 & #3) **J)** Colony survival analysis after PSMD14 depletion (siPSMD14#1, #2 and #3) compared to control siRNA (siCTRL). 501Mel, UACC62 and A375 cells were transfected with siRNAs, re-seeded at 2,000 cells/well and grown for 1 week. Colonies were stained with crystal violet. **K)** Histograms showed the quantification of crystal violet absorbance at 595 nm. Data are the mean of three independent experiments performed in duplicate ( $\pm$  s.em). \*\*\* $P < 0.001$ . Images of one representative experiment are shown. **L)** Sanger sequencing of PSMD14 wildtype (WT) and mutant form (JAMM<sup>M</sup>) with two histidines substitution in catalytic JAMM. **M)** Western blot expression of HA-PSMD14 WT/ JAMM<sup>M</sup>. **N)** confluence evaluation of A375 stably expressed PSMD14 wt /JAMM<sup>M</sup> compared to GFP control cell. **O)** Confluence histogram values indicate significant separation of PSMD14 wt and GFP melanoma after 72 days. PSMD14 mutant form impedes cell proliferation. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine statistical significance (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Each bar represents the mean S.E.M of representative experiments, from three independent experiments. **P)** Crystal violet staining of PSMD14 control (GFP), PSMD14 WT and mutant cells remaining after 2 weeks **Q)** Poly-ubiquitinated protein (poly-Ub) western blot of A375 cell lysates treated with dose-dependent PSMD14inh (8TQ) **R)** Effect of PSMD14 activity inhibition (PSMD14inh) or depletion on melanoma cell viability. After 72h, cells were labeled with Annexin V-FITC and DAPI and analysed by flow cytometry. Histograms show the percentage of cell death (Annexin V and DAPI positive cells) (mean  $\pm$  s.em, N=6 or = 3 ). **S)** representative Phase contrast and Immunofluorescence images of 501MEI treated with PSMD14inh gold after depletion of

PSMD14 for 8 days in a 3D culture system (CaM: green; PI: red). Scale bar, 100 $\mu$ m. **T)** Spheroid area quantification **U)**  $\gamma$ -H2AX protein expression in PSMD14 depleted cells at the experimental time conditions specified (24h, 48h, 72h)

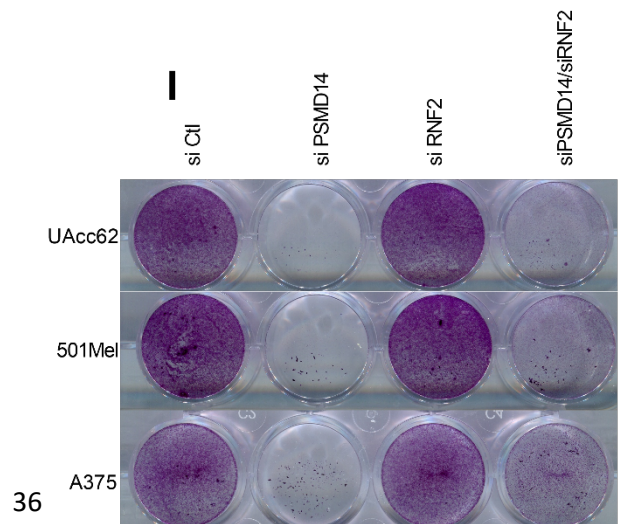
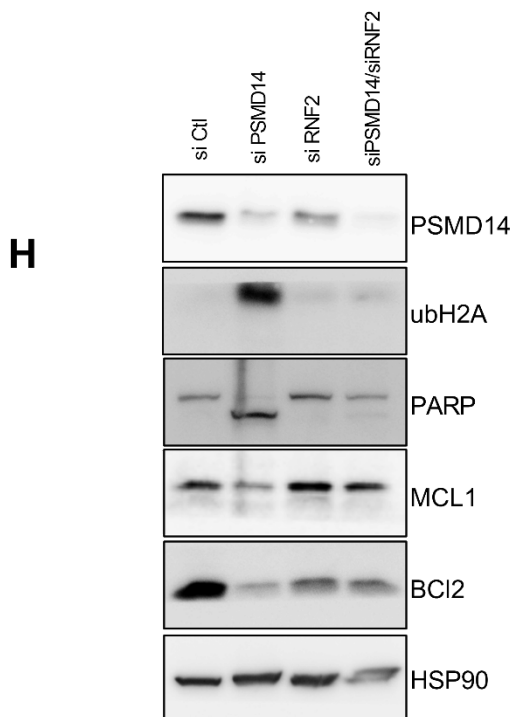
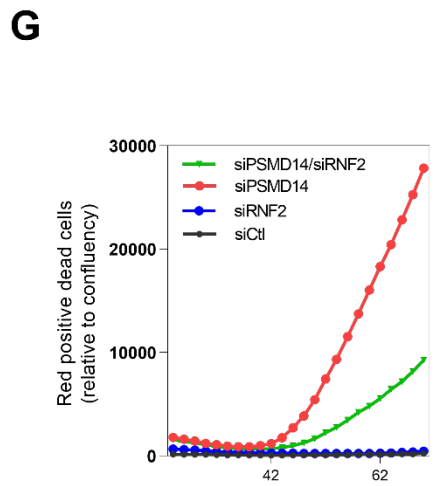
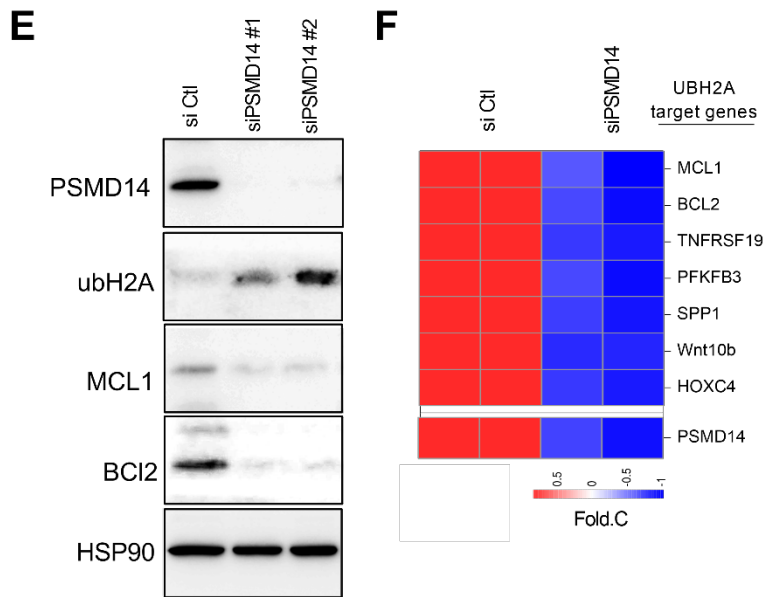
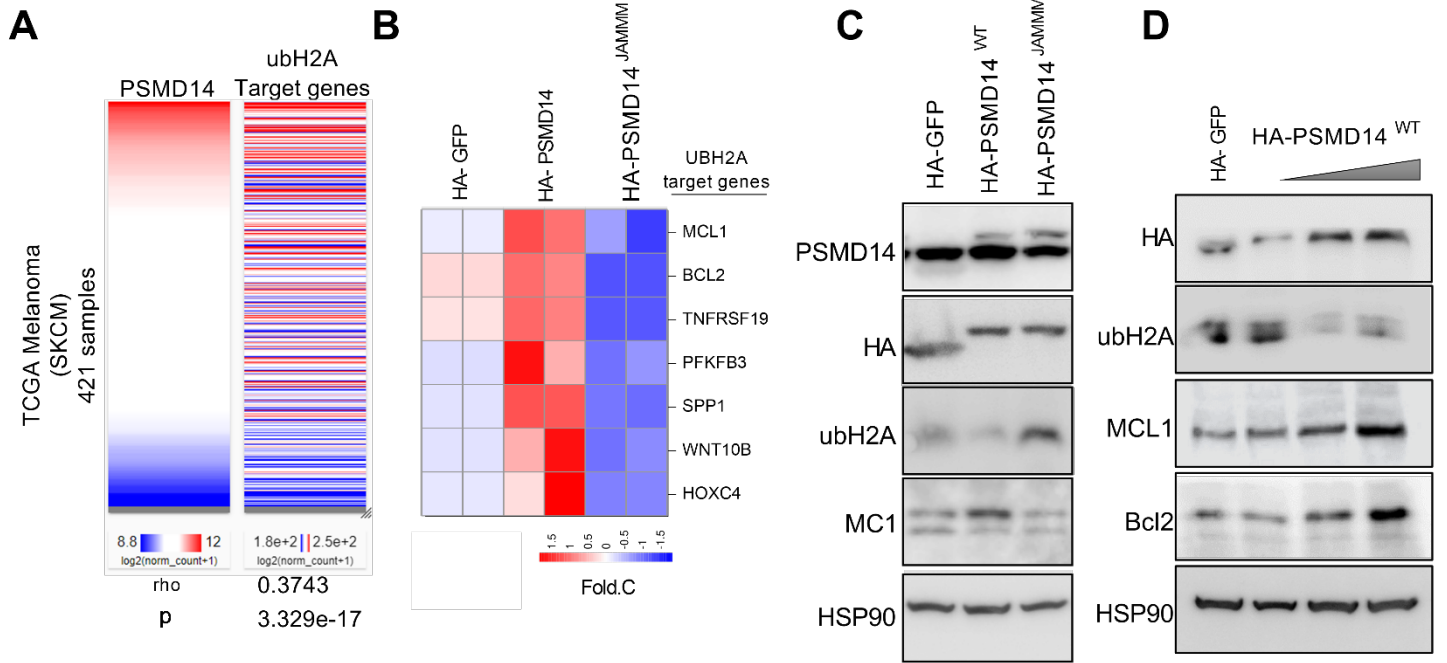


**Figure 2 - PSMD14 interact and modulated H2Aub** – **A)** Bar graph of pathway distribution of identified hits as per KEGG pathway analysis or GOs analysis of the PSMD14-interacting proteins categorized into functional groups. **B)** STRING data base connected to the protein interactors of PSMD14 indicates hub proximity of proteasome components in green and histone components in blue. **C)** Similar protein network analysis (string-db) from the two database from PSMD14 interactome indicates a close linkage of the core histone components with the PSMD14 associated proteins. **D)** We hypothesized that PSMD14 impacts on ubiquitinated H2A (ubH2A) level and relieves ubH2A-dependent repression **E)** HA-PSMD14 immunoprecipitation resulted in the co-precipitation of proteasome-binding proteins (PSMD7, PSMD12) and H2A histone variant. **F)** The exogenous interaction between HA-PSMD14 and FLAG-H2A in HEK293 cells was evaluated by co-immunoprecipitation assays. **G)** Detection of endogenous uH2A and H2A levels by western blot analysis after overexpression of Flag-tagged full-length WT alone or in combination PSMD14 inh and JAMM mutant (H113A) in HEK293T cells. **G)** western blot of ubH2A level following melanoma cell (A375) treatment with PSMD14inh in a dose- and time-dependent manner. **I)** Increased ubH2A (UBK119H2A) levels after 72h of PSMD14 depleted A375 cells visualized by Western blotting, compared to control scrambled siRNA. anti-PSMD14 and anti-ubH2A and anti-H2A total as shown. HSP90 is used as loading controls. **J)** A375 cells with or without PSMD14 siRNA transfection were treated with MG132 (20µg/ml) for 4h. The whole cell lysates were analyzed by Western blot using the indicated antibodies.

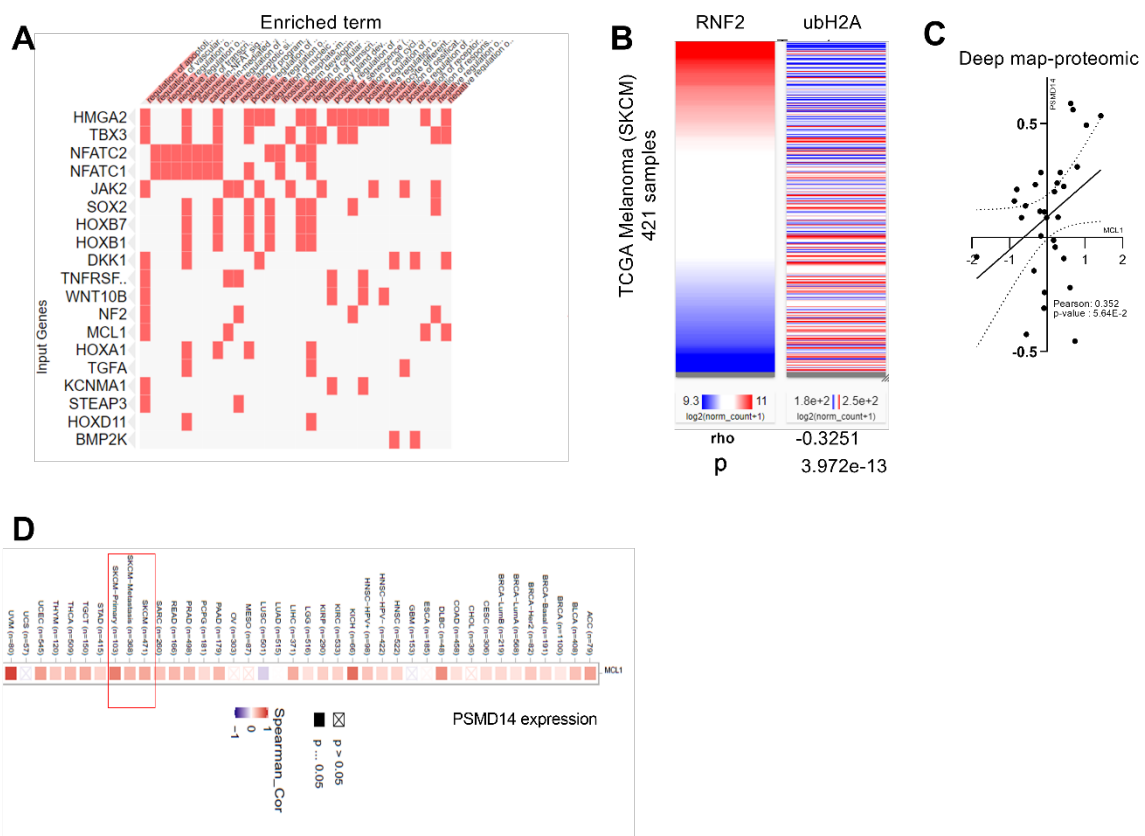




**Figure 2 supp : - PSMD14 interacts with histone variants. - A)** Volcano plot showing differential display of significant PSMD 14 interactions partners identified in six MS sample pairs . compared to HA-GFP melanoma cell by quantitative mass spectrometry (LC-MS/MS). (Y-axis) fold enrichment T-test p-value and (X-axis) mean fold difference shown (protein abundance evaluated as sum of PSMs).

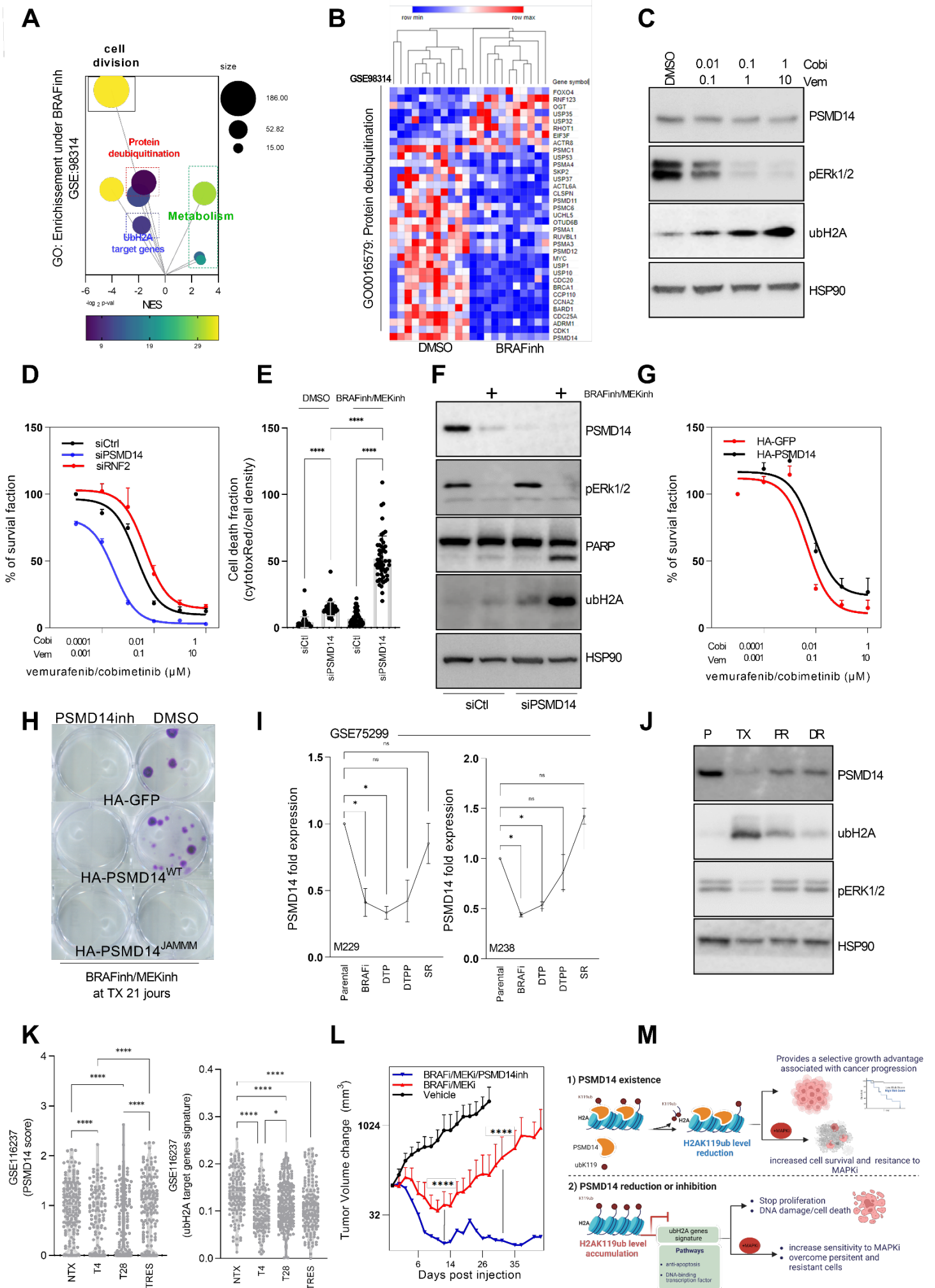


**Figure 3 - PSMD14 depletion-related cell death depends on UbH2A level - A)** Correlation of ubH2A signature genes (from Zhuo Zhang et al 2017 & Meng He et al 2019) with the expression of PSMD14 (UCSC Xena - Xena Browser) in TCGA Melanoma data set (SKCM cohort, n = 421). Spearman rank-order. **B)** Expression heatmap for some ubH2A signature genes implicated in apoptosis and metabolism in A375 stable for PSMD14 WT (wild type ) or mutant form with two point mutations on deubiquitinating enzymatic activity domain ( PSMD14JAMM<sup>M</sup>-H113A/H115A). **C)** UbH2a and MCL1 expression levels by western blot of lysate from A375 expressing PSMD14 wt and mutant (PSMD14 JAMM<sup>M</sup>). **D)** overexpression of wild type PSMD14 (PSMD14<sup>WT</sup>) on the level of ubH2A and apoptotic markers MCL1 and BCL2 by western blot. **E)** PSMD14 depletion (#1 et #2) on ubH2A level and apoptotic marker MCL1 and BCL2 **F)** Expression heatmap of the ubH2A target genes under PSMD14 depletion in A375. **G)** fluorescently-labelled nuclei dye positive apoptotic cells index under defined conditions **H)** PSMD14 inactivation triggers BCL2 or MCL1 with combined loss of RNF2, E3 ubiquitin ligases that modify histone H2A, we lost apoptotic signature at the protein level **I)** crystal violet visualization of remaining cells at one week after PSMD14 (siPSMD14) or RNF2 (siRNF2) alone and in combination (siPSMD14/SiRNF2)



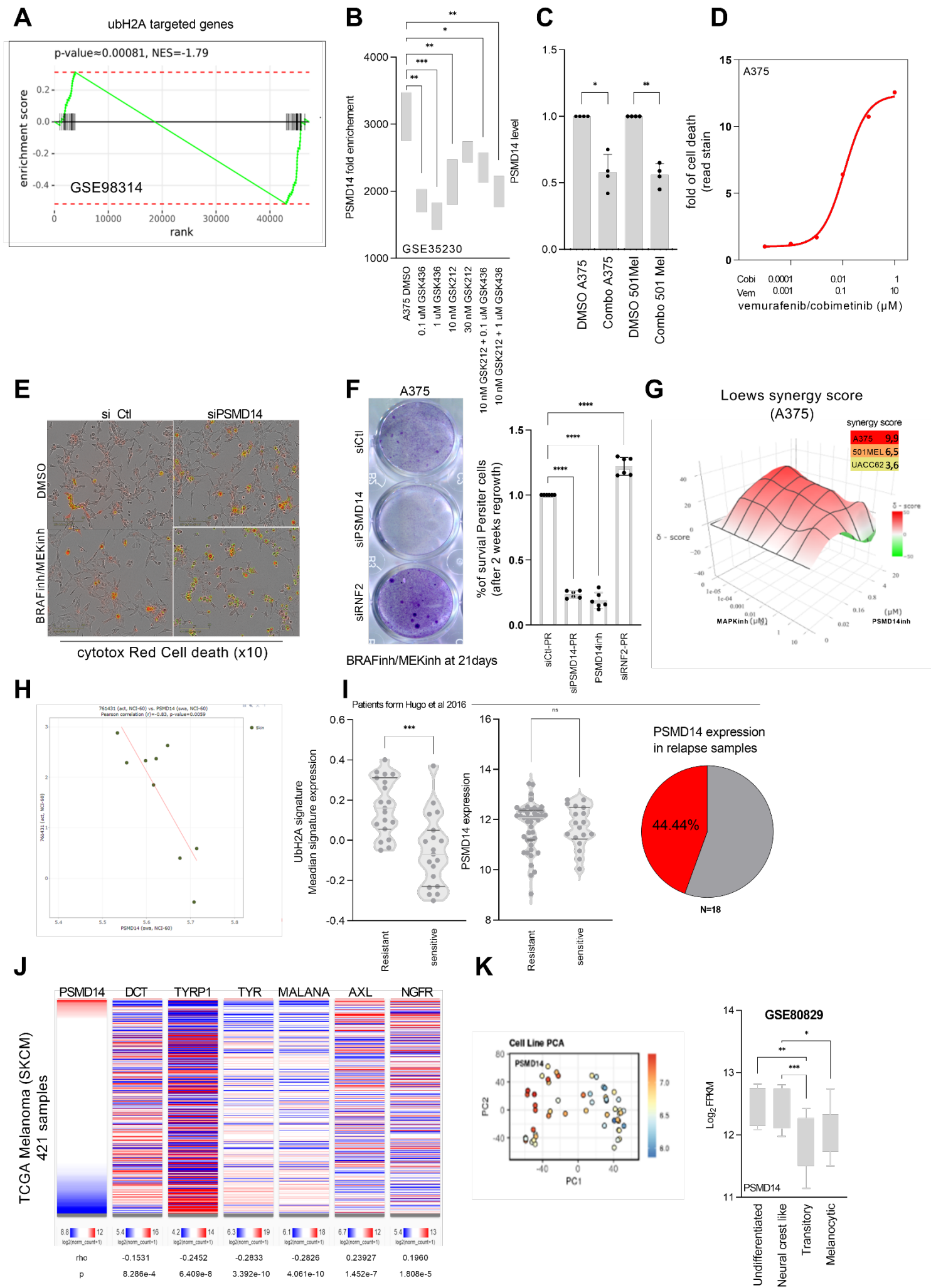
**Figure 3 supp - PSMD14 depletion-related cell death depends on UbH2A level - A)** Clustergram of ubh2A specific gene enrichment terms obtained by Enrichr web tool. **B)** Negative correlation of genes selected from the UbH2A signature (from Zhang et al 2017 & Meng He et al 2019) with RNF2 (RING1B) expression (UCSC Xena - Xena Browser) in the TCGA melanoma dataset (SKCM cohort, n = 421). Spearman's rank order. **C)** Scatter plot with Linear

regression shows significantly correlated PSMD14 and MCL1 proteins levels using Deep map-proteomic (metastatic<https://cellmodelpassports.sanger.ac.uk/>.) from a collection of 30 metastatic melanoma cell lines. **D)** GEPIA Matix plot provides spearman correlation between PSMD14 and MCL1 gene correlation analysis on TGCA data set.



