



HAL
open science

La ferroptose, une opportunité thérapeutique pour contrer la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome

Cyrille Berra

► **To cite this version:**

Cyrille Berra. La ferroptose, une opportunité thérapeutique pour contrer la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB053 . tel-04799501

HAL Id: tel-04799501

<https://theses.hal.science/tel-04799501v1>

Submitted on 23 Nov 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637
Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : *Cancérologie*

Par

Cyrille BERRA

Unité de recherche : UMR CNRS 6290, Institut Génétique & Développement de Rennes (IGDR)

La ferroptose, une opportunité thérapeutique pour contrer la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 22 novembre 2023

Rapporteurs avant soutenance :

Laurence NIETO PU, Univ. Toulouse III, UMR 1037 INSERM CRCT
Sophie VAULONT DR, Institut Cochin, UMR Inserm U1016, CNRS UMR8104 et Univ. Paris Cité UMR-S 1016

Composition du Jury :

Président : Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL DR, UMR_S 1085 Inserm Irset, Univ. Rennes
Examineurs : Fabrice JOURNE DR, Service d'anatomie humaine et d'oncologie expérimentale, Univ. de Mons
Julien ABLAIN CR, U1052 INSERM, UMR5286 CNRS, Univ. Claude Bernard Lyon 1
Rapporteurs : Laurence NIETO PU, Univ. Toulouse III, UMR 1037 INSERM CRCT
Sophie VAULONT DR, Institut Cochin, UMR Inserm U1016, CNRS UMR8104 et Univ. Paris Cité UMR-S 1016
Dir. de thèse : Marie-Dominique GALIBERT PU-PH, Univ. Rennes, UMR6290 CNRS, CHU Pontchaillou
Co-dir. de thèse : Sébastien CORRE CR, UMR6290 CNRS, Univ. Rennes

Remerciements

Je remercie tout d'abord la FHU CAMIn pour avoir financé mes travaux de thèse.

Je remercie très chaleureusement Fabrice JOURNE, Julien ABLAIN, Laurence NIETO et Sophie VAULONT pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Je remercie également tout particulièrement Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL pour avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie bien évidemment mes directeurs de thèse, Sébastien CORRE et Marie-Dominique GALIBERT. Merci de m'avoir accueilli dans l'équipe GEO, merci pour vos conseils, merci d'avoir pris en compte mes opinions, et surtout merci pour votre bienveillance.

Je remercie également les autres membres de l'équipe GEO, et tout particulièrement Héloïse LECLAIR pour son implication et son importante participation pendant la majeure partie de ce projet. Son arrivée fut un véritable moteur et son expérience m'a beaucoup apporté.

Merci à mes compagnons de bureau : Yanis, Rose, Océane, Anaïs P et Maria pour la bonne ambiance que vous avez su maintenir et pour m'avoir supporté pendant ces années.

Merci aussi à Laura, le pilier de l'équipe, à qui je savais que je pouvais toujours poser une question, même que j'étais supposé déjà connaître la réponse. Merci aussi pour toutes nos discussions autour de la parentalité, ça m'a beaucoup aidé quand Zoé est arrivée dans ma vie.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Bernard FROMENTY, Xavier COUMOUL et Xavier LE GOFF, d'avoir su vous rendre disponibles pour chacune de nos sessions. Merci pour vos conseils avisés, qui m'ont clairement aidé dans l'évolution de ce projet.

Je voudrais également remercier Alexis AIME de la plateforme CytoméTRI (SFR Biosit) pour son aide, ses conseils et sa participation aux différentes expériences de cytométrie en flux. De la même façon je remercie Xavier PINSON, de la plateforme MRic (SFR Biosit) pour son aide précieuse au cours de mes expériences avec le SP5 et le Zeiss inversé.

J'adresse également mes remerciements à Claude BENDAVID, pour avoir accepté que je fasse réaliser les dosages biochimiques sur la plateforme de biochimie du CHU, et merci à Sylvie LEGLINEL d'avoir réalisé ces dosages malgré son emploi du temps chargé.

Pour finir, je voudrais remercier mes proches. En premier lieu ma compagne Charlotte, qui a supporté mon stress, ma fatigue et mes horaires de travail parfois chaotiques. Je la remercie du fond du cœur pour son soutien moral et pour sa présence dans les périodes de doute. Et je la remercie enfin pour la

petite Zoé que nous avons eue tous les deux pendant ces années de thèse (ça n'a pas été facile). Merci à mes amis, avec qui je pouvais fuir, le temps d'une soirée ou d'un weekend, mes responsabilités et mes angoisses et faire comme si j'avais toujours 17 ans. Merci enfin à ma mère, mon père, ma sœur et mon frère, pour être des points de repère si essentiels dans ma vie.

Merci à toutes et à tous.

Table des matières

.....	0
Table des figures.....	8
Liste des abréviations.....	9
Introduction.....	17
1. Généralités sur le mélanome	17
1. Peau et pigmentation.....	17
a) Anatomie et fonctions de la peau	17
b) Focus sur l'épiderme	17
c) Mélanocytes	18
d) Synthèse de mélanine	18
2. Le mélanome	19
a) Épidémiologie du mélanome cutané.....	20
b) Facteurs de risques de mélanome cutané	20
c) Classification clinique des mélanomes cutanés	21
3. Du naevus au mélanome.....	22
a) La Cascade de Signalisation des MAPK.....	22
b) Naevi.....	23
c) Nævus Dysplasique.....	24
d) Mélanome	24
4. Progression du mélanome.....	25
a) Mélanome in situ.....	25
b) Mélanome invasif	25
c) Mélanome métastatique.....	26
d) Stadification du mélanome	27
2. Prise en charge thérapeutique du mélanome cutané.....	28
1. Chirurgie	28
2. Radiothérapie.....	28
3. Thérapies systémiques	29
a) Chimiothérapies	29
b) Inhibiteurs d'immune-checkpoints	29
c) Les thérapies ciblées.....	31
3. La résistance aux thérapies ciblées	33
1. Les différents types de résistance aux thérapies ciblées	34

a)	Résistance primaire	35
b)	Résistance secondaire	37
(1)	Altérations de la voie des MAPK	37
(2)	Altérations de la voie PI3K-Akt-mTOR	38
c)	Réponse adaptative	39
(1)	Altérations de la voie YAP/TAZ	40
(2)	Voie des GTPases Rho	40
(3)	Voie RAC1/PAK/C-RAF	41
(4)	Surexpression des récepteurs tyrosine kinase	41
(5)	Modifications épigénétiques	41
(6)	Influence du microenvironnement tumoral	43
2.	Switch phénotypique et hétérogénéité tumorale	43
a)	Identification des différents états phénotypiques dans le mélanome	44
b)	Description des différents états phénotypiques dans le mélanome	45
(1)	État prolifératif (différencié/de type épithélial)	45
(2)	État intermédiaire	46
(3)	État invasif (indifférencié/mésenchymateux)	46
(4)	État semblable aux cellules souches de la crête neurale (NCSC)	46
(5)	État hyperdifférencié	46
c)	Rôle de MITF dans le switch phénotypique	47
d)	Facteurs régulant l'expression de MITF	48
(1)	Les conditions métaboliques du microenvironnement tumoral	48
(2)	Les cellules et le stroma du microenvironnement tumoral	49
e)	Switch phénotypique et acquisition de la résistance	50
f)	Rôle du facteur de transcription Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)	51
4.	Résistance et reprogrammation métabolique	52
1.	Généralités sur le métabolisme énergétique	52
2.	Métabolisme des cellules prolifératives	54
a)	Avantages de l'effet Warburg	55
(1)	Adaptation à l'hypoxie	55
(2)	Acidification du microenvironnement	56
(3)	Promotion de l'anabolisme	57
b)	Effet Warburg et glutaminolyse	58
c)	Drivers de l'effet Warburg dans le mélanome	58
(1)	Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)	59
(2)	Rôle ambigu de MITF	60