**Figure 4 - PSMD14/ubH2A axis are implicated in MAPK inhibitor response – A)** Bubble plot reveal differentially functional enrichment GO terms score groups enriched (NES) in melanoma cell exposed to under BRAFi (GSE98314) during 24h compared to DMSO, GO terms are listed. The x-axis label represents the normalized enrichment score (NES). Protein deubiquitination (red box) and UbH2A target genes (blue box) are visualized. FDR corrected p-values are ranked in  $-\log(2)$  color. **B)** Heatmap evaluated transcript levels of Deubiquitinase genes of GO:0016579 in eleven BRAF mutated melanoma cell lines under MAPK inhibitors (Dabrafenib or a combination with Trametinib) compared to DMSO treated cell (each colume correspond to cell line). Color scale: red, high expression; blue: low expression. Each line represents one gene. **C)** Western blot analysis of PSMD14 and ubH2A after dose-dependent combination treatment of BRAFi (vemurafenib) and MEKi (cobimetinib) of A375 cells. **D)** Viability curves obtained under a series of combination inhibitors concentrations (1:10 ratio) of the MAPK pathway (vemurafenib/cobimetinib) for 48 h in A375 after depleting PSMD14 and RNF2 relative to control condition (siCtrl). **E)** Détection intégrée en temps réel par Incucyte® de la cytotoxicité des cellules A375 contrôlées et déplétées en PSMD14 après traitement par MAPKinh au ration vemurafinb 1 $\mu$ M- cobimetinib 10 $\mu$ M pendant 24h. Les cellules mourantes sont marquées avec le colorant rouge Incucyte® Cytotox et les valeurs sont détectées en temps réel. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*P  $\leq$  0.05, \*\*P  $\leq$  0.01, and \*\*\*P  $\leq$  0.001 (one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc comparison tests). **F)** Control and PSMD14 knockout A375 cells were treated with BRAFi/MEKi for 24h, and lysates were assessed by western blotting for indicated proteins. HSP90 served as the loading control. **G)** Viability curves obtained under a series of concentrations of combined inhibitors (ratio 1:10) of the MAPK pathway (vemurafenib/cobimetinib) for 48 h in A375 cells overexpressing the wild type (HA-PSMD14) compared to parental control cells (HA-GFP) **H)** clonogenic assay on the effects of overexpression of wild-type or mutant PSMD14 or in the presence of PSMD14inh (1 $\mu$ M) after 21 days treatment with MAPK inhibitors **I)** Expression levels of PSMD14 in M229/M238 melanoma cells during the BRAFi-resistance acquisition. P: parental cells, 2D: two days of treatment, DTP: drug-tolerant persister cells, DTPP: drug-tolerant proliferating persister cells, SDR: single-drug-resistant cells (BRAFi) (Song et al, 2017). **J)** Western blot of PSMD14 and Ubh2A expression on various stages in A375 following MAPKinh treatment. condition are as follows: P: A375 parental isogenic BRAFV600E; TX: BRAF/MEKinh 24h; PR: cancer cells surviving (14 days- residual cancer cells "persist"); DDR: isogenic pair doubly resistant to the combination of BRAF and MEK inhibitors (BRAFi + MEKi) was generated by treating the A375 parental lines with vemurafenib/trametinib (200nM). **K)** PSMD14 expression and ubH2A-specific target gene score on single cell RNA sequencing of PDX model MEL006 pre-treatment (T0), following 24h of treatment to dabrafenib-trametinib and during minimal residual disease (T28) and resistant phase (TRES) (GSE116237- Florian Rambow et al 2018) **L)** Change in tumor volume of A375 xenografts in nude mice after treatment with BRAFi+MEKi (vemurafenib/ cobimetinib orally at a dose of 30m/kg and 7mg/kg respectifly every two days ) alone or in combination with

PSMD14inh (15mg/kg) compared to vehicle (n = 8–12 mice/group). Error bars represent mean and SEM. (\*\*\*) $P < 0.001$ , 2way ANOVA). **M)** Depiction of the mechanism of action of PSMD14 on histone ubiquitination and on cell fate and drug resistance.





#### **Figure 4supp - PSMD14/ubH2A axis are implicated in MAPK inhibitor response – A)**

Signature ubH2A-specific gene set enrichment profile of melanoma cell lines treated with dabrafenib ± trametinib (GSE98314) **B)** PSMD14 expression within A375 after BRAF inhibitor (GSK2118436) or MEK inhibitor (GSK1120212) administration alone or in combination, data set from GSE35230. **C)** PSMD14 mRNA expression in two different melanoma lines (A375 and 501MEL) following combination of vemurafenib 1µM and cobimetinib 10µM (N= 3. Data are presented as mean ± SEM. \*\*\*P ≤ 0.001). **D)** Cytotoxicity curve of A375 cells in response to a range of BRAFi and MEKi concentrations determined by using Incucyte® Cytotox red dye. Data are presented as mean ± SEM. **E)** representative images of A375 cells dye-stained with a real-time cell death marker (Incucyte® Cytotox Red) in control or PSMD14-deleted conditions with or without vemurafenib 1µM- cobimetinib 10µM for 24h. **F)** Clonogenic assay and values following crystal violet staining after 21 days of treatment on A375 cells lacking PSMD14 or RNF2 compared to control (N=2, Data are presented as mean ± SEM. \*P ≤ 0.05, \*\*P ≤ 0.01 and \*\*\*P ≤ 0.001 **G)** Synergy scores from A375 ,determined for the combination of PSMD14 inhibitor and Vemurafenib (BRAFi)+Cobimetinib (MEKi) according to the Loewe Additivity model; Scores >1 are characteristic of synergy above additivity also visible in BRAF 501MEL and ACC62 mutant melanoma cells. **H)** CellMinerCDB visualization and exploration of pharmacological-molecular relationship between PSMD14 expression levels to Vemurafenib activity in the NCI-60. **I)** Expression level of PSMD14 in cutaneous melanoma biopsies before the BRAFi treatment (baseline) and during the relapse. Cohort from (Hugo et al, 2015b - GSE65186). The expression level of our BRAFi-resistance genes is increased in relapse samples (48%, n = 21). **J)** Correlation of indicated gene expression with PSMD14 expression (HTSeq (<https://gdc.xenahubs.net>) fragments per kilobase transcript per million mapped reads [FPKM]) in the Genomic Data Commons (GDC) TCGA melanoma dataset (SKCM cohort, n = 421). Spearman's order. **K)** PCA analysis of PSMD14 expression within melanoma cell lines according to their dedifferentiation states. Expression of PSMD14 in these four melanoma cell subtypes (U, undifferentiated; NC, neural crest-like; T, transient; M, melanocytic). Number in each group: U = 10, NC = 14, T = 12, M = 17. Error bars reflect the mean ± s.d. Multiple comparisons were performed using ordinary one-way ANOVA \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

Review

# Emerging Role of Deubiquitinating Enzymes (DUBs) in Melanoma Pathogenesis

Mickael Ohanna <sup>1,2,\*</sup>, Pierric Biber <sup>1,2</sup> and Marcel Deckert <sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, 06204 Nice, France; pierric.biber@univ-cotedazur.fr (P.B.); deckert@unice.fr (M.D.)

<sup>2</sup> Team MicroCan, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, 06204 Nice, France

\* Correspondence: michael.ohanna@inserm.fr; Tel.: +33-(0)4-8915-3853

**Simple Summary:** Metastatic melanoma is one of the most aggressive skin tumors with a poor prognosis. Despite the efficacy of immunotherapy and targeted therapies, advanced melanoma patients are often refractory to treatments and have high rates of relapse and death. A major challenge is to identify and understand the mechanisms associated with melanoma development and resistance to gold-standard therapies. Thus, new therapeutic strategies are needed. Ubiquitination is a post-translational modification that plays a crucial role in various cellular biological activities and participates in cancer pathogenesis, including melanoma. Here, we report on the deubiquitination enzymes (DUBs) and their ubiquitin-modified substrates and signaling pathways involved in melanoma progression.

**Abstract:** Metastatic melanoma is the leading cause of death from skin cancer. Therapies targeting the BRAF oncogenic pathway and immunotherapies show remarkable clinical efficacy. However, these treatments are limited to subgroups of patients and relapse is common. Overall, the majority of patients require additional treatments, justifying the development of new therapeutic strategies. Non-genetic and genetic alterations are considered to be important drivers of cellular adaptation mechanisms to current therapies and disease relapse. Importantly, modification of the overall proteome in response to non-genetic and genetic events supports major cellular changes that are required for the survival, proliferation, and migration of melanoma cells. However, the mechanisms underlying these adaptive responses remain to be investigated. The major contributor to proteome remodeling involves the ubiquitin pathway, ubiquitinating enzymes, and ubiquitin-specific proteases also known as DeUBiquitinases (DUBs). In this review, we summarize the current knowledge regarding the nature and roles of the DUBs recently identified in melanoma progression and therapeutic resistance and discuss their potential as novel sources of vulnerability for melanoma therapy.

**Keywords:** melanoma; skin cancer; ubiquitination; deubiquitination; proliferation; invasion; metastasis



**Citation:** Ohanna, M.; Biber, P.; Deckert, M. Emerging Role of Deubiquitinating Enzymes (DUBs) in Melanoma Pathogenesis. *Cancers* **2022**, *14*, 3371. <https://doi.org/10.3390/cancers14143371>

Academic Editor: Adam C. Berger

Received: 25 May 2022

Accepted: 5 July 2022

Published: 11 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

### 1.1. Melanoma

Melanoma is a tumor arising from the malignant transformation of melanocytes, pigment-producing cells from the neural crest [1,2]. Several prevalent clinical types of melanoma exist, including cutaneous, uveal, and acral melanoma, according to the location of the transformed melanocyte within the body. In this review, we focus on cutaneous melanoma as it is the most dangerous type of skin cancer, accounting for only 4% of skin cancers, but responsible for approximately 80% of deaths. In the top 20 most prevalent cancers overall, the increasing incidence of cutaneous malignant melanoma accounted for around 330,000 cases (1.6%) of all newly diagnosed cancers worldwide and more than 58,000 deaths in 2021 (Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>) (accessed on 1 July 2022)). Melanoma development is due to increased genetic and epigenetic alterations,

which create an imbalance in homeostatic signaling pathways. This leads to excessive proliferation of out-of-control tumor cells and subsequent dissemination to distant sites, invading organs and metastasizing. This high mortality and morbidity rate is related to its high ability to metastasize, migrate by tropism, and invade specific sites, such as lymph nodes, the brain, lungs, or liver [3,4]. When metastasis is clinically evident, the prognosis is very poor. Consistent with the Breslow thickness and Clark's model, melanoma progression is generally described as a linear process, passing first horizontally through the epidermis and then vertically with a high level of proliferative capacity as indicated by the Ki-67 index; these are currently the most important prognostic factors in invasive melanoma [5]. The process is recognized today as being much more complex and less linear in nature. At an early stage, patients with primary cutaneous melanomas are managed by surgical excision with a high remission rate [6] and a good long-term prognosis with a high survival rate at 5 years. Furthermore, the difficulty lies in the diagnosis of early forms of melanoma, with initial management primarily guided by the Breslow thickness (BT), which is the depth of tumor invasion into the dermis, a prognostic method that remains unreliable and demonstrates its shortcomings in risk stratification. There is an urgent need to understand the mechanisms and explore methods of making an accurate assessment of small melanomas with metastatic potential in order to target them and develop new treatments.

Over the past 10 years, new therapeutic options have emerged for the management of patients diagnosed with metastatic melanoma with the discovery of an activating mutation in the gene that codes for the protein kinase BRAF, following studies of the mutational "landscape" in melanoma and supported by more recent data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) project [7]. About 50% of melanomas carry activating mutations in the BRAF oncogene and about 30% in the NRAS gene leading to overactivation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, making this signaling cascade a preferential target for melanoma treatment [8]. Several highly selective RAS/MAPK signaling pathway inhibitors have been identified, and this has changed the curative measures applied to these patients. The clinical use of BRAF inhibitors (vemurafenib, dabrafenib, and encorafenib) and MEK inhibitors (trametinib, cobimetinib, and binimetinib) in specific combinations, which have proven to be superior to single-agent therapy, has been shown to be effective in the treatment of melanoma and to significantly improve patients' progression-free survival and overall survival [9]. Unfortunately, these treatments tend to become progressively less effective, and most patients develop resistance to these inhibitors soon after starting treatment, categorized as acquired resistance, thus adding new categories of patients: those with intrinsic or adaptive (tolerance) resistance to the drugs whose resistance is already present before starting treatment or emerges within hours of treatment. Acquired resistance to inhibitors is commonly caused self-autonomously by genomic rewiring through genetic aberrations of components of the MAPK pathway and its hyperactivation as well as parallel signaling networks such as the PI3K/AKT kinase cascade and alterations in mitochondrial oxidative or redox metabolism [10–13]. This concept of adaptive capacity is reported in a range of studies as arising from the ability of a sub-population of tumor-derived cells to evolve into a persistent and tolerant state during the initial phases of drug treatment, while most of these tumor cells die [14–16]. Single-cell profiling has shown that some of the genetically distinct rare clones, thus fully resistant, can re-enter the cell cycle during treatment and reform the tumor [17–19]. The biological events involved are reversible drug or non-genetic adaptation mechanisms that are characterized by changes in the expression of genes involved in cellular plasticity leading to a dedifferentiated state as well as transcriptional, metabolic, and epigenetic signaling pathways [20,21]. Thus, despite the potential of this precision cancer therapy, these treatments also highlight problems of drug resistance that limit the benefit to the patient. Thus, a greater knowledge of the processes of drug adaptation holds the promise of improving the success of melanoma therapy by postponing or reversing acquired resistance.

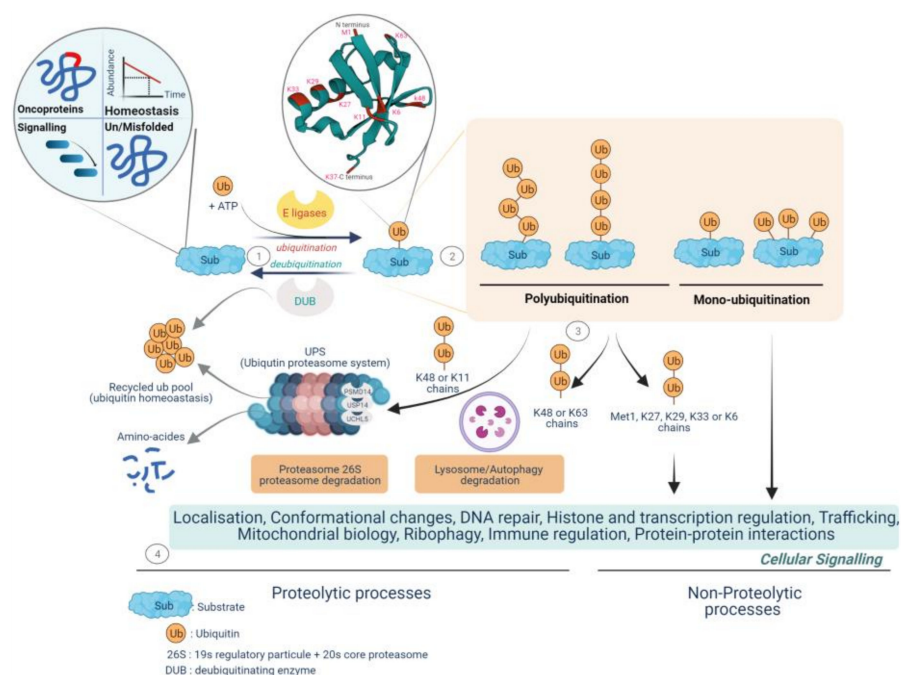
In recent years, a new era in cancer treatment has emerged with the development of cancer immunotherapy, which seeks to use the patient's innate and adaptive immune system to recognize and destroy tumor cells. The improved understanding of the immune system based on the modulation of immune checkpoint blocking systems at the cell surface has led to a new age of treatments for melanoma and has become the first-line treatment, even though long-term and durable tumor regression was observed in only a subset of patients [22]. The clinical development of antibodies specifically designed to block immune checkpoint molecules such as CTLA-4 (ipilimumab) and PD-1-/PD-L1-blocking antibodies (pembrolizumab, nivolumab, and atezolizumab) are currently approved as monotherapies for the first-line treatment of advanced melanoma [23–26]. In spite of such advances, these treatments are also limited by the fact that 40–50% of patients do not respond to these treatments (primary resistance), and, even in responders, resistance to therapy develops in the majority of patients (acquired or secondary resistance). Several causes of resistance to immunotherapy or immune escape have been identified, including defects in antigen presentation in certain tumors or the lack of recognizable foreign antigens. The production of a range of immunosuppressive proteins and metabolic changes both in tumor and T cells are part of the resistance to immune checkpoint blockade therapies [27–29].

Accordingly, there is still an unmet need to find alternative therapy options to improve the treatment of melanoma. In this perspective, whether genetic or non-genetic alterations are involved in resistance mechanisms or intrinsic or exogenic drivers leading to epigenetic and transcriptional rearrangement, melanoma cells must fine-tune protein homeostasis and function to support unrestricted cell proliferation. Modulation of the machinery controlling protein ubiquitination, a type of post-translational modification (PTM), has an impact on the stability and functional activity of proteins implicated in a plethora of regulatory pathways such as DNA damage and repair, cell cycle progression, apoptosis, endocytosis, and signal transduction essential for supporting cellular functions. In this review, we focus on recent studies regarding the enzymes involved in protein deubiquitination, the deubiquitinating enzymes (DUBs), which affect the hallmarks of cancer and have a possible impact on melanoma pathogenesis.

### 1.2. The Ubiquitin Pathway

The modulation of cell signaling depends critically on a repertoire of protein post-translational modification (PTM) mechanisms, which provide an extra regulatory layer that contributes to the functional diversity of the proteome. Protein ubiquitination has emerged as a modification used by signaling processes to regulate a range of functional behaviors [30,31]. Protein ubiquitination (or ubiquitylation) is the dynamic process of covalent binding of the C-terminal glycine of ubiquitin, a small protein of 76 amino acids, to a lysine moiety on protein substrates, whereby serine, threonine, cysteine, and N-terminal methionine moieties can also be modified [32]. Target proteins can be either monoubiquitinated by the addition of a single ubiquitin molecule or polyubiquitinated by the consecutive addition of several ubiquitins to the previous ubiquitin leading to disparate fates of the modified proteins. The designation of the polyubiquitination chain depends on the type of lysine residue (seven lysine residues: K6, K11, K27, K29, K33, K48, and K63) to which the ubiquitin attaches, which also gives rise to a variety of biological outcomes. Lys48-linked chains mainly tag proteins for 26S proteasome-mediated recognition and degradation while K63-related chains play a variety of non-degradative roles and can alter signaling and transcriptional processes as well as protein interaction or localization [30,31]. Monoubiquitination plays an active role in histone regulation and DNA damage repair, signal transduction, trafficking of receptors, and stress response [33,34]. The ubiquitin–proteasome system (UPS) is implicated in the degradation of more than 80% of short-lived proteins in cells and ensures the elimination of useless, damaged, misfolded, and potentially dangerous proteins and the recycle of ubiquitin. Most of the proteins involved in the cell cycle, cell adhesion, migration, invasion, apoptosis, differentiation, angiogenesis and tumor growth, antigen

processing, cytokine signaling, transcription, and DNA damage response are regulated by UPS (Figure 1).

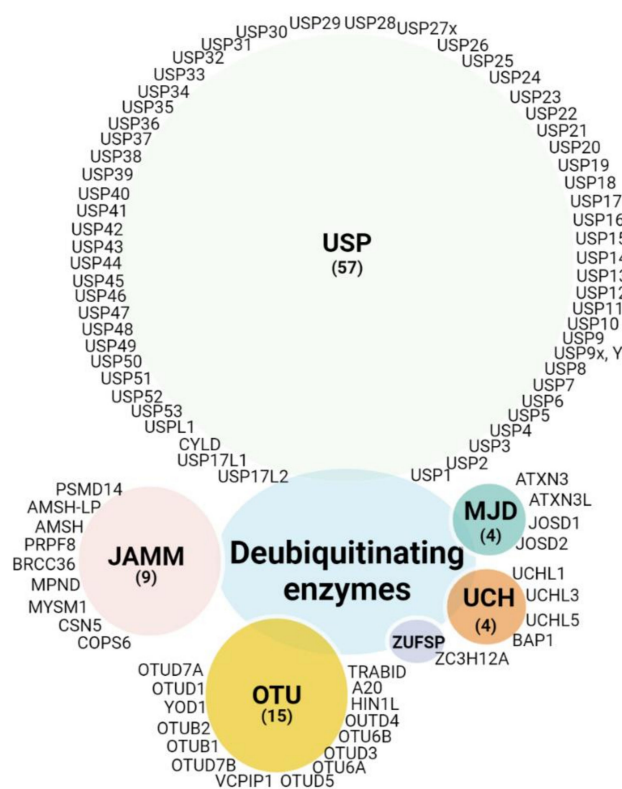


**Figure 1.** Fate of protein-tethering ubiquitin, a post-translational modification, to proteolytic and non-proteolytic pathways, resulting in specific cellular responses. The ubiquitination process drives protein homeostasis by controlling abundance, temporal and structural integrity, proper localization, and protein non-mutational burden. Called the quality control function, it supports nearly all the cellular functionalities implicated in protein–protein interactions, gene expression, signal transduction cascades, and metabolic pathways. **1**—Protein ubiquitination is performed by the coordinated activity of ubiquitin ligase (E1, E2, and E3 enzymes) and deubiquitinating enzymes (DUBs), called deubiquitination, by antagonizing ligase activity and altering the substrate fate. **2**—Ubiquitin is covalently transferred (isopeptide bonds) between the C-terminal glycine residue (Gly) and substrate lysine residues (Lys) to form monoubiquitinated proteins or can join up with other ubiquitin molecules at the intrinsic N-terminal Met1 residue and/or at the seven intrinsic Lys residues (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, and Lys63) and may form multi- or poly-ubiquitin chains. **3**—The fate and function of ubiquitinated proteins are affected by the topology and type of ubiquitin-binding. The K48/K11 polyubiquitinated chains have historically been identified as mediating proteasomal degradation of normally folded short-lived proteins and recycling ubiquitin called the ubiquitin–proteasome system (UPS). To date, three deubiquitinases, the metalloprotease PSMD14 and the two cysteine proteases UCHL5 and USP14, have been found to be components of the proteasome 19S regulatory particle implicated in both binding of the ubiquitinated substrate and proteasome activity. **4**—The UPS is a selective and irreversible protein removal mechanism that controls signal transduction, cell division, stress response, and immune adaptation. The degradation of misfolded proteins by the UPS or autophagy is mainly mediated through K48/K63 branch chains. Met1/K63/K29 linkage can modulate various non-degradative processes such as signal transduction, DNA repair, and kinase activation. Lys6-linked chains have been identified as being involved in mitophagy. Mono-ubiquitination plays various roles in such functions as protein trafficking, DNA repair, chromatin remodeling, and regulation of transcription. (Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com), accessed on 20 June 2022).