(3) Autres drivers	61
3. Métabolisme des cellules invasives.....	62
a) Plasticité métabolique des cellules de mélanome	62
b) Phosphorylation oxydative et β -Oxydation des acides gras.....	63
c) Phosphorylation oxydative et invasion	64
d) Phosphorylation oxydative et résistance adaptative	65
e) Mécanismes du switch métabolique des cellules résistantes.....	65
f) Phosphorylation oxydative et résistance acquise	66
5. Résistance et stress oxydant	67
1. Définition du stress oxydant.....	67
2. Corrélation entre résistance aux thérapies ciblées et stress oxydant	68
3. Rôles du stress oxydant dans la résistance aux thérapies ciblées	69
6. Résistance et ferroptose	70
1. Définition de la ferroptose	70
2. Mécanismes de la ferroptose	71
3. Régulation de la ferroptose.....	72
4. Résistance aux thérapies ciblées et sensibilité à la ferroptose	73
7. Synthèse	74
Contexte et objectifs du projet	76
Résultats	80
Figure 1	80
Figure 2	80
Figure 3	81
Figure 4	83
Figure 5	84
Article	85
Discussion	137
1. Résumé du contexte.....	137
2. Reprogrammation métabolique des cellules résistantes.....	137
3. Résistance aux BRAFi et sensibilité à a ferroptose.....	138
4. Implication du facteur de transcription AhR.....	141
5. Activation de AhR dans les cellules résistantes.....	143
6. Régulation de la balance AhR-MITF	144
7. La ferroptose comme cible thérapeutique.....	145
8. Conclusion	147
Bibliographie :.....	148

Table des figures

Figure 1 : Anatomie et Histologie de la peau	17
Figure 2 : Synthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine (tiré de Nasti et al, 2015)10.	19
Figure 3 : classification clinique des mélanomes cutanés (tirée de Scatena et al, 2021)	21
Figure 4 : Représentation schématique de la cascade d'activations de la voie des MAP kinases. ...	23
Figure 5 : Récapitulatif schématique des phases d'initiation et de progression du mélanome cutané (http://www.pathophys.org/melanoma/)	26
Figure 6 : représentation schématique du mode d'action des inhibiteurs d'immune-checkpoints (adaptée de Lipe et al, 2021).....	31
Figure 7 : Historique des principales thérapies du mélanome (tirée de Jenkins et al., 2020)44.	33
Figure 8 : Synthèse des principaux mécanismes de résistance primaire (« intrinsic »), secondaire (« acquired ») et adaptative (« adaptive ») aux thérapies ciblées dans le mélanome (tirée de McKenna et al., 2021)70.	35
Figure 9 : Maladie résiduelle au cours de la thérapie ciblée dans le mélanome (Adaptée de Rambow et al., 2021)90.....	39
Figure 10 : Schéma simplifié du switch phénotypique et de ses mécanismes de régulation au cours de l'acquisition de la résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome cutané117	45
Figure 11 : Influence du niveau d'expression/activité de MITF sur le phénotype des cellules de mélanome (tirée de Hartman et al., 2015)121.	48
Figure 12 : Diagramme schématique des voies de signalisation et conditions environnementales régulant positivement ou négativement l'expression de MITF (tirée de Goding et al., 2019)122 ...	48
Figure 13 : Différentes voies du métabolisme énergétique.....	53
Figure 14 : Effet Warburg et promotion de l'anabolisme	55
Figure 15 : Principaux mécanismes pilotant l'induction de l'effet Warburg dans les cellules de mélanome (tirée de Avagliano et al., 2020)143.....	59
Figure 16 : β -oxydation des acides gras et phosphorylation oxydative (OXPHOS)	64
Figure 17 : Les principaux ROS et leur mode de production (ROS : espèces réactives de l'oxygène ; SOD : superoxyde dismutase ; R : chaîne carbonée lipidique	68
Figure 18 : Le ferroptose et ses principaux mécanismes de régulation (Tf : transferrine ; Cys : cystine ; Glu : glutamate ; AA : acide arachidonique ; PUFA : acides gras polyinsaturés ; GSH/GS-SG : glutathion réduit/oxydé) (adaptée de Talty et Bosenberg, 2021)208	72
Figure 19 : Principales molécules chimiques inductrices de la ferroptose	73
Figure 20 : les 2 classes de ligands de AhR et les signatures transcriptionnelles associées	77
Figure 21 : Rôle de l'activation de AhR et de la kinase Src dans l'acquisition de la résistance aux BRAFi du mélanome (figure tirée de Paris et al., EMBO Mol Med, 2022)134.....	78

Liste des abréviations

2-DG	2-Deoxy-D-Glucose
ACSL4	Acyl-CoA Synthétase Long-Chain Family Member 4
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	Protein Kinase B
ALM	Acral Lentiginous Melanoma (Mélanome Acral Lentigineux)
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMPC	Adénosine Monophosphate Cyclique
AMPK	Protéine Kinase Activée par l'AMP
AP-1	Activator Protein 1
ARE	Éléments de Réponse Antioxydants
ARID1A	AT-Rich Interaction Domain 1A
ARID2	AT-Rich Interaction Domain 2
ARNm	ARN messenger
ASCT2	Échangeur d'Acides Aminés ASC Type 2
ATF4	Activating Transcription Factor 4 (Facteur de Transcription Activant 4)
ATG5	Autophagy Related 5, une protéine liée à l'autophagie
ATP	Adénosine Triphosphate
B7	molécules costimulatrice interagissant avec CTLA-4 et CD28 sur les lymphocytes T
BHLHB2 /DEC1 /BHLHE40	Basic Helix-Loop-Helix Domain Containing, Class B2/Differentially Expressed in Chondrocytes 1/Basic Helix-Loop-Helix Family, Member E40
BMI1	Une protéine impliquée dans la régulation de la voie de signalisation WNT- β -Caténine
BNIP3	BCL2/Adenovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3
BRAF	B-Raf proto-oncogène
BRAFi	Inhibiteurs de BRAF
BRN2	POU Class 3 Homeobox 2

CAF	Cancer-Associated Fibroblasts
CAV1	Caveoline 1
CCL	Cancer Cell Line Encyclopedia
CCND1	Cyclin D1
CD36	Cluster de Différenciation 36
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CH223191	Composé chimique inhibiteur de AhR
circARN	ARN circulaires
c-MYC	MYC Proto-Oncogene
CoQ10	Coenzyme Q10
CRAF	sérine/thréonine kinase, membre de la famille RAF
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein
CRISPR-Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR Associated Protein 9
CRISPR-SAM	CRISPR Synergistic Activation Mediator
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
CTNNB1	Catenin Beta 1 (β -caténine)
CTRP	Cancer Therapeutics Response Portal
DDR1/DDR2	Discoidin Domain Receptors 1 and 2
DFO	Déféroxamine
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
DRP1	Dynamin-Related Protein 1
EDNRB	Endothelin Receptor Type B
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF2 α	Eukaryotic Initiation Factor 2 α
EMT-like	Epithelial-Mesenchymal Transition-like
ENO1	Énolase 1
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2
ETBR	Endothelin B Receptor

EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FADH2	Flavin Adénine Dinucléotide (forme réduite)
FADS1	Fatty Acid Desaturase 1
FADS2	Fatty Acid Desaturase 2
FAK	Focal Adhesion Kinase
FASN	Fatty Acid Synthas
FCCP	Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone, un découplant de la chaîne respiratoire mitochondriale
FDA	Food and Drug Administration
Fe ²⁺	Fer Ferreux
FGF1	Fibroblast Growth Factor 1
FIN56	Inhibiteur de la ferroptose
FSP1	Ferroptosis Suppressor Protein 1
FTH1 et FTL	Chaines lourdes et légères de la ferritine, respectivement
GDH	Glutamate Déshydrogénase
GLS	Glutaminase
GLUT-1	Transporteur de Glucose Type 1
GPX4	Glutathion Peroxydase 4
GPXs	Glutathione Peroxidases
GSH	Glutathion Réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GSTs	Glutathione S-Transferase
H2-DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, un marqueur de ROS
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HDAC	Histone désacétylases
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor 1
HIF1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha

HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha
HIF-1 β	Hypoxia-Inducible Factor 1 Beta
HK2	Hexokinase 2
HMGA1	High Mobility Group AT-Hook 1
HO•	Radical Hydroxyle
IC50	Concentration inhibitrice 50 (Concentration d'une substance nécessaire pour inhiber une fonction biologique ou biochimique de 50 %)
IDO	Indoléamine 2,3-Dioxygénase
IKE	Inhibiteur de la ferroptose
IL-1	Interleukin 1
ISR	Integrated Stress Response
JARID1B	Jumonji, AT Rich Interactive Domain 1B
KD	Knock-Down
KO	Knock-Out
LDH	Lactate-Déshydrogénase
LMM	Lentigo Maligna Melanoma
LOX	Lipoxygénases
LPCAT3	Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3
MAGE11	Melanoma Antigen Family A, 11
MAP3K8/COT	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 8/COT
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKi	Inhibiteurs de la Protéine Kinase Activée par les Mitogènes
MC1R	Melanocortin-1 Receptor
MCT-1	Monocarboxylate Transporter 1
MCT-4	Monocarboxylate Transporter 4
MEK	MAP/ERK kinase
MEKi	Inhibiteurs de MEK
MET	Met Proto-Oncogene, un récepteur tyrosine kinase pour HGF
MFN1	Mitofusine 1

MFN2	Mitofusine 2
MITF	Microphthalmia-associated Transcription Factor
MitoSOX™	Marqueur fluorescent spécifique pour le superoxyde mitochondrial
ML162	Molécule inductrice de ferroptose
ML210	Molécule inductrice de ferroptose
MLANA	Melan-A, un marqueur de différenciation mélanocytaire
MMP-9	Matrix Metallopeptidase 9
MRD	Minimal Residual Disease
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MUP	Melanomas of Unknown Primary (Mélanomes de Primaire Inconnu)
NAD(P)H	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate) réduit
NAD+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée)
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme réduite)
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NCOA4	Nuclear Receptor Coactivator 4
NCSC	Cellules Souches de la Crête Neurale
NF1	Neurofibromin 1
NM	Nodular Melanoma
NRAS	N-ras proto-oncogene
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
O ₂ • ⁻	Anion Superoxyde
OPA1	Optic Atrophy 1
OXPPOS	Phosphorylation Oxydative
p16INK4	protéine agissant comme un inhibiteur du cycle cellulaire
PAKs	P21-activated kinases
PD-1	Programmed Death-1
PDH	Pyruvate Déshydrogénase
PDK	Pyruvate Déshydrogénase Kinase
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1

PDX	Patient-Derived Xenograft
PEP	Phosphoenolpyruvate
PGC1 α	Coactivateur 1 α du Récepteur Activé par les Proliférateurs de Peroxysome Gamma
PGC-1 α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha
PGK1	Phosphoglycerate Kinase 1
PHD2	Prolyl Hydroxylase Domain-containing Protein 2
PI3K-Akt-mTOR	Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B/mammalian Target of Rapamycin
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PINK1	PTEN Induced Kinase 1
PKM	Pyruvate Kinase Muscle
PKM2	Pyruvate Kinase M2
PLIN3	Perilipin 3
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PUFAs	Acides Gras Polyinsaturés
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rb	Rétinoblastome
RE	Réticulum Endoplasmique
RTK	Récepteurs tyrosine kinase
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RGP	Radial Growth Phase
RNS	Espèces Réactives de l'Azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RSL3	RAS-Selective Lethal N°3
RTqPCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
scRNAseq	Séquençage de l'ARN sur Cellule Unique (Single-Cell RNA Sequencing)
SIRT1	Sirtuin 1
SKR	cellules SKmel28 résistantes aux BRAFi
SKS	cellules SKmel28 sensibles aux BRAFi

SLC5A9	Sodium/Glucose Cotransporter 9
SLC7A11	Solute Carrier Family 7 Member 11
SMAD3	SMAD Family Member 3
SOD	Superoxyde Dismutase
SOX10	SRY-Box Transcription Factor 10
SRC	Proto-Oncogene tyrosine-protein kinase Src
SSM	Superficial Spreading Melanoma
SWI/SNF	Switch/Sucrose Non-Fermentable
TCA	Cycle de l'Acide Tricarboxylique (ou cycle de Krebs)
TDO	Tryptophane 2,3-Dioxygénase
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TFAM	Facteur de Transcription A, Mitochondrial
TFRC	Transferrin Receptor
TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
TN	Triple-Négatifs (mélanomes sans mutations dans les gènes BRAF, NRAS, ni NF1)
TNFα	Tumor Necrosis Factor Alpha
TNM	Tumor, Node, Metastasis (Tumeur, Ganglion, Métastase) - Système de classification pour le cancer
TP53	Tumor Protein p53
TRAP1	TNF Receptor-Associated Protein 1
TYRP1	Tyrosinase-Related Protein 1
TYRP2	Tyrosinase-Related Protein 2
UV	Ultraviolets
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGF-C	Vascular Endothelial Growth Factor-C
VGP	Vertical Growth Phase
WNT5A	Wnt Family Member 5A
WT	Wild Type (Type Sauvage, désignant la forme non mutée d'un gène)
Xc-	Système antiporteur cystine/glutamate

YAP	Yes-Associated Protei
YAP/TAZ	Yes-Associated Protein/Transcriptional Co-Activator with PDZ-Binding Motif
YAP-TAZ- TEAD	Yes-Associated Protein/Transcriptional Coactivator with PDZ-Binding Motif/TEA Domain Transcription Factor
α -MSH	alpha-melanocyte stimulating hormone
$\Delta\psi_m$	Potentiel de membrane mitochondrial

Introduction

1. Généralités sur le mélanome

1. Peau et pigmentation

a) Anatomie et fonctions de la peau

La peau fonctionne comme la première ligne de défense contre les agressions extérieures de nature physique, chimique, ou biologique. De plus, elle est intrinsèquement impliquée dans la régulation de la température corporelle au travers de processus tels que la sudation et la constriction/dilatation des vaisseaux sanguins. La structure de la peau se présente en trois couches distinctes, de la plus profonde à la plus superficielle : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (**Figure 1**).

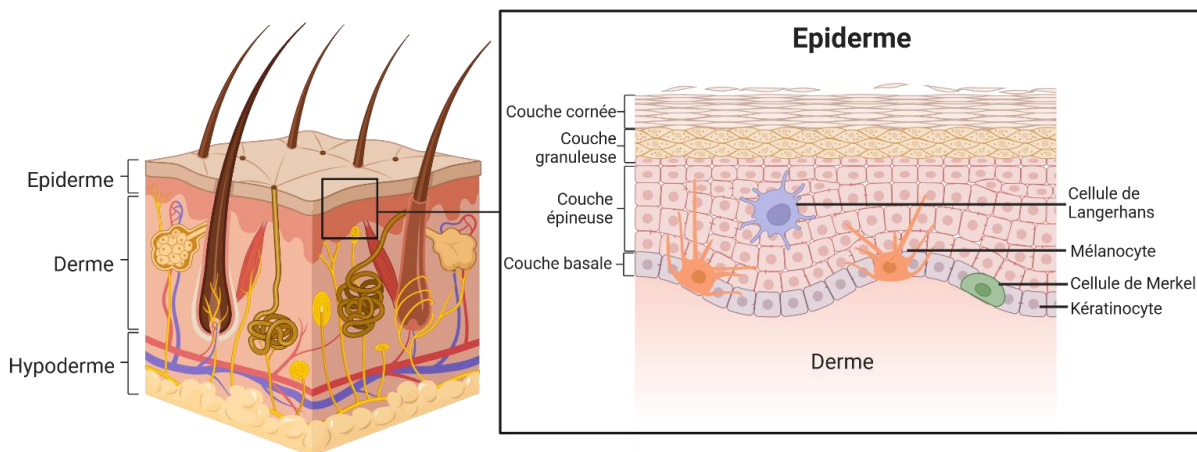


Figure 1 : Anatomie et Histologie de la peau

b) Focus sur l'épiderme

En tant que couche la plus externe et superficielle de la peau, l'épiderme est organisé en épithélium pavimenteux stratifié, contribuant significativement à sa fonction de protection cutanée. Il se compose de plusieurs types cellulaires, principalement les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans (cellules présentatrices d'antigènes professionnelles intégrées dans la peau et les muqueuses), ainsi que les cellules de Merkel (cellules nerveuses sensorielles spécifiquement sensibles à la pression) (**Figure 1**). L'épiderme est caractérisé par une subdivision en quatre couches : la lame basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (de la plus profonde à la plus superficielle). Le nom de chacune de ces couches correspond au degré de différenciation des kératinocytes, qui constituent approximativement 85% de la population cellulaire de l'épiderme. Les kératinocytes subissent un processus de différenciation en réponse à des facteurs environnementaux

divers, progressant des couches profondes vers la surface, où ils acquièrent les attributs des kératinocytes de la couche cornée (les cornéocytes). Ces derniers ont une durée de vie de 35 à 45 jours avant de se détacher de l'épiderme, nécessitant un renouvellement constant par des cellules provenant des couches sous-jacentes. La production de kératine, une protéine fibreuse caractéristique de la couche cornée, est leur fonction prédominante. Les kératinocytes, en formant un réseau cellulaire très dense (via des jonctions cellulaires adhérentes, des desmosomes et des hémidesmosomes), offrent également une protection contre les contraintes mécaniques. De plus, ils constituent une barrière contre les rayonnements ultraviolets du soleil et les lésions de l'ADN qui en découlent, par l'intermédiaire de la mélanine. Cette dernière est synthétisée par les mélanocytes, puis transférée vers les kératinocytes.