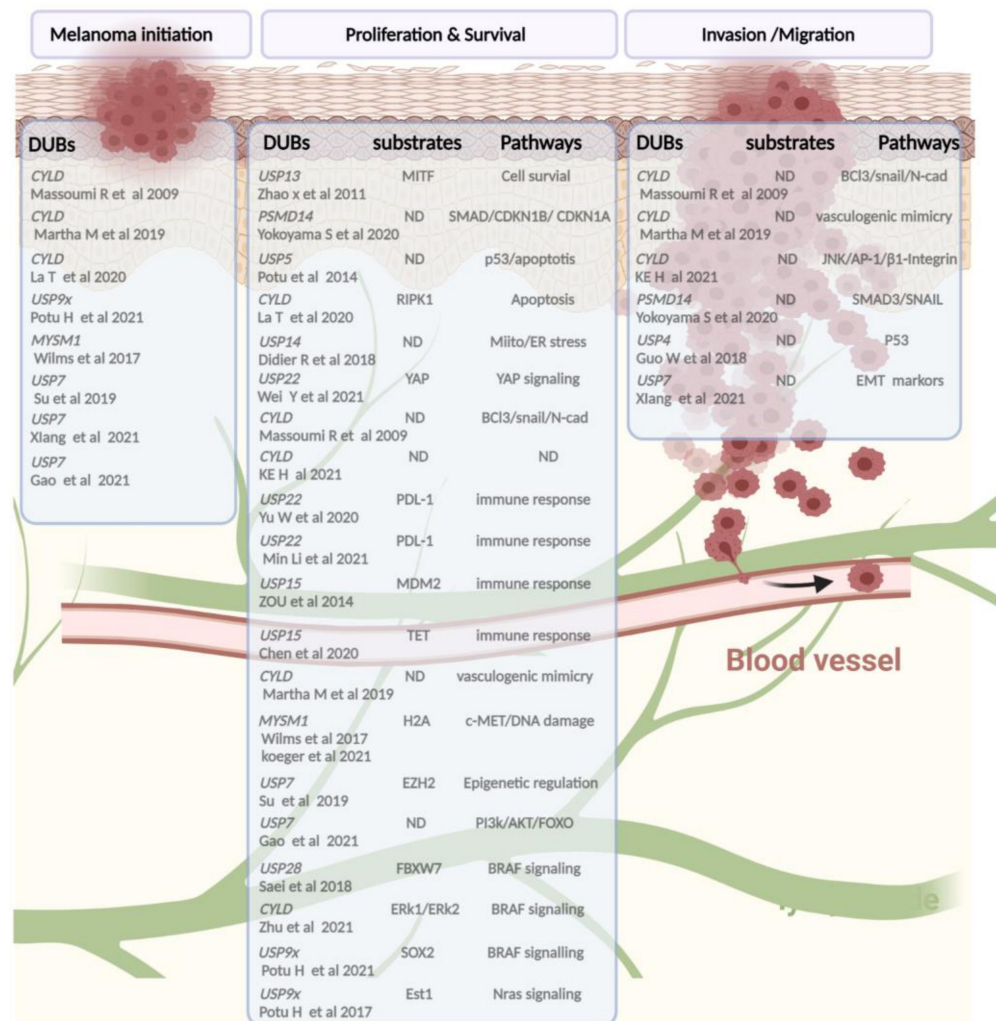
The classical cascade of ubiquitin conjugation to a protein substrate (ubiquitination) is initiated by a family of ATP-dependent enzymes called E1-activating enzymes, in which ubiquitin is transferred to the cysteine residue of the active site of E1 with an adenylation of the second ubiquitin, subsequently followed by the transfer of the adenylated ubiquitin

to the active site of the E2 ubiquitin conjugating-enzymes (E2 conjugators) and completed by the ligation of ubiquitin to the lysine residues of the target proteins by E3 ligases, which plays a key role in the specific type of ubiquitinated substrate and its associated function [35].

Since ubiquitination is a dynamic and reversible process, the removal of ubiquitin is catalyzed by DUBs. Thus, the main function of DUBs, beyond their role in protein stabilization, is to adjust the degree of protein ubiquitination/deubiquitination, protein activity, and subcellular localization, and to preserve the cellular pool of monoubiquitin. Around 100 DUBs are encoded in the human genome and have been divided into six families based on sequence and structure, including UCH (ubiquitin C-terminal hydrolase), USP (ubiquitin-specific protease), OTU (ovarian tumor proteases), Josephin (Machado-Joseph disease, MJD), ZUP1 (zinc finger-containing ubiquitin peptidase), and the JAMMs (JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme) [36–38]. The first five families are cysteine proteases, while the JAMM proteins belong to the zinc-dependent metalloproteinase family. There are approximately 57 USPs, 4 UCHs, 15 OTUs, 4 MJDs, 1 ZUP1, and 9 JAMMs (Figure 2). Due to the number and variety of their substrates, DUBs can drive various cellular processes such as the cell cycle, apoptosis, gene transcription, and DNA repair, and they can exhibit versatile functions in tumor progression, such as epithelial-mesenchymal transition (EMT), cancer stem cell development, metastasis, and tumor microenvironment cross-talk. Here, we compile evidence regarding the involvement of DUBs and related substrates in several biological processes and their relevance in melanoma progression and therapeutic response (Figure 3).



**Figure 2.** DUB categories: DUBs currently encoded in the human genome are clustered in five classes depicted in different color schemes. Of the six subfamilies, five are cysteine proteases: ubiquitin C-terminal hydrolases (UCH), ubiquitin-specific proteases (USP), zinc finger-containing ubiquitin peptidase (ZUP1), Machado-Joseph disease proteases (MJD, Josephins), and ovarian tumor proteases (OTU), and a one family belongs to the Jab1/Pab1/MPN domain-associated zinc metalloproteases (JAMM). (Created with BioRender.com, (Created with BioRender.com, accessed 20 June 2022).



**Figure 3.** A schematic snapshot of deubiquitinases involved in melanoma pathogenicity based on published studies. From left to right, the following categories are shown: DUBs implied in tumor initiation or progression, mainly found in vivo studies, followed by a list of DUBs and their substrates and/or signaling pathways leading (in bold) to alteration of the proliferation, therapeutic response adaptation, and invasion/migration processes of melanoma cells. (Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com/), accessed on 20 June 2022).

## 2. Deubiquitinating Enzymes in Melanoma

### 2.1. Ubiquitin-Specific Proteases (USPs)

#### 2.1.1. USP4

The ubiquitin-specific protease USP4 is another novel oncogene that belongs to the USP family. It causes a strong increase in melanoma tissue and is almost undetectable in nevus tissue or primary tissue. Deletion of *USP4* does not directly impact melanoma cell proliferation but increases melanoma susceptibility to DNA damage-induced cell apoptosis, depending on p53 signaling [39]. Previous reports have associated DNA repair, p53 stability, and USP4 with cancer [40]. In a large library screening of USP cDNA expression after DNA damage, USP4 was found to be one of a group of peptidases having a profound negative effect on p53 activity, by a degradation-dependent mechanism without affecting its transcription. This regulation depends on the binding of USP4 to ARF-BP1 through deubiquitination, promoting ARF-BP1-dependent ubiquitination and degradation of p53, which indicates its tumor-promoting role [40]. Altered USP4 expression inhibits the invasion and migration capacity of melanoma cells with a drastic decrease in N-cadherin and an increase in E-cadherin mRNA and protein, both markers of epithelial–mesenchymal

transition (EMT) [39]. More importantly, USP4 appears to be a regulator of different cellular pathways and targets a variety of substrates. Like the previously described deubiquitinases, USP4 plays a role in critical signaling pathways. It inactivates the NF- $\kappa$ B signaling pathway by targeting TRAF2 and TRAF6 for deubiquitination or by regulating DNA damage response (DDR) with a direct interaction with the MRN (MRE11-RAD50-NBS1) and CtIP complexes that are required for initiating DSB repair [41].

Interestingly, USP4 is one of the DUBs that undergoes activity-dependent relocation. The activated protein kinase B (AKT)-dependent phosphorylated form of USP4 (Ser 445) is an indispensable process that leads to the relocation of USP4 from the nucleus to the cytoplasm where it subsequently exercises its deubiquitinating capacity [42]. These USP4-associated pathways are vital in the pathogenic role of melanoma; however, they remain to be explored.

### 2.1.2. USP5

It is noteworthy that, among a large number of DUBs, USP5 was the first enzyme studied in relation to the BRAF signaling pathway [43]. When profiling the DUB active site using the HA-UB-VS probe, the DUB catalytic site of USP5 was found to be both downregulated after BRAFinh (vemurafenib) or inversely upregulated after BRAF activation in a heterologous cell line under BRAFV600E overexpression. USP5 has been implicated in the tumorigenesis of various types of human cancers. Consistent with this observation, the depletion of *USP5* in BRAF mutant or non-mutant melanoma cells has a greater effect on growth in 3D models than in 2D ones. Furthermore, overexpression of *USP5* promotes a proliferative advantage in 2D models, but its effect on proliferation-independent anchoring was not proposed in this study. Several DUBs have been reported to regulate p53 stabilization directly or indirectly by suppressing their level of polyubiquitination linked to p53 K48, and USP5 is one of the DUBs involved in these processes. Thus, arrested melanoma cells lacking USP5 are associated with upregulation of p53, p21, and, specifically, p73 in p53 mutant cells, resulting in impaired entry into the G2/M phase of the cell cycle. Furthermore, USP5 deprivation is associated with an increase in p53, p21, and p73 activity. Furthermore, USP5 deprivation leads to an increased sensitivity to the cell death program with increased p53 and caspase 8 and caspase 3 cleavage in combination with BRAFinh [43]. Several USP5 inhibitors have been proposed for human cancers, such as PYR-41, formononetin [44], and WP1130 or one of its optimized analogues EOAI3402143 (G9) [45,46], but these compounds do not exclusively target USP5. In melanoma, G9 synergizes with a BRAF inhibitor and an MEK inhibitor to enhance apoptosis signaling, increase sensitivity to targeted therapies, reverse resistance to vemurafenib in vitro, and reduce tumor growth in vivo [43]. Targeting USP5 offers a potential therapeutic strategy for p53-related melanoma, and, in combination with current therapeutic strategies, it alters cell growth and cell cycle distribution associated with p21 induction in melanoma cells.

### 2.1.3. USP7

USP7, also known as herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease (HAUSP), was originally implicated in many cellular functions such as the cell cycle, apoptosis, and DNA repair through its interaction and stabilization with P53, a tumor suppressor [47]. As USP7 acts on a broader range of chromatin-associated events such as transcription, chromatin organization, and DNA repair through deubiquitination of the histone H2A and H2B variants, it has been found to be a key component in the regulation of DNA repair. The dynamic regulation of H2A or H2B ubiquitination has been associated with several disease processes, particularly in melanoma [48,49]. *USP7* depletion or pharmacological inhibition by P22077 treatment in melanoma or murine (B16) cell lines has been shown to alter tumor expansion in vivo, cell proliferation in vitro, and migration and invasion [49–51]. The cytotoxic effect of inhibiting USP7 activity induces ROS production and DNA damage, a mechanism that is independent of p53 signaling. Cells lacking *USP7* show an increased susceptibility to BRAF [49] inhibitors, which makes this DUB a good therapeutic target in melanoma in



combination with existing treatments. In tumor progression, consistent findings show that *USP7* levels are increased in both the transition from nevi and benign to cutaneous melanoma and also in melanoma tissue relative to normal tissue [49,50]. In terms of its mode of action, *USP7* appears to stabilize and interact with *EZH2*, which is also implicated in the chromatin repressive complex 2 (PRC2) that mediates transcriptional repression by impairing the transcription of Forkhead Box O1 (*FOXO1*), the transcription factor that drives genes involved in the apoptotic response, cell cycle, and cell metabolism [49]. The levels of *USP7*, *EZH2*, and *FOXO1* were found to be correlated with tumor histological grades. Of interest, the proteome of cells lacking *USP7* shows a metabolic pathway dysfunction including an inhibition of the PI3K/AKT/FOXO signaling pathway [50]. Therefore, *USP7* plays a role at several scales in melanoma by monitoring the mitogenic activation of the PI3K-AKT signaling pathway, metabolic activation by controlling the redox status of cells, and epigenetic and transcriptional regulation.

#### 2.1.4. *USP9X*

Another important drug target in melanoma is the deubiquitinase *USP9X* (X-linked ubiquitin-specific peptidase 9), which prevents the degradation of ubiquitin-specific proteins that are essential in various biological pathways involved in the regulation of cell transformation and survival. *USP9X* activity and expression were found to be elevated in metastases compared to those in the primary tumor [52]. Thus, enforced expression of *USP9X* enhances tumor growth in vitro and in vivo [52,53]. Particularly for *USP9X*, its expression and activity are upregulated after ectopic expression of *BRAFV600E* in 293T cells; conversely, inhibition of the kinase partly suppresses *USP9X* activity in vemurafenib-sensitive but not resistant cells, indicating that *USP9X* is one of the first DUBs whose activity is dependent on MAPK signaling [52]. Although depletion of *USP9X* reduces tumor growth in melanoma cells carrying *BRAF* or *NRAS* mutations, its combination with MAPK pathway inhibitors (vemurafenib or MEKi) has been shown to enhance the therapeutic response [52]. This improved apoptotic response is mediated by the stability of the transcription factor *SOX2*, a treatment-induced protein, which, upon depletion of *USP9X*, leads to *SOX2* breakdown, thereby inducing death signals that inhibit growth in vitro and in vivo [52,53]. This *USP9X* regulation of *SOX2* is a recurrent mechanism in prostate cancer and osteosarcoma [46,54]. Of interest, inhibition of *USP9X* activity by the small-molecule inhibitor DUB G9 also appears to have susceptibility to tumor growth in *NRAS* mutant lines compared to *BRAF* lines in vivo and in vitro. Upon investigation, the deletion or pharmacological inhibition of *USP9X* was found to reduce the level of *NRAS*. This regulation could be achieved through a direct interaction of *USP9X* with the transcription factor *ETS-1*, preventing its proteasomal degradation by deubiquitination, and favoring its binding activity on *NRAS* promoters in melanoma cells [53]. The *ETS* family function has been poorly studied in melanoma, with only *ETS1* described as favoring invasion and being involved in resistance to MAPKinh. While *ETS-1* and *ETS-2* are both targets of ubiquitination, loss of *USP9X* only affects the *ETS-1* protein. *USP9X* inhibition has emerged as a therapeutic strategy alone or in concert with existing therapeutics.

#### 2.1.5. *USP13*

The deubiquitinase *USP13* is a member of the *USP* subclass of the deubiquitinating enzyme superfamily. *USP13* can remove ubiquitin chains from its substrates to inhibit protein degradation. It has been reported that among the DUB family involved in *MITF* (microphthalmia-associated transcription factor-M) deubiquitination, only *USP13* stabilizes and increases the protein levels of *MITF*, which, in turn, affects the expression of its target gene expression *Trpm1* and *c-Met* [55]. Depletion of *USP13* in *MITF*-positive melanoma cells reduces *MITF* protein levels without affecting *MITF* mRNA levels through regulation of its ubiquitination state and the subsequent increase in *MITF* proteasome-mediated degradation. Consequently, *USP13* is involved in cell cycle progression, cell colony formation in vitro, and the growth of tumor xenografts in vivo. This is the only study that implicates

USP13 deubiquitinase in melanoma development by regulating MITF protein stability. However, given the critical role of MITF in so many aspects of the developmental and therapeutic response to BRAF<sup>inh</sup>, the possibility of targeting USP13 activity as responsible for MITF stability needs to be further studied in some aspects of melanoma therapy.

#### 2.1.6. USP14

The deubiquitinating enzyme ubiquitin-specific protease 14 (USP14) represents the only DUB USP family that reversibly associates with the proteasomal 19S regulatory particle [56,57]. This association with the proteasome subunit occurs through the ubiquitin-like domain (Ubl) at the N-terminus of USP14 [58]. Through its strategic location, USP14 serves as a negative and selective regulator of the 26S proteasome, acting as a brake on protein degradation by deubiquitination and facilitating free ubiquitin recycling [58]. The fact that USP14, as well as PSMD14 and UCHL5, are specific subunits of the proteasome makes them the last DUBs encountered prior to proteasome engagement and protein degradation and also makes them attractive therapeutic targets for the treatment of cancers that depend on their ability to absorb the excessive accumulation of toxic proteins and oncogenes. Recent research on melanoma has revealed that USP14 activity inhibition, via the small molecule b-AP15, or loss of function triggers the accumulation of poly-ubiquitinated proteins and a stress response in the ER leading to dysfunctional cell proliferation combined with cell death irrespective of caspase activities [59]. Interestingly, the antitumor effect of USP14 targeting is applicable to *BRAFV600E*-, *NRAS*-, and *NF1*-mutated melanoma cells and to BRAF/MEK inhibitor-resistant cells [59]. Similar observations were made in other cancer types such as myeloma cells [60]. A reduction in tumor growth and the induction of cell death in vivo were observed following b-AP15 treatment in melanoma xenografted mice [59]. While high expression levels of *USP14* are closely correlated with poor prognosis and follow tumor disease progression, its activity was increased in tumor cells as compared to normal melanocyte cells and in BRAF<sup>i</sup>-resistant cells as compared to the parental cells, resulting in higher responsiveness to b-AP15. These results point to USP14 as a valuable candidate for melanoma treatment and the prevention of resistance to MAPK-targeting therapies.

#### 2.1.7. USP15

USP15 (ubiquitin-specific peptidase 15 or ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15) belongs to the USP family, and melanoma is one of the cancer tissues where USP15 expression shows a high degree of immunoreactivity ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org), accessed on 7 June 2022). The USP15 gene is unusually composed of 22 exons for which eight human isoforms have been described, which may imply specific functions for those isoforms in melanoma. To date, USP15 is an attractive DUB target because of its involvement in both tumor growth and immunity processes [61,62]. Murine or human melanoma cells lacking USP15 were found to exhibit a proliferation arrest and an apoptotic induction in vitro with reduced tumor growth in nude mouse xenografts in vivo. USP15 functionally interacts with and stabilizes the oncoprotein (E3 ubiquitin ligase) MDM2 to avoid its proteasomal degradation and regulates the signaling of p53, a mediator of cell survival. This mechanism appears to be maintained in other cancers such as colon cancer [61] and glial cancer [63], as well as in lymphocyte cell sub-populations such as T cells, but not in murine B cells or thymocytes nor in human primary fibroblasts [61]. Evidence regarding the relationship between USP15 and the melanoma immune response is based on two investigations [61,62]. In *Usp15*  $-/-$  (KO) mice as compared to wild-type (WT) mice and after B16 injection, the growth curve of melanoma cells was profoundly reduced with a prolonged lifespan. In such mice, *Usp15* deficiency enhanced MDM2/NFATC2 pathway-dependent T-cell activation in vitro and a strong T-cell tumor infiltration in vivo with a major contribution of T-cell-mediated IFN- $\gamma$  within the anti-tumor immune response [61]. The underlying mechanism behind this control places the USP15 axis and the immune response in relation to epigenetic modifications, particularly of the enzymes that catalyze DNA methylation in

the ten-to-eleven translocation (TET) family, enzymes frequently altered in hematopoietic pathologies. Therefore, USP15 interacts with and inactivates TET2 by altering its DNA binding to the inflammatory genes. In contrast, the deletion of USP15 enhances TET activity and tumor-intrinsic chemokines as well as infiltration and IFN- $\gamma$  production from active T cells. Further studies providing additional support for USP15 functions in IFN signaling include I $\kappa$ B $\alpha$  regulation and the E3 ligase TRIM25, which both play a critical role in the innate and inflammatory immune response [64,65]. At this stage, USP15 in melanoma appears to be involved in the anti-tumor immune response and its targeting could be a useful strategy to inhibit growth by inducing apoptosis of tumor cells by activating anti-tumor immunity and/or by boosting the efficacy of existing immunotherapy.

#### 2.1.8. USP22

Ubiquitin-specific peptidase 22 (USP22) is a novel DUB in melanoma that has been linked to cell cycle progression, treatment resistance, metastasis, and immune response. USP22 is widely regarded as an oncoprotein; its aberrant expression has been associated with poor cancer prognosis in various types of human cancer, including melanoma patients. A higher expression of USP22 has been observed in metastatic melanoma compared to that in the primary tumor, indicating an important role in melanoma progression [66]. Recently, knockdown of USP22 in reduced melanoma cells has been associated with cell proliferation. In this mechanism, USP22-dependent proliferation is mainly under the dependence of Ye-associated protein 1 (YAP) pathways. In melanoma patient samples, a correlation between USP22 and YAP was observed, and, as a result, high USP22 expression was associated with high YAP expression. In this study, USP22 specifically interacted with and de-ubiquitinated YAP, as well as downstream target genes such as *CTGF* and *CYR61*. Depletion of USP22 decreased the half-life of YAP protein levels, but not mRNA levels, and significantly suppressed *CTGF* and *CYR61* [2,67]. Recently, YAP/TAZ activation was found to enhance resistance to MAPK inhibitor drugs. Under PLX 4032 treatment, drug-resistant melanoma cells exhibited increased nuclear accumulation of YAP/TAZ and transcriptional activity, which, in turn, conferred resistance to BRAF inhibitors in BRAF V600E mutant melanoma cells [68]. Thus, overexpression of USP22 resulted in resistance to the BRAF inhibitor vemurafenib through the stabilization of YAP and opened new therapeutic avenues for combined inhibition of USP22/YAP and BRAF as an option for melanoma treatment [67]. Another way to regulate tumor growth is to modulate the potential of tumors to hijack immune recognition and immunological response. It was recently reported that the significant reduction in tumor volume/weight upon stable knockdown of USP22 in B16 is associated with a decrease in PD-L1 stability. Conversely, overexpression of USP22 prolongs the half-life of the PD-L1 protein [69]. This study highlights a novel role for the tumor suppressive properties of USP22 via regulation of PD-L1, which suppressed antitumor immunity in melanoma mouse tumor models but also in other cancers [70]. However, the role of USP22 remains controversial at this stage and was challenged by a study showing that suppression of *Usp22* expression in B16-OVA melanoma cells markedly reduced the immune response. Inversely, overexpression of *Usp22* increased the sensitivity of T-cell-mediated killing. The mechanism of immune therapeutic response dependent on USP22 involves STAT1 stabilization via deubiquitination and promotes the FN-JAK1-STAT1 signal, which is a pathway involved in immune therapy resistance in melanoma [68]. How USP22 senses tumor microenvironment signals to regulate PD-L1, and whether other deubiquitinating enzymes are able to sense these signals, remains unknown. These new findings may provide potential therapeutic targets for enhancing the efficacy of T-cell-based immunotherapy. USP22 controls cell growth and activation in different ways: it induces changes in gene promoter regions by removing ubiquitin moieties from histones H2A and H2B leading to transcription activation [71], and it induces cell cycle progression by stabilizing *TRF1* [72], *COX-2* [73], *CCNB1* (Cyclin-B1) [74], *CCND1* (Cyclin D1), *NFAT*, and *SIRT1* [75], which regulate the genes involved in metabolism, cell cycle, invasion, and apoptosis, a pathway implicated in melanoma progression [76]. However, the functional

impact of USP22 deubiquitylation of histone or non-histone substrate regulation has not yet been studied in the melanoma process.