c) Mélanocytes

Les mélanocytes représentent 10 à 15 % des cellules de l'épiderme et se situent au niveau de la lame basale (**Figure 1**). Leur origine remonte aux cellules souches de la crête neurale, depuis laquelle ils migrent pendant la phase embryonnaire jusqu'à l'épiderme, où ils subissent un processus de différenciation¹. Ce processus de différenciation est marqué par l'expression du facteur de transcription Microphthalmia-associated Transcription Factor (*MITF*), reflet de l'engagement dans la lignée mélanocytaire². Les mélanocytes sont dotés de prolongements dendritiques qui s'insinuent entre les kératinocytes, facilitant une communication étroite entre ces deux types de cellules. Il est estimé qu'un mélanocyte est capable de communiquer avec 30 à 40 kératinocytes, constituant ce qu'on appelle une unité épidermique de mélanisation³. La principale fonction des mélanocytes est la synthèse de mélanine, un pigment responsable de la coloration de la peau et des cheveux. Une fois synthétisée, la mélanine est transférée aux kératinocytes où elle joue un rôle essentiel dans la protection contre les rayonnements ultraviolets (UV) en les absorbant ou en les dispersant⁴.

d) Synthèse de mélanine

Deux types de mélanine peuvent être synthétisés : l'eumélanine, un pigment brun qui exerce un effet photo protecteur, et la phéomélanine, un pigment orange dont l'action photo protectrice est plus faible⁵. Le rapport de synthèse entre ces deux pigments est à l'origine de la diversité des teintes de la peau, ainsi que du degré de protection contre les UV (**Figure 2**). Il est important de différencier la pigmentation constitutive, c'est-à-dire la coloration intrinsèque de la peau, et la pigmentation photo-induite, qui est une réponse à l'exposition aux radiations ultraviolettes. La synthèse de mélanine s'effectue dans les mélanosomes (eumélanosomes ou phéomélanosomes), des organites spécifiques des mélanocytes, faisant intervenir diverses enzymes et protéines structurales. Le mélanosome traverse quatre étapes de maturation, qui sont caractérisées par la quantité, la qualité, et la structure de la mélanine produite⁶ (**Figure 2**). Au fur et à mesure de leur maturation, les mélanosomes sont

transportés vers les dendrites en contact avec les kératinocytes. La mélanine mature est alors transférée aux kératinocytes, leur conférant une protection contre les radiations UV. En amont du processus, l'exposition des kératinocytes aux radiations UV déclenche une cascade de pigmentation. Les radiations, absorbées par les molécules d'ADN, engendrent la formation de photo produits⁷ et une réponse de stress cellulaire médiée par l'activation de la protéine p53. Lorsqu'elle est activée, la protéine p53 se lie notamment au promoteur du gène *POMC*, induisant la synthèse de alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH), qui, à son tour, se lie au récepteur MC1R (Melanocortin-1 Receptor), conduisant à l'activation de la voie de signalisation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et du facteur de transcription MITF⁸. Ce facteur de transcription, essentiel à la pigmentation, va ensuite réguler l'expression de diverses enzymes clés, telles que *Tyrosinase*, *TYRP1* et *TYRP2* (Dopachrome Tautomerase)⁹.

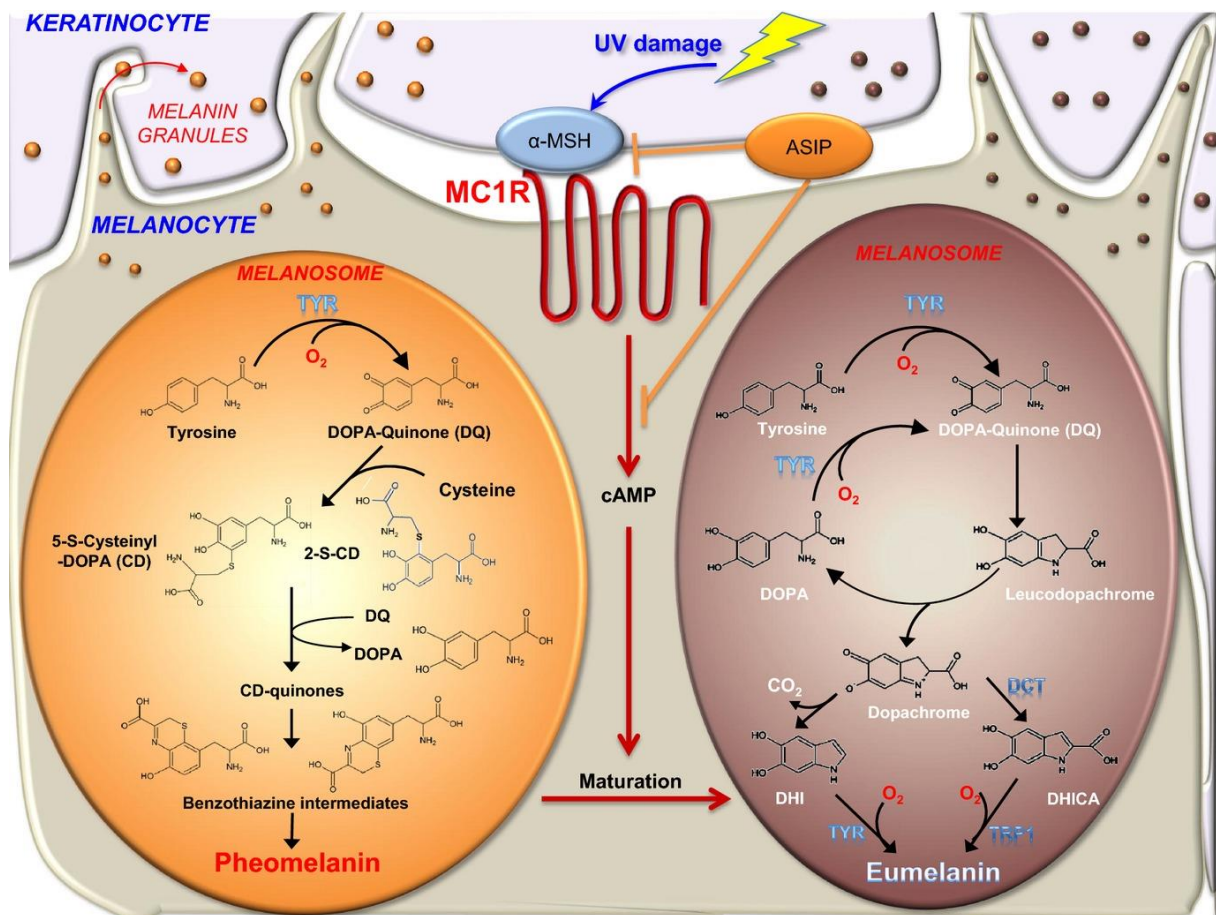


Figure 2 : Synthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine (tiré de Nasti et al, 2015)¹⁰.