#### 2.1.9. USP28

As a nucleoplasm-located DUB, USP28, ubiquitin-specific peptidase 28, is among the deubiquitinases that alter the stability and turnover of critical cancer oncoproteins such as cMYC involved in the proliferation and aggressiveness of colon and breast carcinoma and glioblastoma cells [77–79]. Recently, efforts have been made to investigate DUBs involved in MAPK signaling pathway modulation. Upon functional shRNA screening of DUBs, USP28 was recognized as a regulator of the stability and abundance of BRAF, a major proto-oncogene driver of MAPK cascade upregulation in cell culture models and in vivo [80]. Although lack of *USP28* expression in melanoma cells has no impact on cell proliferation, it favors both the development of resistance to BRAF/MEK inhibitor combination therapies in vitro and in vivo and the generation of emergent tumor cells in mouse xenograft experiments. This short-term resistance results in an impairment of apoptosis markers in cells lacking USP28 under treatment. Of clinical relevance, decreased USP28 expression is more frequently observed in *BRAFV600E* melanoma patients and leads to a poorer overall survival, indicating the possible role of USP28 as a relevant factor in melanoma progression. Moreover, USP28, in addition to its role in tumor-promoting substrate stabilization qualifying as a proto-oncoprotein, it also controls the stability of several proteins involved in DNA damage response (CHEK2) [81], the metabolism (HIF1) [82], translation (JAK-STAT) [83], and the cell cycle (TP53) [84], all of which are relevant pathways in melanoma development and MAPKinh response.

#### 2.1.10. CYLD

CYLD (cylindromatosis-associated DUB) belongs to the USP class of cysteine proteases and is identified as a tumor suppressor on account of its loss of function correlated with several cancers including melanoma. CYLD expression was shown to be inversely correlated with overall and progression-free survival in melanoma patients [50,85,86]. Initial investigations into the role of CYLD in malignant melanoma have shown that its transcript or protein level is strongly decreased in primary or metastatic melanomas compared to normal human epidermal melanocytes in vitro as well as in vivo on immunohistochemistry sections [85,87]. Furthermore, *CYLD* expression is not influenced by either origin or genetic background and remains highly heterogeneous both in melanoma cells and in fresh tissue melanoma progression [86]. However, CYLD has been implicated in the control of melanoma tumorigenesis in vivo. Melanoma development and progression were studied in *Cyld*-epleted mice (C57BL/6 *Cyld* knockout) in a mouse model of spontaneous melanoma development (Tg (*Grm1*) *Cyld* +/+ mice). These *Cyld*-deficient mice showed an earlier onset and accelerated growth of melanoma compared to wild-type mice due to lymphatic angiogenesis caused by its deubiquitinase function. However, this process is a tumor-autonomous self-mechanism, as cell lines generated from these mice (Tg(*Grm1*) *Cyld* −/−) showed increased proliferation and migration, as well as clonogenicity in vitro [88]. Thus, the deubiquitinase function of *CYLD* appears to be more relevant to vascular remodeling than to the proliferation process. *CYLD* expression is mediated by the transcriptional repressive *SNAIL1* and by promoter regulation binding dependent on ERK signaling. Thus, a decrease in *SNAIL1* expression after treatment with a BRAF inhibitor leads to an increase in *CYLD* mRNA levels and, conversely, after transfection with a mutated form of *BRAF*. Melanoma cells overexpressing *CYLD* showed an anchorage-independent reduction in proliferation and growth demonstrated both in vivo and in vitro using a murine xenograft model. Other studies on in vitro or in vivo melanoma have also concluded that this process is dependent on deubiquitinase activity [86,87]. Conversely, *CYLD* expression has been suggested to be downregulated because of elevated *SNAIL1* expression, resulting in increased levels of *CCND1*(Cyclin-D1) and *CDH2* (N-Cadherin) and enhanced proliferation, migration, and invasion of human melanomas [85]. Additional

investigations have shown that this control of proliferation after *CYLD* depletion is due to the induction of apoptotic markers such as activation of caspase 3 and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). This mechanism involves the suppression of the K63-linked polyubiquitin chains of RIPK1 (receptor-interacting protein kinase 1) by *CYLD*, thereby promoting its degradation, a mechanism that does not appear to be exclusive to melanoma [86]. RIPK1 overexpression is known to promote caspase activation-dependent cell death in many other cell types [89]. Thus, depleting *CYLD* in melanoma cells leads to an increase in RIPK1 associated with an increase in K63-related polyubiquitination of RIPK1. At the molecular level, some mechanisms are maintained, such as activation of NF- $\kappa$ B and JNK/AP-1/ $\beta$ 1-integrin pathways in response to *CYLD* gain and loss of function that could explain the observed melanoma tumorigenesis [87,90]. Recently, *CYLD* has been shown to participate in the tumorigenicity of melanoma cells through its important role in regulating the MAPK pathway by modifying lysine-63 (K63)-linked polyubiquitinated chains for ERK1/2. Forced expression of *CYLD* results in a hypoubiquitinated state of ERK1/ERK2 with reduced activation, but not observable with a catalytically inactive *CYLD* mutant (C601A). This inverse correlation between *CYLD* and ERK1/2 activation is observable by immunohistochemistry on human melanoma samples with a preference for a decreased *CYLD* transcript in highly metastatic melanoma and is associated with poor survival in melanoma patients. This regulation involves an interaction between *CYLD* and ERK1/2 in A375 cells. In addition, melanoma-derived point mutants of *CYLD* (F675S, P698L, and D681G) also lose the ability to remove ubiquitin chains from ERK1. For the first time, the ubiquitination role of ERK1 and ERK2 kinases, involved in the major signaling pathways of fundamental processes such as cell proliferation, survival, migration, and differentiation, has been identified in melanoma. K63 ubiquitination and ERK1/2 activation are closely correlated, as the increase in ERK1/2 proteins conjugated with K63 ubiquitin and their phosphorylation were activated after stimulation with growth factors. Among the 11 lysine residues of ERK1, ERK1 ubiquitination occurs mainly at residues K168 and K302, a site maintained on ERK2 that corresponds to K149 and K283. Expression of ERK1 and ERK2 proteins, which are mutant for these ubiquitination sites, results in decreased ERK activation and renders melanoma cells resistant to the BRAF inhibitor PLX4032 (vemurafenib). Moreover, overexpression of these mutants does not cause any cytotoxic effect in A375 cells as does forced expression of ERK1 or ERK2. Interestingly, ubiquitination of ERK2 at the K302 site, by its structural localization, favors interaction with MEK without modifying activation, which makes ubiquitination of ERK2 a drug strategy of choice for the activation of the MAPK pathway that is mostly reactivatable in BRAF inhibitor resistance mechanisms.

## 2.2. *JAB1/MPN/MOV34* Metalloenzymes (JAMMs)

### 2.2.1. MYSM1

During the transformation of cells into cancer cells, overexpression of the enzyme Myb-like SWIRM and MPN domain 1 (MYSM1, also known as 2A-DUB) allows for an increased expression of genes involved in cell growth and proliferation. This functional involvement in MYSM1 genome regulation is due, in part, to chromatin-associated factors and catalyzes the deubiquitination of histone H2A on lysine residue K119. More recently, it has also been implicated in poor outcomes in melanoma [91]. Of interest, MYSDM1 has been identified as involved in the proper functioning of melanogenesis, as well as in melanoma tumorigenesis [92]. Melanoma clones lacking *MYSM1* have been found to exhibit reduced overall proliferation and viability, including in 3D culture models, with increased apoptosis. In addition to the growth defects, *MYSM1*-deficient mice exhibit “belly and tail patches” (Bst) characteristic of a phenotypic dysfunction of skin development that intensifies with age. These mice show abnormalities in the specification of murine melanocytes, which affects the tyrosinase (Tyr) genes and causes the loss of epidermal stem cells implicated in derived precursor regeneration. These processes are dependent on the P53 pathway and the expression of the cMET transcription factor gene through regulatory *MYSM1*-binding to promoter elements. An *MYSM1* protein quantification showed an incremental increase

during the progressive transformation of normal melanocytes into malignant melanoma cells with a correlation with c-KIT expression in melanoma. *MYSM1* expression is sensitive to chemotherapy-induced DNA damage response (etoposide) with nuclear recruitment to the  $\gamma$ H2AX site in melanoma cells [93]. The therapeutic potential of *MYSM1* in the maintenance of genome integrity could be explored by targeting the ubiquitinated form of its substrate histone H2A (H2Aub), as well as other components of the *MYSM1* interactome, including DNA repair and replication factors, previously implicated in DNA damage responses and melanoma cell survival [92,93].

### 2.2.2. PSMD14

PSMD14 (RPN11 or POH1) is a member of the JAMM domain class of metalloproteases with ATP- and  $Zn^{2+}$ -dependent deubiquitinase activity. This domain, composed of two histidine residues and aspartic acid (His-X-His-X10-Asp), allows binding to a zinc ion to form the catalytic site of PSMD14. This DUB is an intrinsic component of the 26S proteasome that sits directly above the substrate translocation gate in the 19S RP lid [94]. It is a strategically important location for the control of substrate recognition prior to degradation, thus acting as a gatekeeper for ubiquitinated substrate entry and participating in the release of ubiquitin chains after cleavage. Studies have shown the importance of the JAMM motif of PSMD14 in the deubiquitination of substrates by the proteasome [95]. Thus, PSMD14 may have a dual function after the removal of the ubiquitin chains, either facilitating the delivery of the substrate to the proteasome and facilitating its proteolysis, or conversely releasing the protein from the proteasome and preventing its degradation. PSMD14 exerts both a proteasome-dependent deubiquitinase activity via cleavage of K48-linked ubiquitin chains for proteasomal processing and degradation, and a non-proteasomal activity by targeting K63-linked ubiquitin chains [96–98]. As suspected, due to its key role in proteasomal integrity and activity, PSMD14 functional alteration leads to cell viability defects in all species and has recently been studied in melanoma. After a screening of the DUB siRNA library, depletion of *PSMD14* was found to be the main process in both the suppression of growth by controlling SMAD3 stabilization and activation and the suppression of metastatic capacity by affecting the TGF $\beta$  pathway and the transcription factor SLUG [99]. In addition to melanoma cellular proliferation, these findings suggest a role of PSMD14 within the EMT process, as also observed in breast and esophageal cancers [100,101]. Hence, PSMD14 activity or expression may mediate the EMT phenotype that is associated with tumor progression, metastasis, and drug resistance [102–104]. Recently, capzimine has been developed as a selective inhibitor of PSMD14. Capzimine induces cell death, is associated with DNA damage, and blocks proliferation in 60 cancer cell lines (NCI panel), including melanoma cell lines [105]. At this point, PSMD14 appears to be a promising new therapeutic target in melanoma. However, further studies are required to better understand the cellular and molecular mechanisms involving PSMD14 in relation to either degradative or non-degradative processes. Regarding the role of PSMD14 in cell survival, additional research should also address the potential of targeting PSMD14 in combination with current anti-MAPK therapies or immune checkpoint blockade therapies.

## 3. Conclusions and Perspectives

Despite recent advances in melanoma treatment, with the use of therapies targeting BRAF oncogenic signaling and anti-PD-1 immunotherapies, treatment failure and disease relapse occur in a majority of melanoma patients with advanced late-stage melanoma, warranting the development of novel therapeutic options. This review article focuses on the role of DUBs and their ubiquitin-modified substrates in the pathogenesis of cutaneous melanoma at the level of tumor initiation, survival/proliferation, and migration/invasion, processes that drive tumor progression. Among the DUBs encoded in the human genome, twelve are experimentally involved in melanoma progression through their alteration and are related to a poor prognosis in melanoma patients. In addition to USP10, USP11, and USP22, which are associated with a more aggressive and invasive phenotype linked

to clinico-pathological parameters, USP9X, USP7, CYLD, and MYSM1 are also implicated in the transformation of melanocytes to melanoma and in the melanoma metastatic processes [66]. These DUBs are involved in a variety of biological processes, including proteasomal and transcriptional programs, DNA damage response, inflammation, and MAPK oncogenic signaling pathways that may lead to therapeutic resistance. In this way, these DUBs could be considered as emerging biomarkers by which to predict metastatic potential and response to treatment. Additional research may address functional relationships between the involvement of deubiquitinase in both genetic alterations that contribute to the molecular classification of melanoma [106] and non-genetic alterations (metabolism and epigenetic changes) implicated in key signaling pathways responsible for melanoma progression and resistance [107,108].

Regarding the role of PSMD14 in cell survival, additional research should also address the potential of targeting PSMD14 in combination with current anti-MAPK therapies or immune checkpoint blockade therapies. Therefore, investigating the effect of compounds targeting these DUBs in combination therapy regimens may pave the way for future therapies for metastatic and resistant melanoma. For example, USP7 has recently gained attention in cancer biology due to its central role in stabilizing the tumor suppressor p53. USP7 activity has been successfully targeted with small-molecule inhibitors FT827 and FT671, which showed cytotoxic effects in *in vitro* and *in vivo* models [47,109]. At present, these pharmacologic inhibitors have not been assessed in clinical trials. A clinical trial testing the USP14 and UCHL5 competitive inhibitor VLX1570 in combination with dexamethasone in patients with multiple myeloma (NCT02372240) was suspended due to high toxicity. In this context, testing lower doses of VLX1570 (or related compounds) in combination with current anti-melanoma therapies may reveal novel therapeutic opportunities. In addition, PSMD14 inhibitors may provide an alternative to current proteasome inhibitors due to a better efficacy on solid tumors, particularly melanoma cells [105]. To date, however, most of the small-molecule DUB inhibitors developed suffer from poor potency and selectivity. Thus, the non-selective quality of some DUBs inhibitors is highlighted by two main barriers: the first barrier that has impeded the development of drugs targeting DUBs is the similarities in catalytic domains among each subclass. This has rendered it difficult to find molecules that show selectivity among related DUBs without having off-target effects. For instance, UCHL5 and USP14, the proteasomal DUBs, share similar active sites, so therapy specific to a single DUB remains to be improved. A second barrier relates to the discovery that many DUBs have several substrates, implicated in several protein complexes, molecular pathways, and cellular identities. Thus, a specific inhibitor might have limitations in its mechanism of action [110]. Hence, understanding the mechanisms by which individual DUBs act is important in initiating any subsequent screening and drug discovery campaign. Efforts are being undertaken through large-scale approaches, including a combined computational and experimental approach that can be used to propose potential new DUB functions and provide useful resources for interested investigators [111].

Owing to their biological activity and their druggability, DUBs represent fascinating targets. As such, great advances have been made by attributing specific functions to DUBs in multiple processes related to melanoma pathology. However, before DUB targeting can have clinical application, a better understanding of their mechanisms of action is needed and future studies should address several key issues, such as the following: What are the substrates of these direct DUBs in melanoma? Are they the same as those in other tissues or cancers? How are these DUBs adjusted at these distinct pathological stages? Are melanoma pathological processes regulated by degradative ubiquitination, non-degradative ubiquitination, or a combination of both? Does environmental diversity, such as metabolic changes [112], circulating growth factor levels, changing physical stresses or different angiogenic or inflammatory zones [113,114], or the mutational context as “pilot” [59] or “transient” mutation, affect the degree of deubiquitination, the expression level of DUBs, and the diversity of the substrates of interest in melanoma? Both the modulation of deubiq-

utinase activity and targeted substrates contribute to this diaphony affecting cellular fate decisions directly relevant to cancer, hinting that the same DUB can be assigned properties of both oncogenes and tumor suppressors depending on the cellular and environmental context [115,116]. Answering these questions should certainly ameliorate the translational potential of targeting DUBs in advanced and refractory melanoma.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.O. and M.D.; supervision, M.O. and M.D.; investigation, M.O. and P.B.; writing—original draft preparation, M.O. and M.D.; writing—review and editing, M.O.; visualization and legends, M.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (PJA20181207742), Société Française de Dermatologie (SFD), and Canceropôle Provence-Alpes-Côte d’Azur (AAP EMERGENCE-2020).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Miller, A.J.; Mihm, M.C., Jr. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 51–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Shain, A.H.; Bastian, B.C. From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 345–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Maxwell, R.; Garzon-Muvdi, T.; Lipson, E.J.; Sharfman, W.H.; Bettegowda, C.; Redmond, K.J.; Kleinberg, L.R.; Ye, X.; Lim, M. BRAF-V600 mutational status affects recurrence patterns of melanoma brain metastasis. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 2716–2727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Achrol, A.S.; Rennert, R.C.; Anders, C.; Soffietti, R.; Ahluwalia, M.S.; Nayak, L.; Peters, S.; Arvold, N.D.; Harsh, G.R.; Steeg, P.S.; et al. Brain metastases. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2019**, *5*, 5. [[CrossRef](#)]
5. Pierard-Franchimont, C.; Hermanns-Le, T.; Delvenne, P.; Pierard, G.E. Dormancy of growth-stunted malignant melanoma: Sustainable and smoldering patterns. *Oncol. Rev.* **2014**, *8*, 252. [[CrossRef](#)]
6. Balch, C.M.; Gershenwald, J.E.; Soong, S.J.; Thompson, J.F.; Atkins, M.B.; Byrd, D.R.; Buzaid, A.C.; Cochran, A.J.; Coit, D.G.; Ding, S.; et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 6199–6206. [[CrossRef](#)]
7. Hodis, E.; Watson, I.R.; Kryukov, G.V.; Arold, S.T.; Imielinski, M.; Theurillat, J.P.; Nickerson, E.; Auclair, D.; Li, L.; Place, C.; et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **2012**, *150*, 251–263. [[CrossRef](#)]
8. McArthur, G.A.; Ribas, A. Targeting oncogenic drivers and the immune system in melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 499–506. [[CrossRef](#)]
9. Stadler, S.; Weina, K.; Gebhardt, C.; Utikal, J. New therapeutic options for advanced non-resectable malignant melanoma. *Adv. Med. Sci.* **2015**, *60*, 83–88. [[CrossRef](#)]
10. Nazarian, R.; Shi, H.; Wang, Q.; Kong, X.; Koya, R.C.; Lee, H.; Chen, Z.; Lee, M.K.; Attar, N.; Sazegar, H.; et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* **2010**, *468*, 973–977. [[CrossRef](#)]
11. Wang, L.; Leite de Oliveira, R.; Huijberts, S.; Bosdriesz, E.; Pencheva, N.; Brunen, D.; Bosma, A.; Song, J.Y.; Zevenhoven, J.; Los-de Vries, G.T.; et al. An Acquired Vulnerability of Drug-Resistant Melanoma with Therapeutic Potential. *Cell* **2018**, *173*, 1413–1425.e14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Poulidakos, P.I.; Persaud, Y.; Janakiraman, M.; Kong, X.; Ng, C.; Moriceau, G.; Shi, H.; Atefi, M.; Titz, B.; Gabay, M.T.; et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* **2011**, *480*, 387–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Moriceau, G.; Hugo, W.; Hong, A.; Shi, H.; Kong, X.; Yu, C.C.; Koya, R.C.; Samatar, A.A.; Khanlou, N.; Braun, J.; et al. Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 240–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Su, Y.; Ko, M.E.; Cheng, H.; Zhu, R.; Xue, M.; Wang, J.; Lee, J.W.; Frankiw, L.; Xu, A.; Wong, S.; et al. Multi-omic single-cell snapshots reveal multiple independent trajectories to drug tolerance in a melanoma cell line. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Torre, E.A.; Arai, E.; Bayatpour, S.; Jiang, C.L.; Beck, L.E.; Emert, B.L.; Shaffer, S.M.; Mellis, I.A.; Fane, M.E.; Alicea, G.M.; et al. Genetic screening for single-cell variability modulators driving therapy resistance. *Nat. Genet.* **2021**, *53*, 76–85. [[CrossRef](#)]
16. Emmons, M.F.; Faiao-Flores, F.; Smalley, K.S.M. The role of phenotypic plasticity in the escape of cancer cells from targeted therapy. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *122*, 1–9. [[CrossRef](#)]
17. Oren, Y.; Tsabar, M.; Cuoco, M.S.; Amir-Zilberstein, L.; Cabanos, H.F.; Hutter, J.C.; Hu, B.; Thakore, P.I.; Tabaka, M.; Fulco, C.P.; et al. Cycling cancer persister cells arise from lineages with distinct programs. *Nature* **2021**, *596*, 576–582. [[CrossRef](#)]
18. Fallahi-Sichani, M.; Becker, V.; Izar, B.; Baker, G.J.; Lin, J.R.; Boswell, S.A.; Shah, P.; Rotem, A.; Garraway, L.A.; Sorger, P.K. Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Mol. Syst. Biol.* **2017**, *13*, 905. [[CrossRef](#)]