2. Le mélanome

Le mélanome est une affection maligne, initiée par la transformation des mélanocytes en cellules cancéreuses. Il convient de noter que les mélanocytes ne se limitent pas à la peau, mais peuvent

également être observés dans l'uvéa de l'œil, les méninges, le système ano-génital, ou encore l'oreille interne. A chacune de ces localisations se forment des tumeurs présentant des spécificités cliniques, histologiques et génétiques¹¹. Cependant, ici ne seront abordés que les éléments relatifs au mélanome cutané, qui représente plus de 90% de l'ensemble des mélanomes¹².

a) Épidémiologie du mélanome cutané

Le mélanome cutané correspond à seulement 10% de l'ensemble des cancers de la peau, mais est responsable de 75% des décès liés aux cancers cutanés en phase métastatique¹³. Il est remarquable de noter que le mélanome figure parmi les cancers qui ont connu la plus forte augmentation d'incidence au cours des cinquante dernières années¹⁴. À titre d'exemple, en France, l'incidence du mélanome est passée de 4 nouveaux cas à 11,1 pour 100 000 personnes chez les femmes, et de 2,5 à 10,8 chez les hommes, entre 1980 et 2012 (www.e-cancer.fr). En 2018, le mélanome représente 15000 nouveaux diagnostics en France. En raison de cette incidence élevée, le mélanome demeure un enjeu majeur de santé publique. Alors que les formes précoces sont souvent associées à un pronostic favorable, les formes avancées présentent des taux de rémission extrêmement bas¹⁵. Il est par conséquent impératif de mettre en œuvre des stratégies de prévention efficaces, incluant des campagnes de sensibilisation et l'identification des facteurs de risque. Il est par conséquent impératif de mettre en œuvre des stratégies de prévention efficaces, incluant des campagnes de sensibilisation et l'identification des facteurs de risque.

b) Facteurs de risques de mélanome cutané

Des études scientifiques soutiennent que le développement du mélanome est multifactoriel, impliquant à la fois des facteurs génétiques et environnementaux. Concernant l'aspect environnemental, l'exposition aux rayonnements ultraviolets (UV) occupe une place prépondérante. Cette exposition provient majoritairement de la lumière solaire naturelle, surtout durant la petite enfance, mais également des sources artificielles telles que les cabines UV¹⁶. Les rayonnements UV induisent divers dommages à l'ADN, notamment des transitions C>T. Les mélanomes sont par conséquent des cancers qui présentent une charge mutationnelle particulièrement élevée¹⁷. Étonnamment, les altérations responsables du développement des mélanomes ne correspondent pas à celles d'une signature UV. Par ailleurs, la susceptibilité aux UV varie considérablement selon le phototype d'un individu, c'est-à-dire la couleur de sa peau, de ses yeux et de ses cheveux¹⁸. Le phototype est conditionné par le ratio de production de phéomélanine et d'eumélanine. De façon schématique, une concentration de phéomélanine plus élevée que celle d'eumélanine procure à un individu un phototype "peau claire, cheveux roux" associé à une photosensibilité (c'est-à-dire une sensibilité accrue aux effets néfastes des UV). Au contraire, une concentration d'eumélanine plus élevée que celle de phéomélanine procure un phototype "peau foncée, cheveux bruns" qui protège

d'avantage des UV. Par ailleurs, le nombre de nævi a également été corrélé au risque de développement de mélanome : une personne présentant plus de 100 nævi a un risque 7 fois supérieur de développer un mélanome comparativement à une personne en ayant moins de 15¹⁶. L'histopathologie des nævi constitue aussi un indicateur de risque : un nævus présentant certaines atypies est plus susceptible d'évoluer en une lésion maligne par rapport à un nævus commun. Enfin, il existe des altérations génétiques germinales qui sont associées à une prédisposition héréditaire au développement d'un mélanome. Ces formes familiales représentent près de 10% des diagnostiques¹⁹. L'altération causale la plus courante est située sur le gène Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*)^{16,20}. Il est estimé qu'entre 30 et 50% des individus porteurs d'une mutation germinale *CDKN2A* finiront par développer un mélanome avant l'âge de 80 ans²⁰.

c) Classification clinique des mélanomes cutanés

Chaque type de mélanome cutané se caractérise par une fréquence d'apparition et un degré d'agressivité distincts. On en identifie principalement quatre types²¹ : le mélanome à extension superficielle (SSM, Superficial Spreading Melanoma), le mélanome Lentigo Maligna (LMM), le mélanome nodulaire (NM), et le mélanome acral lentigineux (ALM, Acral Lentiginous Melanoma) (**Figure 3**). Les SSM sont les plus fréquents (entre 40% et 70% des mélanomes selon les études^{22,23}) et se manifestent principalement sur les régions cutanées exposées aux radiations UV de façon intermittente, telles que le tronc, ou les jambes. Ces mélanomes ont tendance à se manifester relativement tôt (en moyenne vers l'âge de 50 ans) et présentent une charge mutationnelle modérée.²²

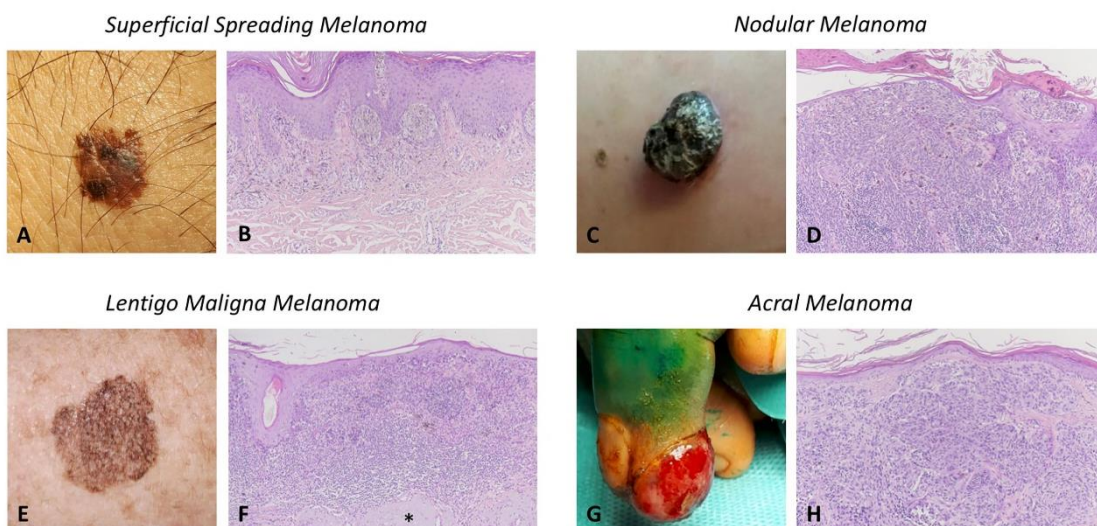


Figure 3 : classification clinique des mélanomes cutanés (tirée de Scatena et al, 2021)

3. Du naevus au mélanome

Les nævi, communément appelés grains de beauté, sont des tumeurs bénignes résultant d'une prolifération clonale localisée de mélanocytes. Ces lésions demeurent stables durant toute la vie de l'individu dans l'immense majorité des cas, et leur transition vers un mélanome est un évènement rare. Cependant leur prévalence élevée les rend malgré tout responsables d'une part considérable des mélanomes. Il est estimé qu'environ 30% sont le fruit de la transformation maligne d'un naevus préexistant, et 70% des mélanomes se développent de novo, c'est-à-dire sans lésion précurseur. Ces chiffres sont cependant encore controversés dans la communauté scientifique. En effet, selon certaines études les SSM, qui sont les mélanomes les plus fréquemment diagnostiqués, sont les plus fréquemment associés à ce processus de transformation maligne d'un naevus bénin²⁴. La proportion de mélanomes issus de nævi devrait donc, en théorie, être plus importante que ce qui est décrit par certains auteurs. Afin d'évaluer le risque de malignité associé à un nævus lors de l'examen clinique du patient, certains critères visuels, regroupés sous l'acronyme ABCDE, sont utilisés. Un naevus suspect présentera une Asymétrie (A), des Bords irréguliers (B), une Couleur hétérogène (C), un Diamètre excédant 6 mm (D), ou une Évolution de l'un de ces critères (E), justifiant alors une surveillance renforcée. La formation d'un naevus est induite par l'apparition d'altérations génétiques spécifiques dans le génome de certains mélanocytes, notamment sur des gènes impliqués dans la voie de signalisation Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK).

a) *La Cascade de Signalisation des MAPK*

Cette voie de signalisation, qui est altérée dans la grande majorité des nævi et dans près d'un tiers des cancers, régule la prolifération, la migration et la survie des cellules²⁵. Son activation commence par l'interaction entre un ligand extracellulaire (facteur de croissance, cytokine) et un récepteur transmembranaire doté d'une activité tyrosine kinase. Cette liaison va provoquer l'autophosphorylation du récepteur, qui déclenche à son tour la phosphorylation de diverses protéines kinases cytoplasmiques. Une fois phosphorylée, une première protéine acquiert la capacité de phosphoryler la suivante, qui peut alors phosphoryler la suivante, jusqu'à former une « cascade » de phosphorylations. Classiquement la séquence de phosphorylations de ces protéines est : RAS-RAF-MEK-ERK. L'activation finale de ERK conduit à sa translocation vers le noyau et l'activation de la transcription de ses gènes cibles, régulant entre autres les processus de prolifération et de survie (**Figure 4**).