19. Hugo, W.; Shi, H.; Sun, L.; Piva, M.; Song, C.; Kong, X.; Moriceau, G.; Hong, A.; Dahlman, K.B.; Johnson, D.B.; et al. Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell* **2015**, *162*, 1271–1285. [[CrossRef](#)]
20. Ohanna, M.; Cerezo, M.; Nottet, N.; Bille, K.; Didier, R.; Beranger, G.; Mograbi, B.; Rocchi, S.; Yvan-Charvet, L.; Ballotti, R.; et al. Pivotal role of NAMPT in the switch of melanoma cells toward an invasive and drug-resistant phenotype. *Genes Dev.* **2018**, *32*, 448–461. [[CrossRef](#)]
21. Ratnikov, B.I.; Scott, D.A.; Osterman, A.L.; Smith, J.W.; Ronai, Z.A. Metabolic rewiring in melanoma. *Oncogene* **2017**, *36*, 147–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Luke, J.J.; Flaherty, K.T.; Ribas, A.; Long, G.V. Targeted agents and immunotherapies: Optimizing outcomes in melanoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 463–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Schadendorf, D.; Hodi, F.S.; Robert, C.; Weber, J.S.; Margolin, K.; Hamid, O.; Patt, D.; Chen, T.T.; Berman, D.M.; Wolchok, J.D. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data from Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1889–1894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Weber, J.S.; D’Angelo, S.P.; Minor, D.; Hodi, F.S.; Gutzmer, R.; Neyns, B.; Hoeller, C.; Khushalani, N.I.; Miller, W.H., Jr.; Lao, C.D.; et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 375–384. [[CrossRef](#)]
25. Wan, M.T.; Ming, M.E. Nivolumab versus ipilimumab in the treatment of advanced melanoma: A critical appraisal: ORIGINAL ARTICLE: Wolchok, J.D.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; et al. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1345–1356. [[CrossRef](#)]
26. Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J.J.; Cowey, C.L.; Lao, C.D.; Schadendorf, D.; Dummer, R.; Smylie, M.; Rutkowski, P.; et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 23–34. [[CrossRef](#)]
27. Fares, C.M.; Van Allen, E.M.; Drake, C.G.; Allison, J.P.; Hu-Lieskovan, S. Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade: Why Does Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Not Work for All Patients? *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2019**, *39*, 147–164. [[CrossRef](#)]
28. Ribas, A.; Wolchok, J.D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **2018**, *359*, 1350–1355. [[CrossRef](#)]
29. Lim, S.; Phillips, J.B.; Madeira da Silva, L.; Zhou, M.; Fodstad, O.; Owen, L.B.; Tan, M. Interplay between Immune Checkpoint Proteins and Cellular Metabolism. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 1245–1249. [[CrossRef](#)]
30. Komander, D.; Rape, M. The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 203–229. [[CrossRef](#)]
31. Hershko, A.; Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 425–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. McClellan, A.J.; Laugesen, S.H.; Ellgaard, L. Cellular functions and molecular mechanisms of non-lysine ubiquitination. *Open Biol.* **2019**, *9*, 190147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hicke, L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 195–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hoeller, D.; Dikic, I. Regulation of ubiquitin receptors by coupled monoubiquitination. *Subcell. Biochem.* **2010**, *54*, 31–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mozuraitiene, J.; Gudleviciene, Z.; Vincerzevskiene, I.; Laurinaviciene, A.; Pamedys, J. Expression levels of FBXW7 and MDM2 E3 ubiquitin ligases and their c-Myc and p53 substrates in patients with dysplastic nevi or melanoma. *Oncol. Lett.* **2021**, *21*, 37. [[CrossRef](#)]
36. Nijman, S.M.; Luna-Vargas, M.P.; Velds, A.; Brummelkamp, T.R.; Dirac, A.M.; Sixma, T.K.; Bernards, R. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **2005**, *123*, 773–786. [[CrossRef](#)]
37. Fraile, J.M.; Quesada, V.; Rodriguez, D.; Freije, J.M.; Lopez-Otin, C. Deubiquitinases in cancer: New functions and therapeutic options. *Oncogene* **2012**, *31*, 2373–2388. [[CrossRef](#)]
38. Ge, Z.; Leighton, J.S.; Wang, Y.; Peng, X.; Chen, Z.; Chen, H.; Sun, Y.; Yao, F.; Li, J.; Zhang, H.; et al. Integrated Genomic Analysis of the Ubiquitin Pathway across Cancer Types. *Cell Rep.* **2018**, *23*, 213–226.e213. [[CrossRef](#)]
39. Guo, W.; Ma, J.; Pei, T.; Zhao, T.; Guo, S.; Yi, X.; Liu, Y.; Wang, S.; Zhu, G.; Jian, Z.; et al. Up-regulated deubiquitinase USP4 plays an oncogenic role in melanoma. *J. Cell Mol. Med.* **2018**, *22*, 2944–2954. [[CrossRef](#)]
40. Zhang, X.; Berger, F.G.; Yang, J.; Lu, X. USP4 inhibits p53 through deubiquitinating and stabilizing ARF-BP1. *EMBO J.* **2011**, *30*, 2177–2189. [[CrossRef](#)]
41. Liu, H.; Zhang, H.; Wang, X.; Tian, Q.; Hu, Z.; Peng, C.; Jiang, P.; Wang, T.; Guo, W.; Chen, Y.; et al. The Deubiquitylating Enzyme USP4 Cooperates with CtIP in DNA Double-Strand Break End Resection. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 93–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zhang, L.; Zhou, F.; Drabsch, Y.; Gao, R.; Snaar-Jagalska, B.E.; Mickanin, C.; Huang, H.; Sheppard, K.A.; Porter, J.A.; Lu, C.X.; et al. USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF-beta type I receptor. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 717–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Potu, H.; Peterson, L.F.; Pal, A.; Verhaegen, M.; Cao, J.; Talpaz, M.; Donato, N.J. Usp5 links suppression of p53 and FAS levels in melanoma to the BRAF pathway. *Oncotarget* **2014**, *5*, 5559–5569. [[CrossRef](#)]
44. Meng, J.; Ai, X.; Lei, Y.; Zhong, W.; Qian, B.; Qiao, K.; Wang, X.; Zhou, B.; Wang, H.; Huai, L.; et al. USP5 promotes epithelial-mesenchymal transition by stabilizing SLUG in hepatocellular carcinoma. *Theranostics* **2019**, *9*, 573–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kapuria, V.; Peterson, L.F.; Fang, D.; Bornmann, W.G.; Talpaz, M.; Donato, N.J. Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9265–9276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Pal, A.; Dziubinski, M.; Di Magliano, M.P.; Simeone, D.M.; Owens, S.; Thomas, D.; Peterson, L.; Potu, H.; Talpaz, M.; Donato, N.J. Usp9x Promotes Survival in Human Pancreatic Cancer and Its Inhibition Suppresses Pancreatic Ductal Adenocarcinoma In Vivo Tumor Growth. *Neoplasia* **2018**, *20*, 152–164. [[CrossRef](#)]
47. Li, M.; Chen, D.; Shiloh, A.; Luo, J.; Nikolaev, A.Y.; Qin, J.; Gu, W. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* **2002**, *416*, 648–653. [[CrossRef](#)]
48. Rai, K.; Akdemir, K.C.; Kwong, L.N.; Fiziev, P.; Wu, C.J.; Keung, E.Z.; Sharma, S.; Samant, N.S.; Williams, M.; Axelrad, J.B.; et al. Dual Roles of RNF2 in Melanoma Progression. *Cancer Discov.* **2015**, *5*, 1314–1327. [[CrossRef](#)]
49. Su, D.; Wang, W.; Hou, Y.; Wang, L.; Yi, X.; Cao, C.; Wang, Y.; Gao, H.; Wang, Y.; Yang, C.; et al. Bimodal regulation of the PRC2 complex by USP7 underlies tumorigenesis. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 4421–4440. [[CrossRef](#)]
50. Gao, L.; Zhu, D.; Wang, Q.; Bao, Z.; Yin, S.; Qiang, H.; Wieland, H.; Zhang, J.; Teichmann, A.; Jia, J. Proteome Analysis of USP7 Substrates Revealed Its Role in Melanoma through PI3K/Akt/FOXO and AMPK Pathways. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 650165. [[CrossRef](#)]
51. Xiang, M.; Liang, L.; Kuang, X.; Xie, Z.; Liu, J.; Zhao, S.; Su, J.; Chen, X.; Liu, H. Pharmacological inhibition of USP7 suppresses growth and metastasis of melanoma cells in vitro and in vivo. *J. Cell Mol. Med.* **2021**, *25*, 9228–9240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Potu, H.; Kandarpa, M.; Peterson, L.F.; Durham, A.; Donato, N.J.; Talpaz, M. Downregulation of SOX2 by inhibition of Usp9X induces apoptosis in melanoma. *Oncotarget* **2021**, *12*, 160–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Potu, H.; Peterson, L.F.; Kandarpa, M.; Pal, A.; Sun, H.; Durham, A.; Harms, P.W.; Hollenhorst, P.C.; Eskiocak, U.; Talpaz, M.; et al. Usp9x regulates Ets-1 ubiquitination and stability to control NRAS expression and tumorigenicity in melanoma. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Chen, X.; Zhang, X.; Cai, H.; Yang, W.; Lei, H.; Xu, H.; Wang, W.; Zhu, Q.; Kang, J.; Yin, T.; et al. Targeting USP9x/SOX2 axis contributes to the anti-osteosarcoma effect of neogambogic acid. *Cancer Lett.* **2020**, *469*, 277–286. [[CrossRef](#)]
55. Zhao, X.; Fiske, B.; Kawakami, A.; Li, J.; Fisher, D.E. Regulation of MITF stability by the USP13 deubiquitinase. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Marshall, R.S.; Vierstra, R.D. Dynamic Regulation of the 26S Proteasome: From Synthesis to Degradation. *Front. Mol. Biosci.* **2019**, *6*, 40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Koulich, E.; Li, X.; DeMartino, G.N. Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 1072–1082. [[CrossRef](#)]
58. Kim, E.; Park, S.; Lee, J.H.; Mun, J.Y.; Choi, W.H.; Yun, Y.; Lee, J.; Kim, J.H.; Kang, M.J.; Lee, M.J. Dual Function of USP14 Deubiquitinase in Cellular Proteasomal Activity and Autophagic Flux. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 732–743. [[CrossRef](#)]
59. Didier, R.; Mallavialle, A.; Ben Jouira, R.; Domdom, M.A.; Tichet, M.; Auberger, P.; Luciano, F.; Ohanna, M.; Tartare-Deckert, S.; Deckert, M. Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 1416–1429. [[CrossRef](#)]
60. Chen, X.; Wu, Q.; Tan, L.; Porter, D.; Jager, M.J.; Emery, C.; Bastian, B.C. Combined PKC and MEK inhibition in uveal melanoma with GNAQ and GNA11 mutations. *Oncogene* **2014**, *33*, 4724–4734. [[CrossRef](#)]
61. Zou, Q.; Jin, J.; Hu, H.; Li, H.S.; Romano, S.; Xiao, Y.; Nakaya, M.; Zhou, X.; Cheng, X.; Yang, P.; et al. USP15 stabilizes MDM2 to mediate cancer-cell survival and inhibit antitumor T cell responses. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 562–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Chen, L.L.; Smith, M.D.; Lv, L.; Nakagawa, T.; Li, Z.; Sun, S.C.; Brown, N.G.; Xiong, Y.; Xu, Y.P. USP15 suppresses tumor immunity via deubiquitylation and inactivation of TET2. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eabc9730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Eichhorn, P.J.; Rodon, L.; Gonzalez-Junca, A.; Dirac, A.; Gili, M.; Martinez-Saez, E.; Aura, C.; Barba, I.; Peg, V.; Prat, A.; et al. USP15 stabilizes TGF-beta receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF-beta signaling in glioblastoma. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 429–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Schweitzer, K.; Bozko, P.M.; Dubiel, W.; Naumann, M. CSN controls NF-kappaB by deubiquitylation of IkappaBalpha. *EMBO J.* **2007**, *26*, 1532–1541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Pauli, E.K.; Chan, Y.K.; Davis, M.E.; Gableske, S.; Wang, M.K.; Feister, K.F.; Gack, M.U. The ubiquitin-specific protease USP15 promotes RIG-I-mediated antiviral signaling by deubiquitylating TRIM25. *Sci. Signal.* **2014**, *7*, ra3. [[CrossRef](#)]
66. Luise, C.; Capra, M.; Donzelli, M.; Mazzarol, G.; Jodice, M.G.; Nuciforo, P.; Viale, G.; Di Fiore, P.P.; Confalonieri, S. An atlas of altered expression of deubiquitinating enzymes in human cancer. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e15891. [[CrossRef](#)]
67. Wei, Y.; Jiang, Z.; Lu, J. USP22 promotes melanoma and BRAF inhibitor resistance via YAP stabilization. *Oncol. Lett.* **2021**, *21*, 394. [[CrossRef](#)]
68. Li, M.; Xu, Y.; Liang, J.; Lin, H.; Qi, X.; Li, F.; Han, P.; Gao, Y.; Yang, X. USP22 deficiency in melanoma mediates resistance to T cells through IFNgamma-JAK1-STAT1 signal axis. *Mol. Ther.* **2021**, *29*, 2108–2120. [[CrossRef](#)]
69. Wang, Y.; Sun, Q.; Mu, N.; Sun, X.; Wang, Y.; Fan, S.; Su, L.; Liu, X. The deubiquitinase USP22 regulates PD-L1 degradation in human cancer cells. *Cell Commun. Signal.* **2020**, *18*, 112. [[CrossRef](#)]
70. Huang, X.; Zhang, Q.; Lou, Y.; Wang, J.; Zhao, X.; Wang, L.; Zhang, X.; Li, S.; Zhao, Y.; Chen, Q.; et al. USP22 Deubiquitinates CD274 to Suppress Anticancer Immunity. *Cancer Immunol. Res.* **2019**, *7*, 1580–1590. [[CrossRef](#)]
71. Jeusset, L.M.; McManus, K.J. Ubiquitin Specific Peptidase 22 Regulates Histone H2B Mono-Ubiquitination and Exhibits Both Oncogenic and Tumor Suppressor Roles in Cancer. *Cancers* **2017**, *9*, 167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Atanassov, B.S.; Evrard, Y.A.; Multani, A.S.; Zhang, Z.; Tora, L.; Devys, D.; Chang, S.; Dent, S.Y. Gcn5 and SAGA regulate shelterin protein turnover and telomere maintenance. *Mol. Cell* **2009**, *35*, 352–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

73. Xiao, H.; Tian, Y.; Yang, Y.; Hu, F.; Xie, X.; Mei, J.; Ding, F. USP22 acts as an oncogene by regulating the stability of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *460*, 703–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Lin, Z.; Tan, C.; Qiu, Q.; Kong, S.; Yang, H.; Zhao, F.; Liu, Z.; Li, J.; Kong, Q.; Gao, B.; et al. Ubiquitin-specific protease 22 is a deubiquitinase of CCNB1. *Cell Discov.* **2015**, *1*, 15028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Ling, S.; Li, J.; Shan, Q.; Dai, H.; Lu, D.; Wen, X.; Song, P.; Xie, H.; Zhou, L.; Liu, J.; et al. USP22 mediates the multidrug resistance of hepatocellular carcinoma via the SIRT1/AKT/MRP1 signaling pathway. *Mol. Oncol.* **2017**, *11*, 682–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Ohanna, M.; Bonet, C.; Bille, K.; Allegra, M.; Davidson, I.; Bahadoran, P.; Lacour, J.P.; Ballotti, R.; Bertolotto, C. SIRT1 promotes proliferation and inhibits the senescence-like phenotype in human melanoma cells. *Oncotarget* **2014**, *5*, 2085–2095. [[CrossRef](#)]
77. Wang, Z.; Song, Q.; Xue, J.; Zhao, Y.; Qin, S. Ubiquitin-specific protease 28 is overexpressed in human glioblastomas and contributes to glioma tumorigenicity by regulating MYC expression. *Exp. Biol. Med.* **2016**, *241*, 255–264. [[CrossRef](#)]
78. Li, Z.H.; Yu, Y.; Du, C.; Fu, H.; Wang, J.; Tian, Y. RNA interference-mediated USP22 gene silencing promotes human brain glioma apoptosis and induces cell cycle arrest. *Oncol. Lett.* **2013**, *5*, 1290–1294. [[CrossRef](#)]
79. Popov, N.; Wanzel, M.; Madiredjo, M.; Zhang, D.; Beijersbergen, R.; Bernards, R.; Moll, R.; Elledge, S.J.; Eilers, M. The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 765–774. [[CrossRef](#)]
80. Saei, A.; Palafox, M.; Benoukraf, T.; Kumari, N.; Jaynes, P.W.; Iyengar, P.V.; Munoz-Couselo, E.; Nuciforo, P.; Cortes, J.; Notzel, C.; et al. Loss of USP28-mediated BRAF degradation drives resistance to RAF cancer therapies. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 1913–1928. [[CrossRef](#)]
81. Zhang, D.; Zaugg, K.; Mak, T.W.; Elledge, S.J. A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. *Cell* **2006**, *126*, 529–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Richter, K.; Paakkola, T.; Mennerich, D.; Kubaichuk, K.; Konzack, A.; Ali-Kippari, H.; Kozlova, N.; Koivunen, P.; Haapasaari, K.M.; Jukkola-Vuorinen, A.; et al. USP28 Deficiency Promotes Breast and Liver Carcinogenesis as well as Tumor Angiogenesis in a HIF-independent Manner. *Mol. Cancer Res.* **2018**, *16*, 1000–1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Chipumuro, E.; Henriksen, M.A. The ubiquitin hydrolase USP22 contributes to 3'-end processing of JAK-STAT-inducible genes. *FASEB J.* **2012**, *26*, 842–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Meitinger, F.; Anzola, J.V.; Kaulich, M.; Richardson, A.; Stender, J.D.; Benner, C.; Glass, C.K.; Dowdy, S.F.; Desai, A.; Shiau, A.K.; et al. 53BP1 and USP28 mediate p53 activation and G1 arrest after centrosome loss or extended mitotic duration. *J. Cell Biol.* **2016**, *214*, 155–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Massoumi, R.; Kuphal, S.; Hellerbrand, C.; Haas, B.; Wild, P.; Spruss, T.; Pfeifer, A.; Fassler, R.; Bosserhoff, A.K. Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 221–232. [[CrossRef](#)]
86. La, T.; Jin, L.; Liu, X.Y.; Song, Z.H.; Farrelly, M.; Feng, Y.C.; Yan, X.G.; Zhang, Y.Y.; Thorne, R.F.; Zhang, X.D.; et al. Cylindromatosis Is Required for Survival of a Subset of Melanoma Cells. *Oncol. Res.* **2020**, *28*, 385–398. [[CrossRef](#)]
87. Ke, H.; Augustine, C.K.; Gandham, V.D.; Jin, J.Y.; Tyler, D.S.; Akiyama, S.K.; Hall, R.P.; Zhang, J.Y. CYLD inhibits melanoma growth and progression through suppression of the JNK/AP-1 and beta1-integrin signaling pathways. *J. Investig. Dermatol.* **2013**, *133*, 221–229. [[CrossRef](#)]
88. de Jel, M.M.; Schott, M.; Lamm, S.; Neuhuber, W.; Kuphal, S.; Bosserhoff, A.K. Loss of CYLD accelerates melanoma development and progression in the Tg(Grm1) melanoma mouse model. *Oncogenesis* **2019**, *8*, 56. [[CrossRef](#)]
89. Liu, X.Y.; Lai, F.; Yan, X.G.; Jiang, C.C.; Guo, S.T.; Wang, C.Y.; Croft, A.; Tseng, H.Y.; Wilmott, J.S.; Scolyer, R.A.; et al. RIP1 Kinase Is an Oncogenic Driver in Melanoma. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 1736–1748. [[CrossRef](#)]
90. Zhu, G.; Herlyn, M.; Yang, X. TRIM15 and CYLD regulate ERK activation via lysine-63-linked polyubiquitination. *Nat. Cell Biol.* **2021**, *23*, 978–991. [[CrossRef](#)]
91. Zhu, P.; Zhou, W.; Wang, J.; Puc, J.; Ohgi, K.A.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G. A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 609–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Wilms, C.; Kroeger, C.M.; Hainzl, A.V.; Banik, I.; Bruno, C.; Krikki, I.; Farsam, V.; Wlaschek, M.; Gatzka, M.V. MYSM1/2A-DUB is an epigenetic regulator in human melanoma and contributes to tumor cell growth. *Oncotarget* **2017**, *8*, 67287–67299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Kroeger, C.; Roesler, R.; Wiese, S.; Hainzl, A.; Gatzka, M.V. Interaction of Deubiquitinase 2A-DUB/MYSM1 with DNA Repair and Replication Factors. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3762. [[CrossRef](#)]
94. Lander, G.C.; Estrin, E.; Matyskiela, M.E.; Bashore, C.; Nogales, E.; Martin, A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* **2012**, *482*, 186–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Verma, R.; Aravind, L.; Oania, R.; McDonald, W.H.; Yates, J.R., 3rd; Koonin, E.V.; Deshaies, R.J. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **2002**, *298*, 611–615. [[CrossRef](#)]
96. Butler, L.R.; Densham, R.M.; Jia, J.; Garvin, A.J.; Stone, H.R.; Shah, V.; Weekes, D.; Festy, F.; Beesley, J.; Morris, J.R. The proteasomal de-ubiquitinating enzyme POH1 promotes the double-strand DNA break response. *EMBO J.* **2012**, *31*, 3918–3934. [[CrossRef](#)]
97. Yao, T.; Cohen, R.E. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **2002**, *419*, 403–407. [[CrossRef](#)]
98. Ben-Aroya, S.; Agmon, N.; Yuen, K.; Kwok, T.; McManus, K.; Kupiec, M.; Hieter, P. Proteasome nuclear activity affects chromosome stability by controlling the turnover of Mms22, a protein important for DNA repair. *PLoS Genet.* **2010**, *6*, e1000852. [[CrossRef](#)]
99. Yokoyama, S.; Iwakami, Y.; Hang, Z.; Kin, R.; Zhou, Y.; Yasuta, Y.; Takahashi, A.; Hayakawa, Y.; Sakurai, H. Targeting PSMD14 inhibits melanoma growth through SMAD3 stabilization. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 19214. [[CrossRef](#)]

100. Luo, G.; Hu, N.; Xia, X.; Zhou, J.; Ye, C. RPN11 deubiquitinase promotes proliferation and migration of breast cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 331–338. [[CrossRef](#)]
101. Jing, C.; Duan, Y.; Zhou, M.; Yue, K.; Zhuo, S.; Li, X.; Liu, D.; Ye, B.; Lai, Q.; Li, L.; et al. Blockade of deubiquitinating enzyme PSMD14 overcomes chemoresistance in head and neck squamous cell carcinoma by antagonizing E2F1/Akt/SOX2-mediated stemness. *Theranostics* **2021**, *11*, 2655–2669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Fenouille, N.; Tichet, M.; Dufies, M.; Pottier, A.; Mogha, A.; Soo, J.K.; Rocchi, S.; Mallavialle, A.; Galibert, M.D.; Khammari, A.; et al. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Diazi, S.; Baeri, A.; Fassy, J.; Lecacheur, M.; Marin-Bejar, O.; Girard, C.A.; Lefevre, L.; Lacoux, C.; Irondelle, M.; Mounier, C.; et al. Blockade of the pro-fibrotic reaction mediated by the miR-143/-145 cluster enhances the responses to targeted therapy in melanoma. *EMBO Mol. Med.* **2022**, *14*, e15295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Pedri, D.; Karras, P.; Landeloos, E.; Marine, J.C.; Rambow, F. Epithelial-to-mesenchymal-like transition events in melanoma. *FEBS J.* **2022**, *289*, 1352–1368. [[CrossRef](#)]
105. Li, J.; Yakushi, T.; Parlati, F.; Mackinnon, A.L.; Perez, C.; Ma, Y.; Carter, K.P.; Colayco, S.; Magnuson, G.; Brown, B.; et al. Capzimin is a potent and specific inhibitor of proteasome isopeptidase Rpn11. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 486–493. [[CrossRef](#)]
106. Rabbie, R.; Ferguson, P.; Molina-Aguilar, C.; Adams, D.J.; Robles-Espinoza, C.D. Melanoma subtypes: Genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *J. Pathol.* **2019**, *247*, 539–551. [[CrossRef](#)]
107. Alkaraki, A.; McArthur, G.A.; Sheppard, K.E.; Smith, L.K. Metabolic Plasticity in Melanoma Progression and Response to Oncogene Targeted Therapies. *Cancers* **2021**, *13*, 5810. [[CrossRef](#)]
108. Wajapeyee, N.; Gupta, R. Epigenetic Alterations and Mechanisms That Drive Resistance to Targeted Cancer Therapies. *Cancer Res.* **2021**, *81*, 5589–5595. [[CrossRef](#)]
109. Turnbull, A.P.; Ioannidis, S.; Krajewski, W.W.; Pinto-Fernandez, A.; Heride, C.; Martin, A.C.L.; Tonkin, L.M.; Townsend, E.C.; Buker, S.M.; Lancia, D.R.; et al. Molecular basis of USP7 inhibition by selective small-molecule inhibitors. *Nature* **2017**, *550*, 481–486. [[CrossRef](#)]
110. Mevissen, T.E.T.; Komander, D. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 159–192. [[CrossRef](#)]
111. Doherty, L.M.; Mills, C.E.; Boswell, S.A.; Liu, X.; Hoyt, C.T.; Gyori, B.; Buhrlage, S.J.; Sorger, P.K. Integrating multi-omics data reveals function and therapeutic potential of deubiquitinating enzymes. *eLife* **2022**, *11*, e72879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Krassikova, L.; Zhang, B.; Nagarajan, D.; Queiroz, A.L.; Kacal, M.; Samakidis, E.; Vakifahmetoglu-Norberg, H.; Norberg, E. The deubiquitinase JOSD2 is a positive regulator of glucose metabolism. *Cell Death Differ.* **2021**, *28*, 1091–1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Cockram, P.E.; Kist, M.; Prakash, S.; Chen, S.H.; Wertz, I.E.; Vucic, D. Ubiquitination in the regulation of inflammatory cell death and cancer. *Cell Death Differ.* **2021**, *28*, 591–605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Iyengar, P.V. Regulation of Ubiquitin Enzymes in the TGF-beta Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 877. [[CrossRef](#)]
115. Gregoire-Mitha, S.; Gray, D.A. What deubiquitinating enzymes, oncogenes, and tumor suppressors actually do: Are current assumptions supported by patient outcomes? *Bioessays* **2021**, *43*, e2000269. [[CrossRef](#)]
116. Datta, N.; Chakraborty, S.; Basu, M.; Ghosh, M.K. Tumor Suppressors Having Oncogenic Functions: The Double Agents. *Cells* **2020**, *10*, 46. [[CrossRef](#)]



# Deubiquitinase Inhibitors Impair Leukemic Cell Migration Through Cofilin Oxidation and Alteration of Actin Reorganization

Frédéric Larbret<sup>1,2\*</sup>, Pierric Biber<sup>1,2</sup>, Nicholas Dubois<sup>1</sup>, Stoyan Ivanov<sup>1</sup>, Laurence Lafanechere<sup>3</sup>, Sophie Tartare-Deckert<sup>1,2</sup> and Marcel Deckert<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France, <sup>2</sup>Team MicroCan, Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, Nice, France, <sup>3</sup>Université Grenoble Alpes, INSERM, Institut pour l'Avancée des Biosciences, La Tronche, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Elias Georges,  
McGill University, Canada

### Reviewed by:

Jeremy S. Logue,  
Albany Medical College, United States  
Shoichiro Ono,  
Emory University, United States  
James R Bamberg,  
Colorado State University,  
United States

### \*Correspondence:

Frédéric Larbret  
larbret@unice.fr  
Marcel Deckert  
deckert@unice.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Pharmacology of Anti-Cancer Drugs,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

**Received:** 16 September 2021

**Accepted:** 14 December 2021

**Published:** 07 January 2022

### Citation:

Larbret F, Biber P, Dubois N, Ivanov S, Lafanechere L, Tartare-Deckert S and Deckert M (2022) Deubiquitinase Inhibitors Impair Leukemic Cell Migration Through Cofilin Oxidation and Alteration of Actin Reorganization. *Front. Pharmacol.* 12:778216. doi: 10.3389/fphar.2021.778216

Actin networks are dynamically regulated through constant depolymerization and polymerization cycles. Although the fundamental mechanisms that govern these processes have been identified, the nature and role of post-translational modifications (PTMs) of actin and actin regulatory proteins are not completely understood. Here, we employed Actin CytoFRET, a method that we developed for real time detection of fluorescence resonance energy transfer (FRET) signals generated by actin dynamics, to screen a small library of PTM-interfering compounds on a biosensor leukemic T cell line. This strategy led to the identification of small molecule inhibitors of deubiquitinating enzymes (DUBs) as potent inducers of actin polymerization and blockers of chemotactic cell migration. The examination of the underlying mechanism further revealed that the actin depolymerizing protein cofilin represents a major effector of DUB inhibitor (DUBi)-induced actin reorganization. We found that DUB blockade results in the accumulation of polyubiquitinated proteins and ROS production, associated with cofilin oxidation and dephosphorylation on serine 3, which provokes uncontrolled actin polymerization impairing cell migration. Together, our study highlights DUBs as novel regulators of actin dynamics through ROS-dependent cofilin modulation, and shows that DUBi represent attractive novel tools to impede leukemic cell migration.