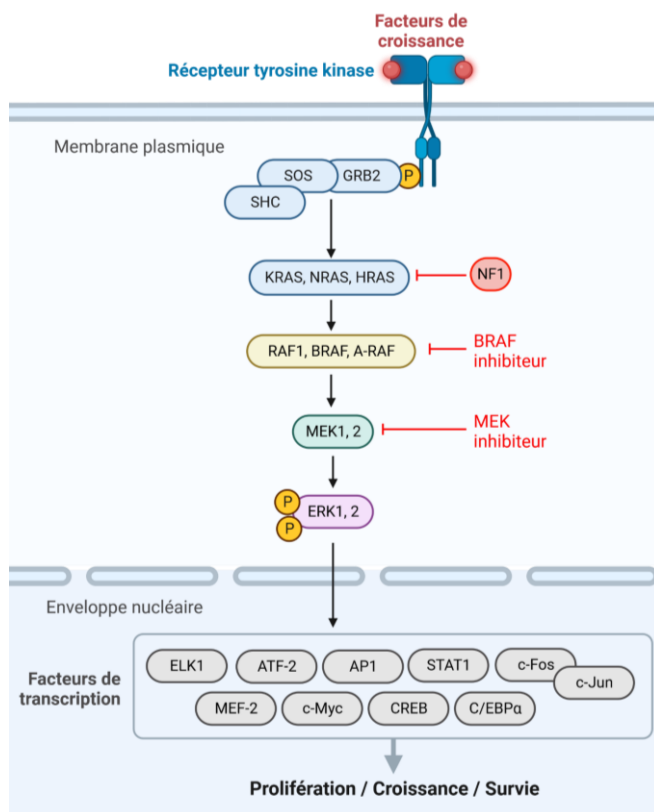


Figure 4 : Représentation schématique de la cascade d'activations de la voie des MAP kinases.

b) *Naevi*

Plusieurs catégories de nævi sont décrites : congénitaux, acquis, nævi bleus et nævi de Spitz²⁶. Cette partie se focalisera exclusivement sur les nævi acquis, de loin les plus courants. Ces derniers, absents à la naissance, apparaissent principalement pendant l'enfance et tendent à régresser après l'âge de soixante ans²⁷. Ils se manifestent sur des régions cutanées exposées aux rayonnements ultraviolets. Comme évoqué précédemment, le développement du naevus est provoqué par l'apparition d'altérations génétiques sur les gènes impliqués dans la voie des MAPK²⁸ (**Figure 4**). La plupart des nævi acquis (90%) sont caractérisés par une altération activatrice du gène *BRAF*^{29,30}, une kinase importante de cette voie. Cette altération conduit à la substitution d'une valine par un acide glutamique en position 600 de la protéine (*BRAF*^{V600E}). Cette même altération est observée dans près de 50% des mélanomes cutanés métastatiques^{17,31}. Certains nævi comportent une altération perte de fonction sur le gène *NF1* (15%), un inhibiteur de la voie des MAPK, et 15% ont une altération activatrice sur *NRAS*, une autre kinase de la voie des MAPK (**Figure 4**). L'existence de ces altérations dès le stade de nævus est révélatrice de leur caractère « driver », c'est-à-dire initiateur de la formation de la tumeur. Malgré leur capacité à déclencher l'expansion clonale d'un mélanocyte et la constitution d'un nævus, elles induisent également par la suite un arrêt systématique de la prolifération et le passage à un phénotype « senescence-like ». Ce phénotype est induit principalement par le raccourcissement

des télomères et s'accompagne de l'activation de la protéine suppresseur de tumeur p16INK4, un produit de l'expression du gène CDKN2A³². Cet état senescence-like est préservé par un équilibre entre les régulateurs du cycle cellulaire, l'absence d'élongation des télomères et le système immunitaire¹¹. Une altération graduelle de l'ensemble de ces voies permettra aux mélanocytes des nævi bénins de s'affranchir de cet état sénescence et d'amorcer une transformation cancéreuse. Ainsi, bien que les altérations drivers soient nécessaires, elles ne sont pas suffisantes pour le développement du mélanome, et l'accumulation d'altérations oncogéniques supplémentaires sera nécessaire.

c) *Nævus Dysplasique*

La définition de cette entité tumorale est encore controversée dans le monde scientifique³³. En fonction des auteurs, les nævi dysplasiques sont un stade plus avancé de la progression d'un nævus bénin, ou une lésion apparaissant spontanément, sans passer par le stade de nævus bénin. Ils peuvent se développer en nombre important dans le cadre d'un syndrome de prédisposition au mélanome (syndrome des nævi atypiques), ou de façon sporadique chez des individus sans prédisposition particulière. Dans tous les cas leur présence est associée à un risque accru de développer un mélanome, et ils sont donc souvent assimilés à un stade pré-cancéreux. Typiquement ils présentent un diamètre plus important que les nævi bénins (supérieur à 5mm) ainsi qu'une structure asymétrique, des bords irréguliers et une pigmentation hétérogène. Les altérations drivers inhérentes à un nævus bénin ne suffisent pas à impulser cette progression tumorale, la charge mutationnelle d'un nævus dysplasique est par conséquent supérieure à celle d'un nævus bénin³⁰. Cette charge mutationnelle inclut de nouvelles altérations oncogéniques qui poussent davantage les mélanocytes vers leur transformation maligne. Ces altérations, le plus souvent typiques d'une signature UV, octroient à la cellule la capacité de sortir de leur état senescence-like. Une altération fréquente est celle du promoteur du gène *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase), qui provoque la réexpression de ce gène et induit par conséquent une reprise de l'élongation des télomères. Un autre exemple classique d'altération oncogénique secondaire observée dans les nævi dysplasiques est celui de la délétion mono-allélique du gène *CDKN2A*. Ce gène code pour deux protéines suppresseurs de tumeur (p16INK4 et p14ARF), et la perte de cet allèle permet aux cellules d'échapper à la sénescence et de reprendre ses cycles de divisions cellulaires.

d) *Mélanome*

La poursuite du processus décrit ci-dessus par l'accumulation de nouvelles altérations génétiques finit par provoquer la transformation du nævus en mélanome *in situ*. Cependant cela ne concerne que 30% des mélanomes cutanés. En effet 70% des mélanomes diagnostiqués sont considérés de novo, c'est-à-dire développés spontanément sans lésion précurseur. Les mélanomes issus de nævi sont le plus souvent de type SSM³³ et comportent l'altération driver *BRAF* V600E (déjà présente au stade nævus).

Cette dernière est accompagnée d'altérations additionnelles de la voie des MAPK ainsi que des gènes *TERT* ou *CDKN2A*^{17,23,33}. Les mélanomes issus de nævi surviennent principalement entre 40 et 60 ans, et ne présentent pas de dommages chroniques liés aux UV³³. Les mélanomes *de novo*, quant à eux, sont classiquement *BRAF* non mutés, surviennent chez des patients âgés et montrent des signes histologiques de dommages chroniques aux UV (élastose solaire).

4. Progression du mélanome

Les différents stades de progression du mélanome sont caractérisés par l'accumulation d'un certain nombre d'altérations génétiques dans le génome des cellules pré-tumorales et tumorales. Par conséquent, au stade métastatique, le plus avancé de la maladie, le mélanome cutané possède une charge mutationnelle importante³⁴. Il convient de différencier les altérations initiatrices, dites « driver », qui confèrent un avantage sélectif majeur en termes de prolifération, des altérations « passager », qui s'accumulent de façon aléatoire sans procurer d'avantage sélectif à la cellule.

a) Mélanome *in situ*

Le mélanome *in situ* correspond au stade le plus précoce du développement et de la progression du mélanome. La tumeur est confinée au sein de l'épiderme et effectue une croissance radiale (Radial Growth Phase, RGP)³⁵ (**Figure 5**), c'est-à-dire purement superficielle et insuffisante pour envahir le derme sous-jacent. Comme abordé dans la partie précédente, un mélanome *in situ* peut être issu de la transformation maligne d'un naevus bénin ou d'un naevus dysplasique préexistant (entre 20% et 50% en fonction des études²⁴), ou se développer *de novo* sans lésion précurseur. Ce stade peut durer plus ou moins longtemps en fonction du type de mélanome³³. Les mélanomes de type SSM, une catégorie de mélanomes ayant une exposition UV modérée, peuvent persister *in situ* pendant des mois voire des années. A l'inverse, les mélanomes de type nodulaire (NM), qui sont décrits comme associés à une exposition UV chronique importante, amorcent d'emblée une croissance de type verticale et ne demeurent au stade *in situ* que très peu de temps avant d'envahir le derme²². Au stade *in situ*, une simple chirurgie permet l'excision totale du mélanome et un taux de survie des patients avoisinant 100%. Si aucune excision n'est effectuée, cette croissance se poursuit, et s'accompagne de l'accumulation de nouveaux dommages génétiques qui favoriseront une transition vers un état invasif.

b) Mélanome invasif

Au stade invasif, la tumeur entame une croissance verticale (Vertical Growth Phase, VGP) (**Figure 5**), correspondant à l'émergence d'une masse tumorale se développant à la surface mais également en profondeur au sein de l'épiderme. La profondeur de la lésion au sein du derme est un indicateur du risque de métastase³⁶. Les altérations oncogéniques qui se sont accumulées avant le stade invasif permettent de classer les mélanomes en quatre sous-catégories : mutés *BRAF* (52%, principalement V600E mais aussi V600K), *NRAS* (28%), *NF1* (14%) ou triple-négatifs (TN, 10%). Une signature UV

(transition C>T) est mise en évidence dans près de 90% des mélanomes mutés pour *BRAF*, *NRAS* ou *NF1*. À contrario, les mélanomes TN exhibent une charge mutationnelle significativement réduite mais présentent davantage de variations dans le nombre de copies de gènes¹⁷. Ces altérations acquises au stade de naevus ou de mélanome *in situ* ne suffisent pas pour initier le passage au stade invasif. L'émergence de nouvelles altérations oncogéniques au sein de certains sous-clones de mélanocytes tumoraux est nécessaire. L'exemple le plus classique est celui de la perte bi-allélique de *CDKN2A* (altération perte de fonction et/ou délétion), retrouvée dans environ 60% des mélanomes invasifs, et qui n'est pas présente aux stades précédents^{17,33,37}. Un autre exemple bien documenté est celui des gènes du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, en particulier *ARID2* et *ARID1A*, considéré par certains auteurs comme un gardien de l'intégrité génomique. Les altérations survenant au niveau des gènes de ce complexe provoquent ainsi l'apparition d'un grand nombre d'aberrations chromosomiques qui favorisent probablement l'émergence d'un phénotype invasif³³. Enfin, à un stade tardif de la progression des mélanomes invasifs émergent de nouvelles altérations spécifiques, principalement au niveau des gènes suppresseurs de tumeur *TP53* et *PTEN*^{17,33}.

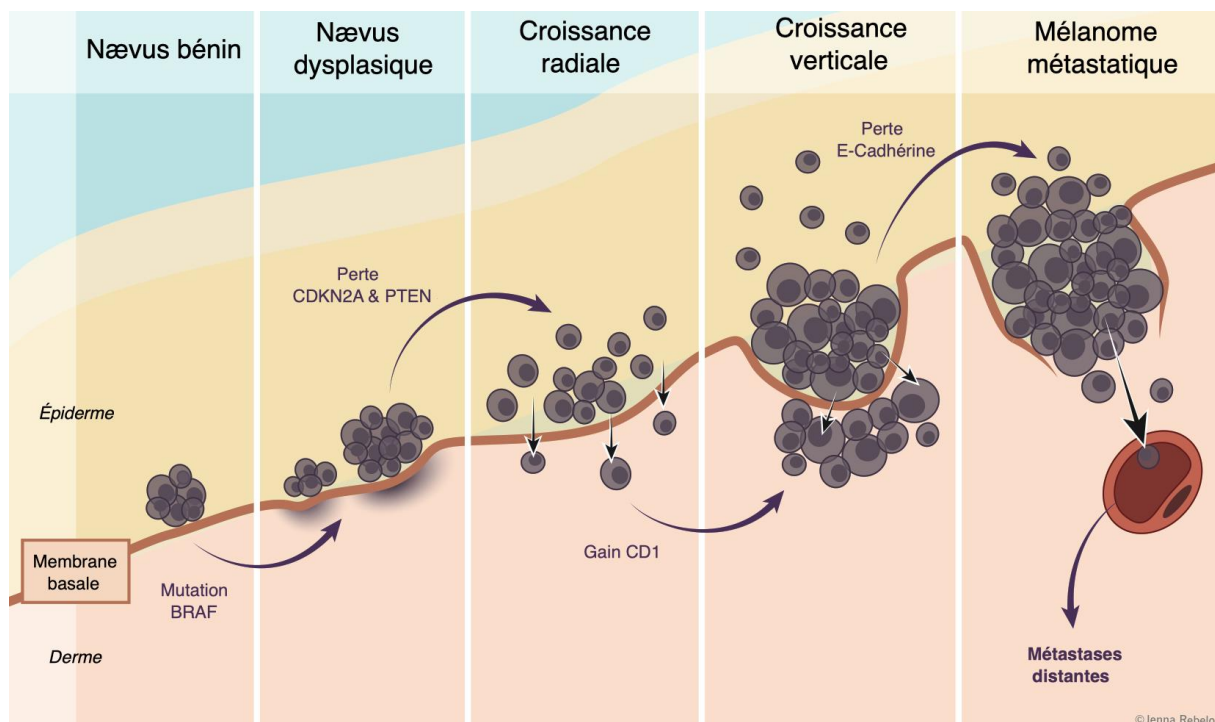


Figure 5 : Récapitulatif schématique des phases d'initiation et de progression du mélanome cutané (<http://www.pathophys.org/melanoma/>)

c) Mélanome métastatique

Les mélanomes sont qualifiés de métastatiques lorsque leurs cellules se disséminent à partir du site de la tumeur primaire et colonisent d'autres tissus ou organes. Le risque de métastases est corrélé à la profondeur de l'invasion et de l'ulcération de la lésion primaire²³. Les différentes étapes du processus

cellulaire menant à la formation de métastases dans le cancer ont été bien définies et se déroulent comme suit : invasion, angiogenèse, extravasation, dissémination et enfin colonisation des organes cibles. Afin d'effectuer ces différentes étapes à partir du site primaire, les cellules de mélanomes doivent acquérir des capacités de migration et d'invasion. Bien que n'étant pas épithéliales, les cellules de mélanomes changent leur phénotype par un processus similaire à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMTlike)^{38,39}.

Comme pour de nombreuses tumeurs solides, les métastases du mélanome se développent principalement dans les ganglions lymphatiques de la zone de drainage de la tumeur primaire, ainsi que dans des sites plus distaux, principalement les poumons, le cerveau, les os et d'autres régions de la peau. Il est intéressant de noter qu'environ 4 % des mélanomes sont diagnostiqués sans tumeur primaire détectable^{22,33}. Ces derniers sont appelés « melanomas of unknown primary » (MUP). Deux tiers des MUP apparaissent dans les ganglions lymphatiques, les autres dans les sites viscéraux. Les MUP présentent un nombre élevé d'altérations, dont une part importante correspond à une signature UV, ce qui suggère qu'ils proviennent de mélanocytes très exposés au soleil⁴⁰. Ils peuvent provenir de mélanomes primaires qui ont régressé spontanément, ou encore de mélanocytes ayant métastasé à partir de naevi bénins et acquis les altérations génétiques nécessaires à une transformation maligne sur le site métastatique. Les métastases de mélanome présentent une capacité proliférative accrue, un plus grand potentiel de colonisation des tissus et d'échappement au système immunitaire en raison d'altérations génétiques supplémentaires. Cependant, aucune altération génétique spécifique des cellules métastatiques n'a pu être clairement identifiée à ce jour. Bien que les variations du nombre de copies, l'amplification de *MITF*, les altérations du promoteur de *TERT* et la perte bi-allélique de *CDKN2A* soient plus fréquentes dans les mélanomes métastatiques que dans les mélanomes primaires, elles surviennent le plus souvent à un stade plus précoce²³. Des données d'exomes issues de cohortes de tumeurs primaires et métastatiques appariées n'a pas permis d'identifier d'altérations récurrentes spécifiques aux métastases⁴¹. Il existe néanmoins certains éléments de preuves impliquant l'activation de la signalisation WNT par le biais d'altérations activatrices du gène *CTNNB1* (β -caténine)⁴². Malgré cela les connaissances actuelles sont insuffisantes pour établir un modèle concluant d'altérations récurrentes associées à la progression métastatique.

d) *Stadification du mélanome*

Une fois le diagnostic de mélanome établi par analyse anatomopathologique du tissu tumoral, la tumeur est classée sur des critères cliniques et radiologiques selon le système TNM, où T fait référence à la tumeur, N aux ganglions lymphatiques (Node en anglais) et M aux métastases. Ce système est établi par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC). La classification TNM se subdivise en quatre stades distincts, de I à IV, qui correspondent à différents degrés d'avancement de la lésion maligne³⁶.