**Keywords:** actin cytoskeleton, FRET, DUB, cofilin, leukemic cell migration

## INTRODUCTION

Dynamic remodeling of actin structures allow cells to respond to extracellular stimuli and mechanical cues and occur during major cell biological processes, including cytokinesis, endocytosis, adhesion and migration (Pollard and Cooper, 2009; Tojkander et al., 2012). Consequently, actin cytoskeleton dysfunction has been implicated in many pathological conditions including immunological diseases and cancer. Actin, one of the most abundant proteins found in all eukaryotic cells, exists under two different forms: a monomeric globular form (G-actin) and a polymeric filamentous form (F-actin). Spontaneous actin polymerization follows the hydrolysis of a bound adenosine triphosphate (ATP) molecule. However, an equilibrium between G-actin and F-actin is maintained through continuous actin filaments treadmilling, in which monomers dissociate from the pointed end and polymerize at the barbed end (Suarez and

Kovar, 2016). The shaping of complex and dynamic actin filament networks is controlled by actin regulatory proteins displaying specialized functions such as actin monomers sequestration, filament nucleation, elongation and branching, as well as filament capping, severing and crosslinking (Paavilainen et al., 2004; Rotty et al., 2013; Pollard, 2016). In addition, small GTPases of the Rho superfamily provides a link between extracellular environment and the actin machinery (Sit and Manser, 2011).

Post-translational modifications (PTMs) of actin emerge as major regulatory events of actin dynamics (Terman and Kashina, 2013). Specific covalent modifications by a vast array of enzymes include acetylation, methylation, ADP-ribosylation, arginylation, phosphorylation and ubiquitination. These PTMs, as well as other redox-related modifications such as oxidation, differentially alter actin cytoskeleton remodeling in both physiological and pathological situations (Schaefer et al., 2012; Terman and Kashina, 2013). Adding to the complexity, actin regulatory proteins are also subjected to PTM. For example, tyrosine phosphorylation of WASp is linked to signal-enhanced actin polymerization (Cory et al., 2003; Badour et al., 2004). Actin binding of the actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin family is modulated by PTMs, including phosphorylation on serine 3 (Bernstein and Bamburg, 2010; Kanellos and Frame, 2016) and oxidation (Klemke et al., 2008; Cameron et al., 2015). Recent studies have shown the importance of ubiquitination/deubiquitination of ABPs such as WASH and Coronin 7 for the regulation of actin assembly and protein trafficking (Hao et al., 2013; Yuan et al., 2014). Also, the activity and expression of RhoA are regulated through phosphorylation and ubiquitination (Lang et al., 1996; Wang et al., 2003). However, the role and interplay between the multiple PTMs of actin and actin regulatory proteins are still largely misunderstood.

In this study, we examine the effect of pharmacological modulators of PTMs on actin remodeling by using Actin CytoFRET, a method that we developed for the detection of FRET signals generated by actin polymerization/depolymerization (Larbret et al., 2013). The major advantage of this approach is that it makes it possible to measure not only the degree of polymerized actin (F-actin), comparable to phalloidin labeling, but also the actin nucleation allowing to better evaluate the steady-state dynamics of actin filaments. The screening of a small library of PTM-interfering chemical compounds on the Actin CytoFRET leukemic biosensor T cell line Jurkat identified multiple inhibitors of deubiquitinating enzymes (DUBs) as potent inducers of actin reorganization. DUBs represent a large group of ubiquitin-specific proteases that are involved in essential processes, such as ubiquitin recycling, protein trafficking and activity and protein degradation by the ubiquitin-proteasome system (UPS) (Komander et al., 2009; D'Arcy et al., 2015). Several DUB inhibitors (DUBi) were found to trigger a rapid and dose-dependent actin reorganization, and to impair leukemic cell chemotactic migration. Mechanistically, we found that actin reorganization triggered by DUB blockade involved the dephosphorylation and oxidation of the actin remodeling

protein cofilin. These findings provide evidence that DUB inhibitors induce a strong oxidative burst impacting actin cytoskeleton reorganization and cell migration, thereby suggesting their use as potential anti-leukemic therapies.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells, Culture, Antibodies and Reagents

The Jurkat leukemic T cell line (clone E6.1) was from American Type Culture Collection (ATCC, catalog number TIB-152). Jurkat cells were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone), and DMEM, 10% fetal bovine serum, respectively). Control (CT) and Actin CytoFRET (ACT) reporter cell lines were generated as previously described (Larbret et al., 2013). Antibodies against  $\beta$ -actin (C4) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, cofilin (D3F9), ERK2 (9108), profilin (C56B8), ubiquitin (P4D1), and phospho-ADF/cofilin (3312) were purchased from Cell Signaling Technology. Anti-gelsolin (ab11081) was from Abcam. Anti-thymosin  $\beta$ 4 (AF6796) and recombinant human CXCL12/SDF-1 were from R&D Systems. WP1130, b-AP15 and PR-619 were from Merck. VLX1570 and AMD3100 were from Selleckchem. All other chemicals were from Merck. Plasmid DNA were transfected with Lipofectamine 2000 (Thermo Fischer Scientific).

### Plasmid Constructions

Plasmid constructions, cloning, and DNA sequencing were carried out according to standard protocols. For single color (EGFP or mOrange) and EGFP or mOrange fused to actin, cloning strategies were described previously (Larbret et al., 2013).

### Cofilin shRNA Lentiviral Particles

Cofilin-1 shRNA and control shRNA lentiviral particles were purchased from Santa Cruz Biotechnology. To generate cofilin-1 knockdown cells,  $1 \times 10^5$  Jurkat cells were infected with 10  $\mu$ l of lentiviral particles encoding either non targeting control shRNA sequence or cofilin shRNA for 12 h, washed and cultured for 48 h. After a second infection cycle, cells were cultured with puromycin to select infected cells. Transduction and shRNA efficiency was assessed by immunoblotting with antibody against cofilin.

### FRET Measurement and Actin CytoFRET Screening Protocol

Actin FRET signals were recorded on actin biosensor cell line (FRET-ACT) using a ratiometric method (Larbret et al., 2013). Briefly, untreated or treated FRET-CT and FRET-ACT cell lines were analyzed on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) by using 488 nm donor excitation wavelength. Donor fluorescence was collected in the EGFP channel with a 530/30 nm filter, while mOrange acceptor signal was measured with a 610/15 nm filter. FRET ratio was determined as the ratio between acceptor (mOrange) and donor (EGFP) fluorescence intensity under the donor excitation wavelength. The FRET ratio that is determined in untreated or DMSO-treated FRET-ACT

cells reflects the degree of basal actin polymerization. For each sample, a minimum of 5,000 cells that fell within the adjusted morphology gate was analyzed. For real time flow cytometry analysis, measurements were performed using an ARIA II cytometer (BD Biosciences) equipped with a heating sample injection chamber that maintains samples at 37°C during the analysis.

For treatment with chemical compounds, FRET-CT and FRET-ACT cell lines were seeded in 96 well plates at a density of  $1 \times 10^5$  cell/ml the day before FACS analysis. Cells were then incubated with each compound or DMSO for 1 h at 37°C before flow cytometry analysis. A FACSCanto II flow cytometer equipped with a carousel loader was used. Each compound was screened at three different concentrations, with DMSO treatment as control. To calculate actin FRET efficiency in the presence of a compound, we used the following formula: Compound FRET efficiency (%) =  $[1 - (\text{DMSO FRET ratio} / \text{Compound FRET ratio})] \times 100$ .

## ROS Staining

CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Thermo Fisher Scientific) was dissolved in DMSO and stored as 100 mM at -20°C. Cells were incubated with 10 μM CM-H<sub>2</sub>DCFDA for 30 min at 37°C. Then, cells were washed twice with PBS and exposed to pharmacological treatments during 1 h at 37°C. CM-H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence was detected by flow cytometry with an excitation wavelength of 488 nm and emission wavelength of 535 nm.

## Apoptosis Analysis

Cell death was evaluated using an Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences) as described previously (Didier et al., 2018). Briefly,  $10^5$  cells were washed twice with PBS, stained with Annexin-V and propidium iodide in binding buffer for 15 min at room temperature. Cells were then analyzed by flow cytometry using a FACSCanto II and the DIVA8 software (BD Biosciences).

## Aggresome Staining

Proteostat aggresome detection kit (Enzo Life Sciences) was used for aggresome staining. Briefly, Jurkat cells were washed with Ice cold PBS, then fixed with 3.7% formaldehyde in PBS, and permeabilized with 0.5% Triton in PBS, 1% bovine serum albumin for 20 min at room temperature. Cells were washed and labeled with 200 μl of proteostat red dye and incubated for 30 min at room temperature. Analysis was performed by flow cytometry.

## Cell Lysis and Immunoblotting

Cells were lysed in ice-cold RIPA lysis buffer: 1% NP-40 in 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostics) for 30 min on ice. Then, samples were centrifuged at 7,500 g for 10 min at 4°C. Supernatant (soluble fraction) was separate from pellet (insoluble fraction). Oxyblot detection kit (Abcam) was used for the detection of cofilin oxidation. The procedure for derivatization of protein

carbonyls with DNPH and subsequent detection using the Oxyblot kit basically follow the procedure as outlined in the kit brochures. Briefly, 20 μg protein was derivatized with DNPH and separated on a 10% pre-cast gel (BioRad, United States) using standard SDS polyacrylamide electrophoresis. Following separation, the gels were transferred to a PVDF membrane and probed with the primary polyclonal anti-DNP and secondary antibodies anti-rabbit IgG provided in the kit and developed using enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

## GFP-Trap Immunoprecipitation

Jurkat T cells were electroporated with GFP-cofilin expression vector (Addgene Plasmid #50859). 48 h post transfection cells were lysed in ice cold RIPA lysis buffer supplemented with 10 mM DTT. 2 ml of clarified lysate was incubated with 50 μl of GFP-Trap<sup>®</sup> (Chromotek) for 1 h at 4°C, and washed three times in IP buffer for 5 min each. The washed GFP-Trap<sup>®</sup> (Chromotek) resin was incubated for 2 min in IP buffer adjusted to pH 2.0 in order to acid-elute the samples.

## Cell Migration Assay

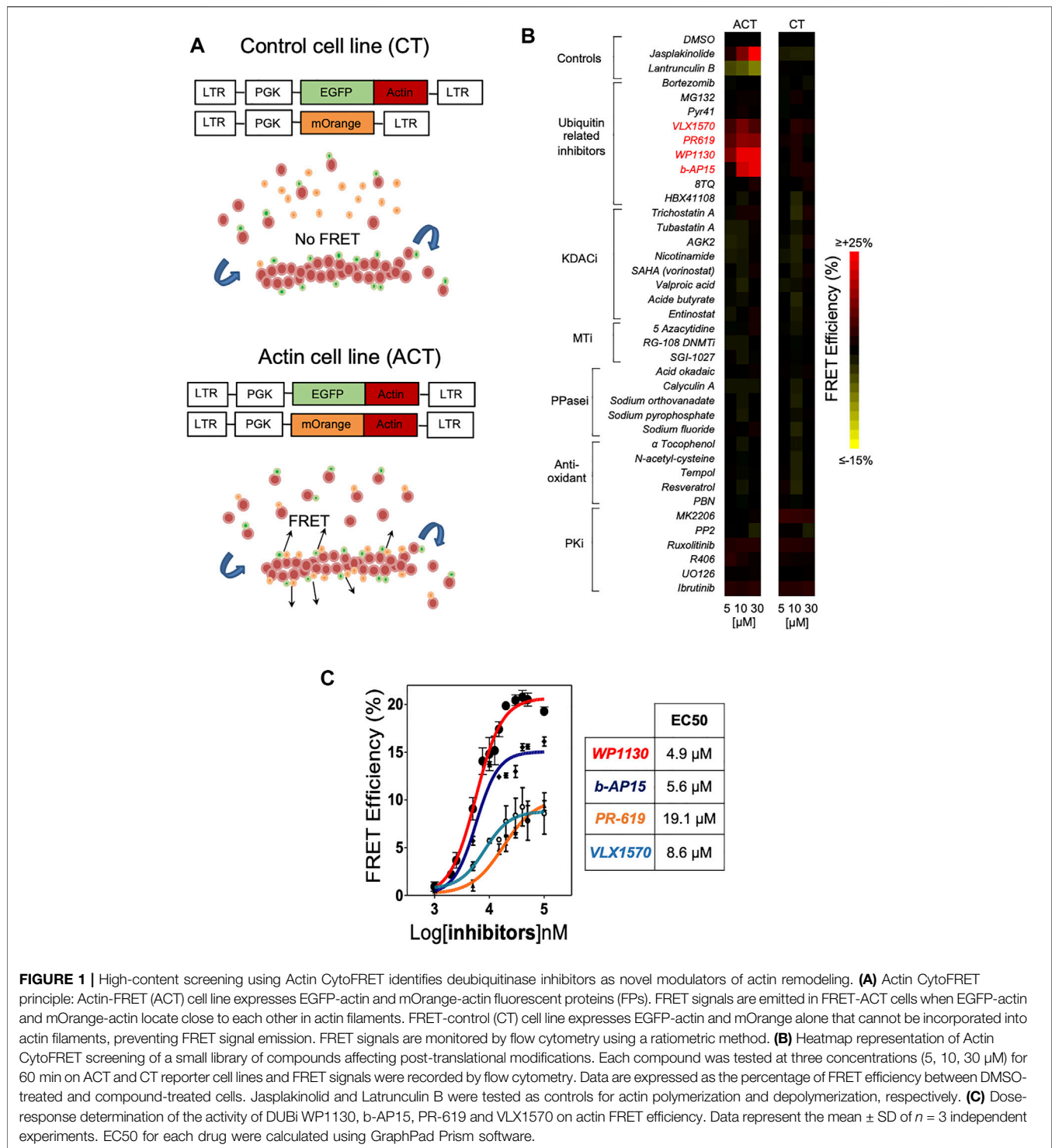
Jurkat cell migration was assessed on uncoated polycarbonate Transwell-96 well support plates with 5-μm pore size (Corning). Cells were serum-starved for 4 h before the experiment. 1 h before the experiment, chemical compounds were added to the medium. Then, medium alone or CXCL12 (100 ng/ml) was added in the lower chamber, and the treated cell suspension ( $5 \times 10^5$  cells) was added in the upper chamber. Cell migration in the lower well was measured after 90 min of migration and quantified by flow cytometry as described before (Ticchioni et al., 2002).

## Immunofluorescence and Microscopy Analysis

Jurkat cells were adhered on poly-L-lysine coated slides (Thermo scientific), fixed with 3.7% paraformaldehyde. Cells were then permeabilized with 0.1% Triton X-100, washed and incubated overnight with PBS supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA) in the presence of anti-Cofilin antibodies. Following incubation with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit cross-adsorbed secondary antibodies (Thermo Fischer Scientific) for 30 min and nuclei staining with DAPI, coverslips were mounted in ProLong antifade mounting reagent (Thermo Fisher Scientific). Slides were then analyzed on a Axiovert 200M microscope (Zeiss) equipped with Orca CCD camera (Hamamatsu).

## Statistical Analysis

All data are presented as the mean ± SD of at least three independent determinations. *p*-values were determined using the Prism software (GraphPad, United States). Data sets were tested for normality, no outliers were removed and Student's *T* tests were performed to determine statistical significance. *p*-values of 0.05 (\*), 0.01 (\*\*) and 0.001 (\*\*\*) were considered statistically significant.



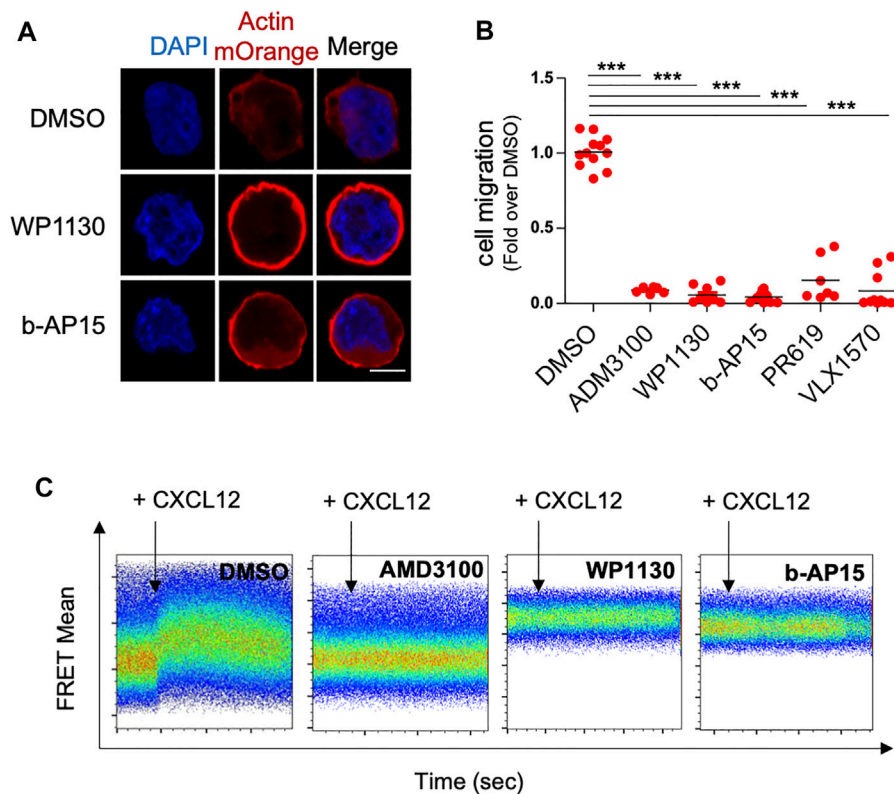
## RESULTS

### Actin CytoFRET Screening Identifies DUB Inhibitors as Actin Cytoskeleton Modulators

In order to evaluate the impact of post-translational modifications on actin dynamics, we employed Actin CytoFRET, a method that we developed for real-time

detection by flow cytometry of FRET signals generated by actin filament remodelling in engineered Jurkat leukemic T cell lines (Larbret et al., 2013). Briefly, the principle of the method is based on the use of biosensor cell lines expressing actin monomers fused to EGFP or mOrange fluorescent proteins. A cell line (CT) expressing actin-EGFP and unfused mOrange serves as a negative control (Figure 1A). Within the Actin





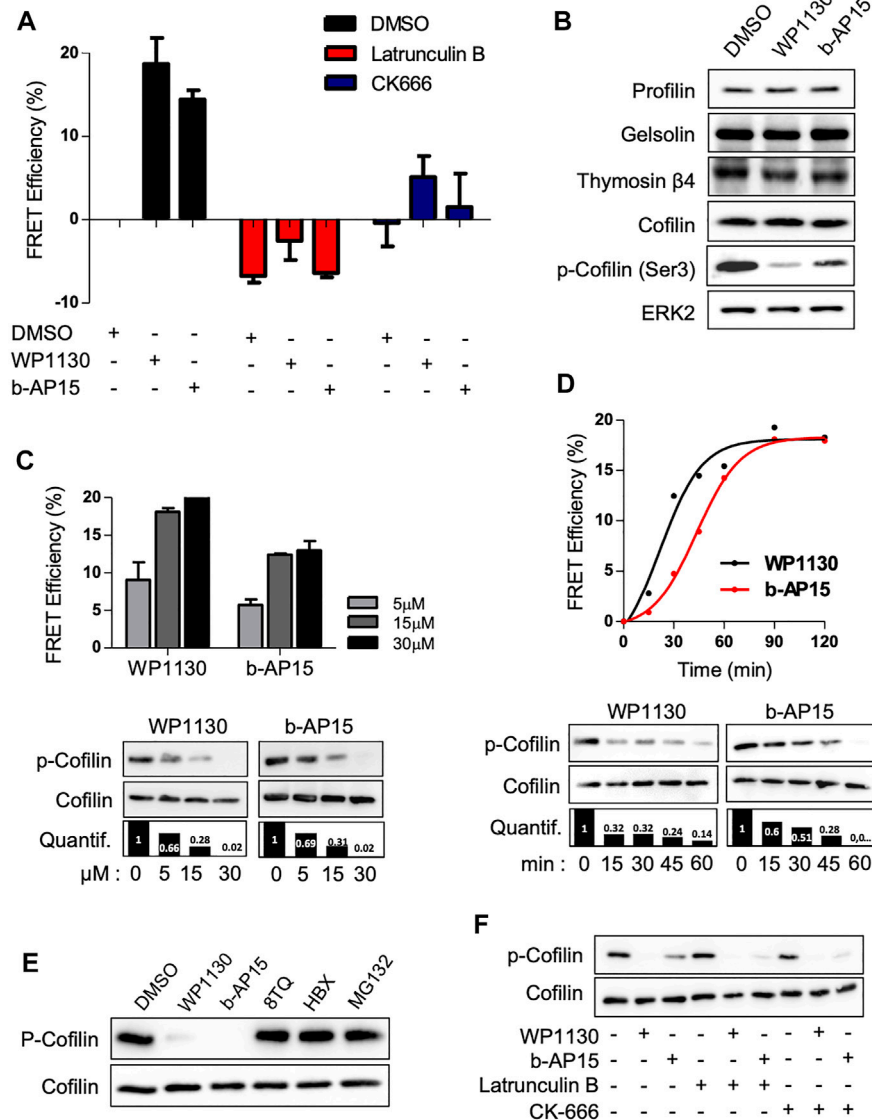
**FIGURE 2 |** DUB inhibition increases actin polymerization and blocks leukemic cell chemotactic migration. **(A)** Confocal microscopy analysis of actin-mOrange distribution in ACT Jurkat cells treated with DMSO or 15  $\mu$ M of WP1130 and b-AP15 for 30 min. Nuclei were counterstained with DAPI before analysis. Scale bar, 5  $\mu$ m. **(B)** Effects of WP1130, b-AP15, PR-619 and VLX1570 on CXCL12-induced Jurkat T cell migration. Cells were migrated against 100 ng/ml of CXCL12 for 90 min in the presence or not of 15  $\mu$ M of the indicated compound. Results are expressed as the fold of cell migration compared to DMSO control condition. Scatter plots show the mean of  $n = 3$  independent experiments.  $***p < 0.001$ , unpaired  $t$ -tests between DMSO and each treated condition. **(C)** Real time analysis of actin FRET signals induced by 100 ng/ml CXCL12 on ACT cell line treated with DMSO or 15  $\mu$ M WP1130 and b-AP15 for 30 min. Flow cytometry histograms show representative data on ACT cell line treated with DMSO or DUBs inhibitors. Data are representative of  $n = 3$  independent experiments. The effect of CXCR4 inhibitor AMD3100 (5  $\mu$ M) on CXCL12-induced actin FRET signals is shown as control.

CytoFRET cell line (ACT), the interaction of actin-EGFP and actin-mOrange during actin assembly generates a FRET signal that is recorded by flow cytometry using a ratiometric method (Larbret et al., 2013). Increase of FRET signal is characterized by a decrease in GFP fluorescence intensity and an increase in mOrange intensity upon 488 nm wavelength excitation laser. The actin stabilizing agent Jasplakinolide and the actin depolymerizing drug Latrunculin B were used as controls for monitoring actin assembly and disassembly, respectively. While Jasplakinolide induced an increase of FRET signals, Latrunculin B resulted in a decrease of FRET signals (Figure 1B). Using this method, we screened a small library of compounds interfering with PTMs such as acetylation, methylation, oxidation, phosphorylation and ubiquitination for their activity on actin cytoskeleton. ACT and CT cell lines were incubated with either DMSO or increasing doses of the indicated compounds. The majority of tested molecules had no effect on actin dynamics. On the contrary, the treatment with four inhibitors of DUBs, WP1130, b-AP15, VLX1570 and PR-619 (Supplementary Figure S1) induced a strong dose

dependent increase of actin FRET signals that compared to the effect of Jasplakinolide (Figure 1B). At a concentration of 30  $\mu$ M, FRET signals were augmented by WP1130, b-AP15, VLX1570 and PR-619 by 20.3, 15.8, 7.6 and 8.1%, respectively (Figure 1B). Dose responses performed with these compounds showed that the EC<sub>50</sub> for increasing actin FRET efficiency was 4.9, 5.6, 8.6 and 19.1  $\mu$ M for WP1130, b-AP15, VLX1570 and PR-619, respectively (Figure 1C). In contrast, UPS inhibition by Bortezomib and MG132 or the inhibition of the E1 ubiquitin-activating enzyme by Pyr-41 did not affect actin reorganization (Figure 1B). Our screening strategy thus identifies multiple DUB inhibitors (DUBi) as novel inducers of actin assembly.

## DUB Inhibitors Promote Actin Polymerization and Impair Leukemic Cell Migration

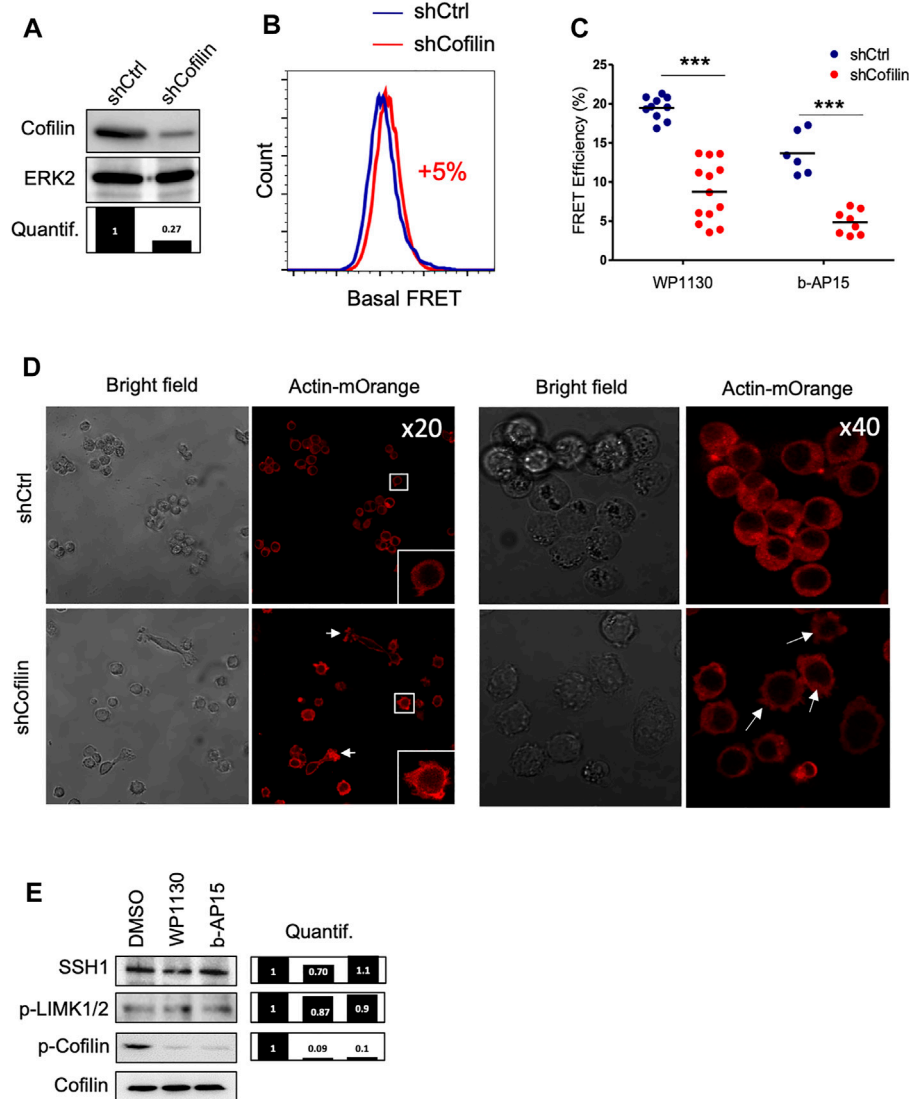
To confirm the effect of DUBi on actin polymerization, we analyzed ACT cells by confocal microscopy following treatment



**FIGURE 3** | DUB inhibition induces cofilin dephosphorylation. **(A)** Analysis of actin FRET efficiencies on ACT cell line pre-treated with 500 nM Latrunculin B or 5  $\mu$ M CK-666 for 1 h prior addition of 15  $\mu$ M of WP1130 or b-AP15 for one additional hour. Data are expressed as the percentage of FRET efficiency between DMSO-treated and compound-treated cells. Graphs are mean  $\pm$  SD of  $n = 3$  independent experiments. **(B)** Immunoblot analysis showing the effect of WP1130 and b-AP15 (1 h, 15  $\mu$ M) on the levels of actin sequestering proteins. Membranes were probed with the indicated antibodies and anti-ERK2 as loading control. **(C)** Effect of increasing amounts of WP1130 and b-AP15 on the phosphorylation of cofilin at Ser3. Membranes were probed with the indicated antibodies and quantified against total cofilin signal (bar graph). Upper panel, bar graphs show actin FRET efficiencies recorded on ACT cells upon the same treatment (mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments). immunoblot analysis of lysates obtained from cells treated as above. **(D)** Time-course analysis of cofilin Ser3 phosphorylation following treatment with 15  $\mu$ M of WP1130 and b-AP15 for the indicated time. Membranes were probed with the indicated antibodies and quantified against total cofilin signal (bar graph). Upper panel, the graph shows the corresponding effects on actin FRET efficiencies. **(E)** WP1130 and b-AP15, but not 8TQ, HBX41108 and MG132, reduce cofilin Ser3 phosphorylation levels. Immunoblotting were performed on lysates from Jurkat cells treated with 15  $\mu$ M of the indicated compound for 30 min. **(F)** Immunoblot analysis of cofilin Ser3 phosphorylation on cells treated with 500 nM Latrunculin B or 5  $\mu$ M CK-666 prior addition of 15  $\mu$ M of WP1130 and b-AP15 for 30 min.

with WP1130 and b-AP15. DUB inhibition by WP1130 and b-AP15 resulted in a dramatic redistribution of actin-mOrange fluorescence in a cortical ring (**Figure 2A**). Actin remodeling is a crucial event regulating cell motility (Olson and Sahai, 2009; Pollard and Cooper, 2009). We thus examined the effect of DUB inhibition on leukemic T cell chemotactic migration.

Jurkat cells were treated or not with DUBi and the CXCR4 inhibitor AMD3100 for 60 min and equal numbers of cells were allowed to migrate for 90 min towards a gradient of CXCL12 in Transwell chambers as described before (Ticchioni et al., 2002). The number of migrating cells in lower chambers was then determined by flow cytometry. The chemotaxis-driven



**FIGURE 4 |** Effect of cofilin knockdown on DUBi-induced actin reorganization. **(A)** Immunoblot analysis showing cofilin downregulation on Jurkat ACT cell line following stable transduction with shCtrl or shCofilin vectors. ERK2, loading control. Densitometric quantification to ERK2 signal is shown (lower panel). **(B)** Basal actin FRET measurement expressing shCtrl or shCofilin vectors. Data are representative of  $n = 5$  independent experiments. **(C)** Analysis of actin FRET efficiency following DUB inhibition on shCtrl and shCofilin ACT cell lines. Cells were treated or not with WP1130 and b-AP15 (15  $\mu\text{M}$  each) for 30 min and FRET efficiencies were recorded by flow cytometry. Data are expressed as the percentage of FRET efficiency between DMSO-treated and compound-treated cells. Scatter plots show the mean of  $n = 5$  independent experiments.  $***p < 0.001$ , unpaired  $t$ -tests between DMSO and each treated condition. **(D)** Confocal microscopy analysis of actin-mOrange reorganization in shCtrl and shCofilin ACT cells. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ . **(E)** Effect of WP1130 and b-AP15 on SSH1 expression and LIMK1/2 and Cofilin phosphorylation. Cells were treated for 1 h at 37°C with the indicated compound (15  $\mu\text{M}$ ) and lysates were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies and quantified by densitometry analysis against total cofilin signal (right panel).

migration of leukemic cells treated with WP1130, b-AP15, VLX1570, PR-619 and AMD3100 was dramatically impaired compared to cells treated with DMSO (more than 90% of reduction) (**Figure 2B**). Note that the dose of WP1130 and b-AP15 that blocked cell migration had no impact on Jurkat cell viability as shown by FACS analysis of annexin V/PI staining (**Supplementary Figure S2**). We next examined whether the inhibition of leukemic cell migration by DUBi originated from an impaired response to CXCL12 of its

receptor CXCR4. Real time analysis of actin FRET following CXCL12 stimulation showed that the rapid reorganization of actin that was triggered by CXCL12 was completely abolished by a co-treatment with WP1130, b-AP15 and AMD3100 (**Figure 2C**). Importantly, DUB inhibition had no effect on the levels of CXCL12 receptor CXCR4 (**Supplementary Figure S3**). These observations show that DUB inhibition promotes exacerbated actin polymerization, which impairs leukemic cell chemotactic migration.

## DUB Inhibition Induces Actin Reorganization Through Cofilin Dephosphorylation

We next wish to characterize how DUB inhibition resulted in actin reorganization. The Jurkat ACT cells were pre-treated with the F-actin depolymerizing drug Latrunculin B (LB) or the Arp2/3 complex inhibitor CK-666. As shown in **Figure 3A**, the pre-treatment with LB abolished the elevation of actin FRET signals induced by WP1130 and b-AP15, whereas the pre-treatment with CK-666 dramatically reduced it, indicating the involvement of actin monomers nucleation and/or assembly in this process. We therefore hypothesized that DUB inhibition could affect the expression and/or the activity of actin-binding protein involved in actin nucleation or polymerization (Pollard, 2016). Western blot analysis of lysates from Jurkat cells treated with WP1130 and b-AP15 revealed that DUB inhibition did not affect the protein levels of ABPs such as profilin, gelsolin, cofilin and thymosin  $\beta$ 4. However, a decrease of the phosphorylation of cofilin serine 3 was observed upon WP1130, b-AP15, VLX1570 and PR-619 treatment (**Figure 3B**) (**Supplementary Figure S4**). The phosphorylation of the actin-severing protein cofilin suppresses its depolymerizing and nucleation activity, thereby pointing at cofilin as a key target of DUBs in actin remodeling. Dose-response and kinetic analysis of DUBi treatment further showed a correlation between cofilin dephosphorylation and actin FRET Efficiency (**Figures 3C,D**). In contrast, MG132 and two other DUBi, 8TQ and HBX41108, which generated no actin FRET signals (**Figure 1B**), had no impact on the levels of cofilin phosphorylation (**Figure 3E**). Importantly, Jurkat cell treatment with Latrunculin B and CK-666 did not affect DUBi-induced cofilin dephosphorylation (**Figure 3F**), indicating that cofilin dephosphorylation was not secondary to actin depolymerization.

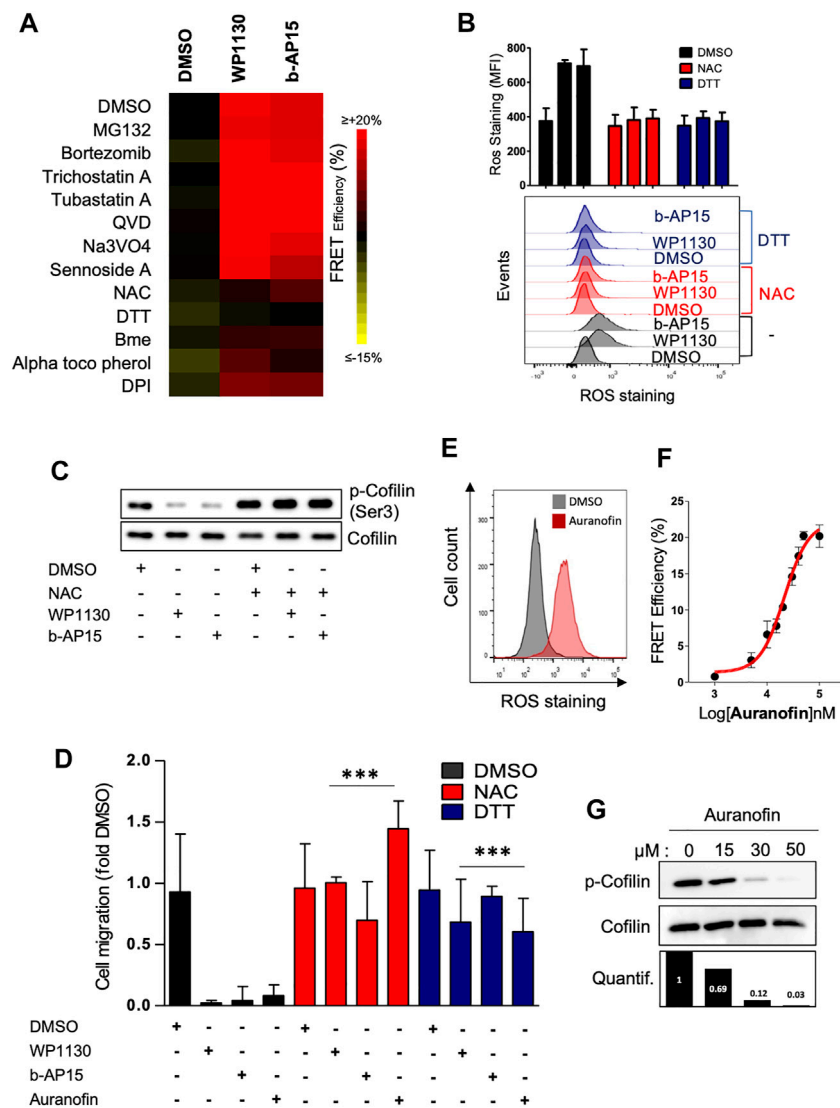
To confirm that cofilin is a major target for cytoskeletal changes induced following DUB inhibition, we stably knock-downed cofilin in the ACT cell line (**Figure 4A**). Surprisingly, cofilin-depleted leukemic cells exhibited a very low modification of basal actin FRET signal (+5%) compared to control cells (**Figure 4B**). However, the reduction of actin FRET efficiencies observed in shCofilin ACT versus shCtrl ACT reporter cells treated with WP1130 and b-AP15 revealed that actin polymerization induced by DUBi required the expression of cofilin (from 19% for shCtrl to 9% for shCofilin treated with WP1130 and from 13 to 4% for cells treated with b-AP15) (**Figure 4C**). Confocal microscopy analyses further showed that cofilin depletion in Jurkat cells resulted in increased polymerization of actin filaments associated with uropod-like structures and elongated cells (**Figure 4D**), a phenotype that is consistent with the described role of cofilin (Nishita et al., 2005). We next examined the involvement of Slingshot Protein Phosphatase (SSH) and LIM domain kinase (LIMK), two known upstream regulators of cofilin phosphorylation and activity (Huang et al., 2006; Prunier et al., 2017). DUB inhibition with WP1130 and b-AP15 has no detectable impact on LIMK phosphorylation and SSH1 expression as measured by

immunoblot analysis (**Figure 4E**). These results indicate that actin reorganization induced by DUBi involves a non-degradative and LIMK-independent modulation of cofilin activity.

## Actin Reorganization Induced by DUBi Is ROS-Dependent and Involves Cofilin Oxidation

We next wished to clarify the molecular mechanism underlying the effects of DUB inhibition on actin cytoskeleton. DUB inhibition is linked to increased protein ubiquitination followed by proteasome-mediated proteolytic degradation and/or aggresome formation (Kapuria et al., 2010; D'Arcy et al., 2011). Consistently, we observed that the treatment of Jurkat cells with WP1130 and b-AP15 induced the accumulation of polyubiquitinated proteins (**Supplementary Figure S5A**). However, the direct inhibition of 26S proteasome by MG-132 and bortezomid had no effect on either basal (**Figure 1B**) or DUBi-induced actin FRET signals (**Figure 5A**), indicating that DUB-mediated actin regulation is not a direct consequence of the accumulation of polyubiquitinated proteins. Furthermore, in contrast to WP1130 or MG-132, b-AP15 treatment did not result in aggresome formation (**Supplementary Figure S5B**), suggesting that the effect of DUB inhibition on actin remodeling did not follow protein accumulation within aggresome-like structures. In support to this, blocking the regulator of aggresome formation HDAC6 (Kawaguchi et al., 2003) with tubastatin A or trichostatin A had no impact on actin assembly that was promoted by WP1130 and b-AP15 (**Figure 5A**) (**Supplementary Figure S5C**). Recent studies have linked DUB inhibition to increased oxidative stress and ROS generation (Didier et al., 2018; Charbonneau et al., 2019; Zhang et al., 2019). Conversely, DUBs can be inactivated by ROS (Cotto-Rios et al., 2012; Lee et al., 2013). Keeping in mind that cofilin activity can be modulated by oxidative signals (Klemke et al., 2008; Cameron et al., 2015), we examined the involvement of ROS in DUBi-induced actin rearrangement. The pre-treatment of Jurkat ACT cells with the antioxidant compounds DTT, NAC,  $\alpha$ -tocopherol and DPI abrogated actin FRET signals that were induced by WP1130 and b-AP15 (**Figure 5A**). Consistently, the addition of DTT or NAC prevented the generation of ROS induced by DUB inhibition (**Figure 5B**) and the dephosphorylation of cofilin that was induced by WP1130 and b-AP15 (**Figure 5C**). In addition, the pretreatment of Jurkat cells with NAC or DTT restored the ability of leukemic cells to migrate against CXCL12 when DUB activity was inhibited (**Figure 5D**). As a control of the effect of ROS on actin reorganization in leukemic cells, the treatment with Auranofin, a compound known for its capacity to induce ROS in leukemic cells (Fiskus et al., 2014) (**Figure 5E**), was found to increase actin FRET signals (**Figure 5F**), decreased cofilin serine 3 phosphorylation (**Figure 5G**), and blocked CXCL12-induced chemotactic cell migration in ROS-dependent manner (**Figure 5D**).

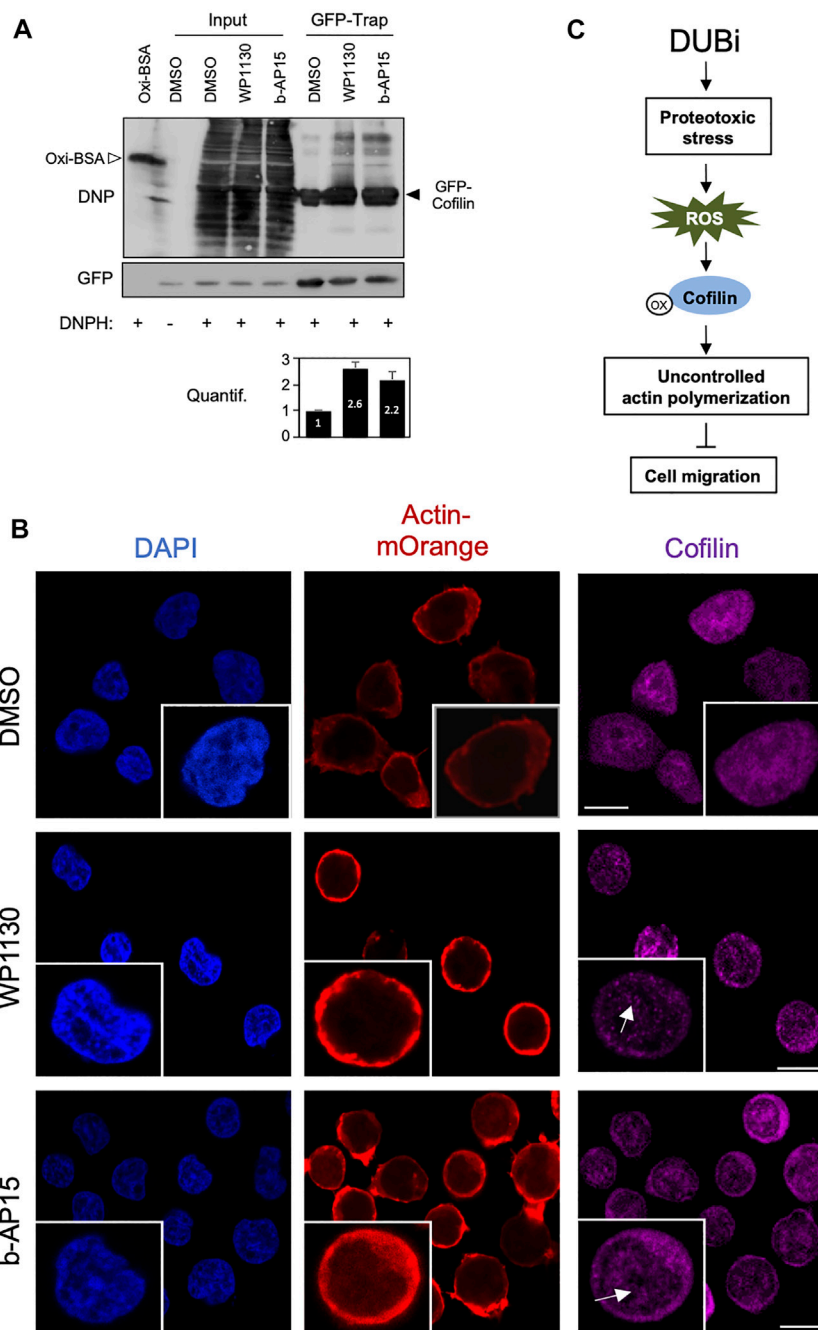
These results showing that DUBs regulate cofilin function through a ROS-dependent pathway led us to investigate the impact of DUB inhibition on cofilin oxidation, a process linked



**FIGURE 5** | Actin cytoskeleton reorganization induced by WP1130 and b-AP15 is ROS dependent. **(A)** Heatmap representation of actin FRET efficiencies on ACT reporter cells that have been pre-treated with the indicated compounds, following exposure to 15 μM WP1130 or b-AP15 for 60 min. FRET signals were recorded by flow cytometry. Data are expressed as the percentage of FRET efficiency between DMSO-treated and compound-treated cells and are representative of  $n = 3$  independent experiments. **(B)** Effect of WP1130 and b-AP15 on ROS production. ACT reporter cells that have been pre-treated with 1 mM DTT and 100 μM NAC were incubated with 15 μM WP1130 or b-AP15 for 60 min. Following treatment, cells were stained with 5 μM CM-H<sub>2</sub>DCFDA and analyzed by flow cytometry. Bar graphs show the mean fluorescence intensity (MF) of ROS staining of  $n = 3$  independent experiments. **(C)** Whole cell lysates of Jurkat pre-treated with 100 μM NAC before addition or not of 15 μM WP1130 or b-AP15 for 30 min were analyzed by immunoblotting with antibodies against phosphorylated cofilin and total cofilin. **(D)** Effect of WP1130, b-AP15 and Auranofin on chemotactic migration of leukemic cells pretreated or not with DTT and NAC. Cells were migrated against 100 ng/ml of CXCL12 for 90 min in the presence or not of the indicated compound. Results are expressed as the fold of cell migration compared to the DMSO condition. Bar graphs show the mean of  $n = 3$  independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ , unpaired  $t$ -tests between DMSO and each treated condition. **(E)** Effect of Auranofin on ROS production. **(F)** Dose response curve of the activity of Auranofin on actin FRET efficiency. **(G)** Immunoblot analysis showing the effect of Auranofin on the phosphorylation of cofilin at Ser3. Densitometric quantification against total cofilin signal is shown (lower panel).

to actin cytoskeleton dynamics in T cells (Samstag et al., 2013). Jurkat cells stably expressing a GFP-cofilin construct were treated with WP1130 or b-AP15 for 30 min. Oxidized proteins were labeled with DNPH in cell lysates after pulldown with anti-GFP-Trap nanobodies and immunoblot analysis with antibodies against DNP. As shown in **Figure 6A**, WP1130 and b-AP15 increased cofilin oxidation by 2.6 and 2.2

fold, respectively, compared to DMSO-treated conditions. Cofilin exhibits a tendency for self-association under oxidative stress, inducing the rapid formation of dimers and oligomers (Pfannstiel et al., 2001; Goyal et al., 2013). Consistently, immunofluorescence microscopy analysis revealed that compared to control cells Jurkat cells treated with DUBi exhibit increased cofilin aggregates that partially



**FIGURE 6** | Inhibition of DUBs in leukemic cells induces Cofilin oxidation and oligomerization. **(A)** Jurkat cells stably expressing GFP-cofilin were treated or not with 15  $\mu$ M WP1130 or b-AP15 for 30 min and lysed. Cell lysates were incubated with anti-GFP nanobody (GFP-Trap) coupled to agarose beads. The trapped proteins and a fraction of the cell lysates (Input) were incubated with DNP for 15 min at room temperature before immunoblot with antibodies against DNP or GFP. Anti-DNP immunoblot of DNP-labelled oxidized BSA (40 ng) is shown as a control. Data are representative of  $n = 2$  experiments. Densitometric quantification of cofilin oxidation against GFP signal is shown as bar graph (bottom panel). **(B)** Immunofluorescence microscopy analysis of actin-mOrange and Cofilin distribution in ACT Jurkat cell treated with DMSO or 15  $\mu$ M of WP1130 and b-AP15 for 30 min. Scale bar, 10  $\mu$ m. Inset, white arrows show Cofilin aggregates. **(C)** Schematic overview of the effect of DUB inhibition on cofilin activity, actin polymerization and cell migration.

located in the nucleus (**Figure 6B**). Together, these results demonstrate that DUBs inhibitors display antimigratory activity in leukemic cells through ROS-mediated cofilin oxidation and actin cytoskeleton dysfunction.

## DISCUSSION

The remodelling of the actin cytoskeleton is modulated by interactions between actin and a number of proteins such as

ABPs (Pollard, 2016). The expression, activity and location of actin and ABPs are regulated by a large number of PTMs (Terman and Kashina, 2013), which largely account for the complexity of actin networks and their dysregulation in pathological processes. A better understanding of these molecular mechanisms is therefore of critical importance. In this study, we have examined the impact of pharmacological modulators of PTMs on actin dynamics by using our method named Actin CytoFRET (Larbret et al., 2013). The screening with Actin CytoFRET of a small library of compounds targeting enzymes involved in acetylation, methylation, phosphorylation and ubiquitination of proteins revealed that several small molecules, including WP1130, b-AP15, VLX1570 and PR-619, have a marked effect on actin polymerization. These compounds have been characterized as broad-range inhibitors of DUBs, a group of enzymes with a cysteine protease activity, which catalyze the removal of ubiquitin or ubiquitin chains from post-translationally modified targets (Kapuria et al., 2010; Altun et al., 2011; D'Arcy et al., 2011). DUBi can form stable covalent adducts with specific cysteine contained within the catalytic domain of these enzymes, thereby inhibiting their cysteine protease activity. DUBs display several essential cellular functions, such as the recycling of ubiquitin, protein trafficking, and regulating protein degradation by the ubiquitin-proteasome system (UPS) (Komander et al., 2009; D'Arcy et al., 2015). To this regard, the effects of DUB inhibitors on actin remodeling is unlikely related to a general inhibition of the UPS since short term proteasomal inhibition by Bortezomib and MG132 does not alter actin reorganization. In addition, other DUB inhibitors such as 8TQ (Mofers et al., 2017) and HBX41108 (Colombo et al., 2010), as well as the selective inhibitor of ubiquitin-activating enzyme E1 PYR-41 (Yang et al., 2007), have no detectable impact on actin dynamics, indicating that the identified DUB inhibitors are not affecting actin polymerization through a general disruption of ubiquitin homeostasis or proteasome activity.

Molecular mechanisms that are considered hallmarks of DUB inhibition consist of an accumulation of poly-ubiquitinated proteins, the activation of the unfolded protein response (UPR), proteotoxic and oxidative stress, and cytotoxicity (D'Arcy et al., 2011; Brnjic et al., 2014; Tian et al., 2014; Didier et al., 2018; Zhang et al., 2019). Whether DUB inhibitors can regulate others cellular mechanisms has been poorly investigated. We found that short exposure of leukemic cells to DUB inhibitors increased actin remodeling and dramatically impedes leukemic cell migration through a ROS-dependent process. Such a mechanism was supported by the observation that anti-oxidant molecules prevented the exacerbated actin remodeling triggered following DUB inhibition. Although the induction of ROS is a common feature in response to these compounds, what the generated ROS exactly target is poorly characterized. Our results show that enhanced oxidation of cofilin represents another major determinant of the cellular action of DUBi in leukemic cells. The treatment of Jurkat cells with DUB inhibitors such as WP1130, b-AP15,

VLX1570 and PR-619 was associated with a marked downregulation of phosphorylated levels of cofilin serine 3. In addition, the induction of actin FRET signals by DUBi is markedly reduced in Jurkat biosensor cells in which cofilin has been knocked down. The ADF/cofilin family are closely related ABPs that play overlapping but distinct roles in cellular processes in which rapid reorganization or renewal of actin filaments is required (Bernstein and Bamburg, 2010; Kanellos and Frame, 2016). The activity of ADF/cofilin family is tightly regulated by phosphorylation of the common serine 3 residue by upstream kinases such as LIMK. Unphosphorylated cofilin bind actin filaments and promote cycles of actin depolymerization/polymerization that are critical for biological processes (Kanellos and Frame, 2016). Interestingly, the treatment with WP1130 and b-AP15, in addition to induce the dephosphorylation of cofilin on serine 3, also promotes cofilin oxidation. We also show that LIMK and SSH1 were not affected following DUB inhibition, indicating that cofilin dephosphorylation occurs independently of SSH/LIMK modulation. Consistent with our observations, cofilin oxidation in T cells has been associated with an increase of F-actin characterized by cell migration defects and hyporesponsiveness (Klemke et al., 2008), leading to the hypothesis that cofilin acts as a redox sensitive mediator of actin dynamics in T cell (Samstag et al., 2013). Furthermore, polarized migration of mesenchymal cells has been linked with localized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production that inhibits cofilin via cysteine oxidation (Cameron et al., 2015; Rudzka et al., 2015). Our hypothesis is that, while cofilin oxidation following DUB inhibition promotes its dephosphorylation and binding to F-Actin, it also prevents its severing activity, leading to an uncontrolled production of actin filaments, a massive accumulation of cortical actin, which eventually impairs leukemic cell migration (**Figure 6C**).

The notion that ROS produced in response to DUB inhibitors are central to their action on actin cytoskeleton is consistent with our observations that the treatment with the thioredoxin reductase inhibitor Auranofin, which induces a strong oxidative stress, is also accompanied by actin remodeling and impaired leukemic cell migration. The oxidation of the catalytic cysteine of DUBs by exogenous and endogenous ROS have been shown to reversibly inhibit their isopeptidase activity (Lee et al., 2013). It is therefore possible that DUB inhibitors may have their action amplified through oxidation of cysteine residues within the catalytic domain of DUBs, therefore reinforcing their potent action on cell migration. In this context, it would be interesting to determine how the expression of oxidation-resistant cofilin may affect actin dynamics and leukemic cell migration.

The critical role of ROS as second messengers in cell biological functions including actin cytoskeleton remodeling and cell migration has been described (Finkel, 2011; Stanley et al., 2014). Here, we identify several inhibitors of deubiquitinating enzymes as critical regulators of actin cytoskeleton and cell migration through ROS-mediated regulation of the actin remodeling

protein cofilin, suggesting that pharmacological targeting of DUBs may represent a novel way to manipulate leukemic cell migration.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

FL and MD conceived the study. FL, PB, and ND performed the experiments and analyzed the data with the help of MD. IS, LL, and ST-D contributed reagents and scientific inputs. FL and MD prepared the figures. MD supervised the study and wrote the manuscript with the help of FL. All authors reviewed the manuscript.

## REFERENCES

- Altun, M., Kramer, H. B., Willems, L. I., McDermott, J. L., Leach, C. A., Goldenberg, S. J., et al. (2011). Activity-based Chemical Proteomics Accelerates Inhibitor Development for Deubiquitylating Enzymes. *Chem. Biol.* 18 (11), 1401–1412. doi:10.1016/j.chembiol.2011.08.018
- Badour, K., Zhang, J., Shi, F., Leng, Y., Collins, M., and Siminovich, K. A. (2004). Fyn and PTP-PEST-Mediated Regulation of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASp) Tyrosine Phosphorylation Is Required for Coupling T Cell Antigen Receptor Engagement to WASp Effector Function and T Cell Activation. *J. Exp. Med.* 199 (1), 99–112. doi:10.1084/jem.20030976
- Bernstein, B. W., and Bamberg, J. R. (2010). ADF/cofilin: a Functional Node in Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 20 (4), 187–195. doi:10.1016/j.tcb.2010.01.001
- Brnjic, S., Mazurkiewicz, M., Fryknäs, M., Sun, C., Zhang, X., Larsson, R., et al. (2014). Induction of Tumor Cell Apoptosis by a Proteasome Deubiquitinase Inhibitor Is Associated with Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* 21 (17), 2271–2285. doi:10.1089/ars.2013.5322
- Cameron, J. M., Gabrielsen, M., Chim, Y. H., Munro, J., McGhee, E. J., Sumpton, D., et al. (2015). Polarized Cell Motility Induces Hydrogen Peroxide to Inhibit Cofilin via Cysteine Oxidation. *Curr. Biol.* 25 (11), 1520–1525. doi:10.1016/j.cub.2015.04.020
- Charbonneau, M. E., Passalacqua, K. D., Hagen, S. E., Showalter, H. D., Wobus, C. E., and O'Riordan, M. X. D. (2019). Perturbation of Ubiquitin Homeostasis Promotes Macrophage Oxidative Defenses. *Sci. Rep.* 9 (1), 10245. doi:10.1038/s41598-019-46526-9
- Colombo, M., Vallese, S., Peretto, I., Jacq, X., Rain, J. C., Colland, F., et al. (2010). Synthesis and Biological Evaluation of 9-Oxo-9h-Indeno[1,2-B]pyrazine-2,3-Dicarbonitrile Analogues as Potential Inhibitors of Deubiquitinating Enzymes. *ChemMedChem* 5 (4), 552–558. doi:10.1002/cmdc.200900409
- Cory, G. O., Cramer, R., Blanchoin, L., and Ridley, A. J. (2003). Phosphorylation of the WASP-VCA Domain Increases its Affinity for the Arp2/3 Complex and Enhances Actin Polymerization by WASP. *Mol. Cell* 11 (5), 1229–1239. doi:10.1016/s1097-2765(03)00172-2
- Cotto-Rios, X. M., Békés, M., Chapman, J., Ueberheide, B., and Huang, T. T. (2012). Deubiquitinases as a Signaling Target of Oxidative Stress. *Cell Rep* 2 (6), 1475–1484. doi:10.1016/j.celrep.2012.11.011
- D'Arcy, P., Brnjic, S., Olofsson, M. H., Fryknäs, M., Lindsten, K., De Cesare, M., et al. (2011). Inhibition of Proteasome Deubiquitinating Activity as a New Cancer Therapy. *Nat. Med.* 17 (12), 1636–1640. doi:10.1038/nm.2536
- D'Arcy, P., Wang, X., and Linder, S. (2015). Deubiquitinase Inhibition as a Cancer Therapeutic Strategy. *Pharmacol. Ther.* 147, 32–54. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.002

## FUNDING

This work was supported by funds from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Ligue Contre le Cancer, Fondation ARC, Canceropôle PACA and the French Government (National Research Agency, ANR) through the “Investments for the Future” LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the C3M imaging facility for technical help.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.778216/full#supplementary-material>

- Didier, R., Mallavialle, A., Ben Jouira, R., Domdom, M. A., Tichet, M., Auberger, P., et al. (2018). Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Mol. Cancer Ther.* 17 (7), 1416–1429. doi:10.1158/1535-7163.mct-17-0919
- Finkel, T. (2011). Signal Transduction by Reactive Oxygen Species. *J. Cell Biol.* 194 (1), 7–15. doi:10.1083/jcb.201102095
- Fiskus, W., Saba, N., Shen, M., Ghias, M., Liu, J., Gupta, S. D., et al. (2014). Auranofin Induces Lethal Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress and Exerts Potent Preclinical Activity against Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res.* 74 (9), 2520–2532. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2033
- Goyal, P., Pandey, D., Brünnert, D., Hammer, E., Zygmunt, M., and Siess, W. (2013). Cofilin Oligomer Formation Occurs *In Vivo* and Is Regulated by Cofilin Phosphorylation. *PLoS One* 8 (8), e71769. doi:10.1371/journal.pone.0071769
- Hao, Y. H., Doyle, J. M., Ramanathan, S., Gomez, T. S., Jia, D., Xu, M., et al. (2013). Regulation of WASH-dependent Actin Polymerization and Protein Trafficking by Ubiquitination. *Cell* 152 (5), 1051–1064. doi:10.1016/j.cell.2013.01.051
- Huang, T. Y., DerMardirossian, C., and Bokoch, G. M. (2006). Cofilin Phosphatases and Regulation of Actin Dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18 (1), 26–31. doi:10.1016/j.cub.2005.11.005
- Kanellos, G., and Frame, M. C. (2016). Cellular Functions of the ADF/cofilin Family at a Glance. *J. Cell Sci.* 129 (17), 3211–3218. doi:10.1242/jcs.187849
- Kapur, V., Peterson, L. F., Fang, D., Bornmann, W. G., Talpaz, M., and Donato, N. J. (2010). Deubiquitinase Inhibition by Small-Molecule WP1130 Triggers Aggresome Formation and Tumor Cell Apoptosis. *Cancer Res.* 70 (22), 9265–9276. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1530
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A., and Yao, T. P. (2003). The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell* 115 (6), 727–738. doi:10.1016/s0092-8674(03)00939-5
- Klemke, M., Wabnitz, G. H., Funke, F., Funk, B., Kirchgessner, H., and Samstag, Y. (2008). Oxidation of Cofilin Mediates T Cell Hyporesponsiveness under Oxidative Stress Conditions. *Immunity* 29 (3), 404–413. doi:10.1016/j.immuni.2008.06.016
- Komander, D., Clague, M. J., and Urbé, S. (2009). Breaking the Chains: Structure and Function of the Deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (8), 550–563. doi:10.1038/nrm2731
- Lang, P., Gesbert, F., Delespigne-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., and Bertoglio, J. (1996). Protein Kinase A Phosphorylation of RhoA Mediates the Morphological and Functional Effects of Cyclic AMP in Cytotoxic Lymphocytes. *EMBO J.* 15 (3), 510–519. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00383.x



- Larbret, F., Dubois, N., Brau, F., Guillemot, E., Mahiddine, K., Tartare-Deckert, S., et al. (2013). Technical advance: Actin CytoFRET, a Novel FRET Flow Cytometry Method for Detection of Actin Dynamics in Resting and Activated T Cell. *J. Leukoc. Biol.* 94 (3), 531–539. doi:10.1189/jlb.0113022
- Lee, J. G., Baek, K., Soetandyo, N., and Ye, Y. (2013). Reversible Inactivation of Deubiquitinases by Reactive Oxygen Species *In Vitro* and in Cells. *Nat. Commun.* 4, 1568. doi:10.1038/ncomms2532
- Mofers, A., Pellegrini, P., Linder, S., and D'Arcy, P. (2017). Proteasome-associated Deubiquitinases and Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 36 (4), 635–653. doi:10.1007/s10555-017-9697-6
- Nishita, M., Tomizawa, C., Yamamoto, M., Horita, Y., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2005). Spatial and Temporal Regulation of Cofilin Activity by LIM Kinase and Slingshot Is Critical for Directional Cell Migration. *J. Cell Biol* 171 (2), 349–359. doi:10.1083/jcb.200504029
- Olson, M. F., and Sahai, E. (2009). The Actin Cytoskeleton in Cancer Cell Motility. *Clin. Exp. Metastasis* 26 (4), 273–287. doi:10.1007/s10585-008-9174-2
- Paavilainen, V. O., Bertling, E., Falck, S., and Lappalainen, P. (2004). Regulation of Cytoskeletal Dynamics by Actin-Monomer-Binding Proteins. *Trends Cell Biol* 14 (7), 386–394. doi:10.1016/j.tcb.2004.05.002
- Pfannstiel, J., Cyrklaff, M., Habermann, A., Stoeva, S., Griffiths, G., Shoeman, R., et al. (2001). Human Cofilin Forms Oligomers Exhibiting Actin Bundling Activity. *J. Biol. Chem.* 276 (52), 49476–49484. doi:10.1074/jbc.M104760200
- Pollard, T. D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 8 (8), a018226. doi:10.1101/cshperspect.a018226
- Pollard, T. D., and Cooper, J. A. (2009). Actin, a central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 326 (5957), 1208–1212. doi:10.1126/science.1175862
- Prunier, C., Prudent, R., Kapur, R., Sadoul, K., and Lafanechère, L. (2017). LIM Kinases: Cofilin and beyond. *Oncotarget* 8 (25), 41749–41763. doi:10.18632/oncotarget.16978
- Rotty, J. D., Wu, C., and Bear, J. E. (2013). New Insights into the Regulation and Cellular Functions of the ARP2/3 Complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 14 (1), 7–12. doi:10.1038/nrm3492
- Rudzka, D. A., Cameron, J. M., and Olson, M. F. (2015). Reactive Oxygen Species and Hydrogen Peroxide Generation in Cell Migration. *Commun. Integr. Biol.* 8 (5), e1074360. doi:10.1080/19420889.2015.1074360
- Samstag, Y., John, I., and Wabnitz, G. H. (2013). Cofilin: a Redox Sensitive Mediator of Actin Dynamics during T-Cell Activation and Migration. *Immunol. Rev.* 256 (1), 30–47. doi:10.1111/imr.12115
- Schaefer, A., Nethe, M., and Hordijk, P. L. (2012). Ubiquitin Links to Cytoskeletal Dynamics, Cell Adhesion and Migration. *Biochem. J.* 442 (1), 13–25. doi:10.1042/BJ20111815
- Sit, S. T., and Manser, E. (2011). Rho GTPases and Their Role in Organizing the Actin Cytoskeleton. *J. Cell Sci* 124 (Pt 5), 679–683. doi:10.1242/jcs.064964
- Stanley, A., Thompson, K., Hynes, A., Brakebusch, C., and Quondamatteo, F. (2014). NADPH Oxidase Complex-Derived Reactive Oxygen Species, the Actin Cytoskeleton, and Rho GTPases in Cell Migration. *Antioxid. Redox Signal.* 20 (13), 2026–2042. doi:10.1089/ars.2013.5713
- Suarez, C., and Kovar, D. R. (2016). Internetwork Competition for Monomers Governs Actin Cytoskeleton Organization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 17 (12), 799–810. doi:10.1038/nrm.2016.106
- Terman, J. R., and Kashina, A. (2013). Post-translational Modification and Regulation of Actin. *Curr. Opin. Cell Biol* 25 (1), 30–38. doi:10.1016/j.ccb.2012.10.009
- Tian, Z., D'Arcy, P., Wang, X., Ray, A., Tai, Y. T., Hu, Y., et al. (2014). A Novel Small Molecule Inhibitor of Deubiquitylating Enzyme USP14 and UCHL5 Induces Apoptosis in Multiple Myeloma and Overcomes Bortezomib Resistance. *Blood* 123 (5), 706–716. doi:10.1182/blood-2013-05-500033
- Ticchioni, M., Charvet, C., Noraz, N., Lamy, L., Steinberg, M., Bernard, A., et al. (2002). Signaling through ZAP-70 Is Required for CXCL12-Mediated T-Cell Transendothelial Migration. *Blood* 99 (9), 3111–3118. doi:10.1182/blood.v99.9.3111
- Tojkander, S., Gateva, G., and Lappalainen, P. (2012). Actin Stress Fibers—Assembly, Dynamics and Biological Roles. *J. Cell Sci* 125 (Pt 8), 1855–1864. doi:10.1242/jcs.098087
- Wang, H. R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A. A., Alexandrova, E., Thomsen, G. H., et al. (2003). Regulation of Cell Polarity and Protrusion Formation by Targeting RhoA for Degradation. *Science* 302 (5651), 1775–1779. doi:10.1126/science.1090772
- Yang, Y., Kitagaki, J., Dai, R. M., Tsai, Y. C., Lorick, K. L., Ludwig, R. L., et al. (2007). Inhibitors of Ubiquitin-Activating Enzyme (E1), a New Class of Potential Cancer Therapeutics. *Cancer Res.* 67 (19), 9472–9481. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0568
- Yuan, W. C., Lee, Y. R., Lin, S. Y., Chang, L. Y., Tan, Y. P., Hung, C. C., et al. (2014). K33-Linked Polyubiquitination of Coronin 7 by Cul3-KLHL20 Ubiquitin E3 Ligase Regulates Protein Trafficking. *Mol. Cell* 54 (4), 586–600. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.035
- Zhang, X., Espinosa, B., Saei, A. A., D'Arcy, P., Zubarev, R. A., and Linder, S. (2019). Oxidative Stress Induced by the Deubiquitinase Inhibitor B-AP15 Is Associated with Mitochondrial Impairment. *Oxid. Med. Cell Longev* 2019, 1659468. doi:10.1155/2019/1659468

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Larbret, Biber, Dubois, Ivanov, Lafanechere, Tartare-Deckert and Deckert. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.