En résumé, pour les stades I et II, la tumeur demeure localisée mais s'ulcère progressivement. Au stade III, des métastases sont identifiées initialement au niveau du ganglion lymphatique le plus proche, communément appelé ganglion sentinelle. Enfin, au stade IV, les métastases se propagent à des sites éloignés. Il est également important de mentionner le modèle de Clark, qui établit une classification en cinq stades de progression, allant du nævus bénin au mélanome métastatique. Ce modèle est intrinsèquement lié à l'indice de Breslow, qui mesure la profondeur de la lésion. L'indice de Breslow est un facteur pronostique crucial, permettant d'évaluer la survie à cinq ans selon l'épaisseur de la lésion.

2. Prise en charge thérapeutique du mélanome cutané

1. Chirurgie

La chirurgie est le traitement de première intention du mélanome primaire (non métastatique). Elle implique l'excision chirurgicale de la tumeur avec une marge de tissu sain bordant la zone tumorale. La largeur de la marge dépend de l'épaisseur de la tumeur, de sa localisation et d'autres facteurs. Si des métastases ganglionnaires sont détectées cliniquement ou par des techniques d'imagerie, un curage ganglionnaire peut être effectué à la suite de l'excision. Il s'agit d'enlever chirurgicalement les ganglions lymphatiques envahis afin d'enrayer la propagation du cancer⁴³. La chirurgie peut également être utilisée pour traiter les métastases satellites et/ou en transit (c'est-à-dire situées à environ 2 cm de la tumeur primaire). Dans ce cas de figure le geste chirurgical peut être complétée par la cryothérapie, la thérapie au laser, l'électro chimiothérapie ou la radiothérapie⁴³.

2. Radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser une certaine quantité de rayonnements ionisants de façon localisée pour détruire les cellules cancéreuses dans une région bien délimitée. Elle peut être utilisée dans un but curatif (ablatif), c'est-à-dire pour détruire une tumeur ou un ensemble de tumeurs. Cette approche est surtout utilisée pour traiter les métastases à distance, notamment celles situées au niveau cérébral et osseux. Elle n'est pas utilisée pour la tumeur primaire, excepté pour les patients âgés ou fragiles, ou lorsque la chirurgie risque d'entraîner une mutilation grave.

La radiothérapie peut également être utilisée de façon adjuvante, en complément de la chirurgie, afin d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles qui peuvent persister après l'opération. Cette approche a été évaluée pour les ganglions lymphatiques après l'excision du mélanome primaire. Elle permet d'améliorer le contrôle locorégional mais n'a pas d'impact sur la survie globale⁴³.

3. Thérapies systémiques

a) Chimiothérapies

Le traitement thérapeutique du mélanome métastatique a largement progressé ces dernières années⁴⁴ (**Figure 7**). La chimiothérapie, dont le mode d'action principale est de détruire les cellules qui se divisent rapidement, a longtemps été le pilier du traitement du mélanome. L'une des premières chimiothérapies utilisées dans le traitement du mélanome a été la dacarbazine (**Figure 7**), approuvée par la FDA en 1975. Il s'agit d'un agent alkylant qui endommage l'ADN en introduisant des groupes alkyles sur les bases guanine, entraînant la mort cellulaire par apoptose. Cependant, la dacarbazine n'a donné qu'un taux de réponse modeste de 10 à 20 % et n'a pas montré d'amélioration significative des taux de survie globale⁴⁵. Le témozolomide, un analogue de la dacarbazine, a montré une efficacité similaire et présentait l'avantage supplémentaire d'être administré par voie orale⁴⁶. La dacarbazine et le témozolomide sont tous deux capables de traverser la barrière hémato-encéphalique, ce qui les rend particulièrement utiles dans le traitement des métastases cérébrales⁴⁷.

Les nitroso-urées, qui comprennent la fotémustine, la carmustine et la lomustine, constituent une autre classe d'agents alkylants actifs dans le mélanome. Bien qu'elle n'ait pas été approuvée par la FDA pour le mélanome, la fotémustine a été approuvée en Europe. L'efficacité des nitrosourées est comparable à celle de la dacarbazine et du témozolomide, mais leur utilisation est quelque peu limitée en raison de leur profil d'effets secondaires sévères, qui comprend une aplasie médullaire et des troubles gastro-intestinaux⁴⁸.

b) Inhibiteurs d'immune-checkpoints

Les immune-checkpoints (ou points de contrôle immunitaires) sont des protéines dont le rôle principal est le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. Ils peuvent avoir un effet activateur ou inhibiteur. Dans des conditions physiologiques, les immune-checkpoints de type inhibiteurs favorisent l'immunotolérance au soi et sont ainsi essentiels à la prévention des réactions auto-immunes et à la protection des tissus contre les dommages causés par une réponse immunitaire⁴⁴. Ils garantissent que le système immunitaire réponde de manière appropriée aux menaces sans attaquer de façon délétère les propres tissus de l'organisme. Leur fonctionnement repose classiquement sur un modèle récepteur/ligand. Les deux plus connus et étudiés à ce jour sont PD-1 et CTLA-4, ainsi que leur ligand respectif PD-L1 et B7 (**Figure 6**).

Dans le cadre du cancer, les lymphocytes T infiltrant le tissu tumoral entrent en contact physique avec diverses cellules, notamment les cellules cancéreuses et les cellules présentatrices d'antigènes. Ce contact permet l'interaction entre les immune-checkpoints situés à la surface des lymphocytes T et leurs ligands exprimés, quant à eux, à la surface des autres cellules. Dans le cas de PD-1, son interaction

avec ses ligands PDL-1 et PDL-2, exprimés par les cellules tumorales, provoque un « épuisement » des lymphocytes T, qui perdent alors leur activité cytotoxique et donc leur capacité à combattre efficacement les cellules tumorales⁴⁹. CTLA-4, quant à lui, agit dans les premiers stades de l'activation des lymphocytes T en se liant au ligand B7 situé sur les cellules présentatrices d'antigènes, limitant ainsi leur activation (**Figure 6**). Ces mécanismes, bien que naturellement destinés à limiter les lésions tissulaires au cours de l'inflammation, sont exploités par les cellules tumorales pour échapper au système immunitaire. Par conséquent, l'inhibition de ces immune-checkpoints permet de restaurer, au moins en partie, l'activité antitumorale du système immunitaire. En 2010, l'ipilimumab, un anticorps qui cible CTLA-4, a été le premier à montrer un bénéfice en termes de survie dans le mélanome métastatique⁵⁰ (**Figure 7**). En 2014, le nivolumab et le pembrolizumab, deux anticorps ciblant PD-1, ont également montré des résultats satisfaisants pour le traitement du mélanome non résecable⁵¹. Une étude sur le plus long terme a ensuite montré que le pembrolizumab procure une survie sans progression (PFS) et une survie globale (OS) plus longues et est associé à un taux de réponse significativement plus importants que l'ipilimumab. Enfin, des essais ont montré que la combinaison ipilimumab-nivolumab améliore le taux de réponse et la survie globale par rapport à l'ipilimumab ou au nivolumab en monothérapie^{52,53} (**Figure 7**). Cependant, >50% des patients ont également présenté une toxicité significative de cette bithérapie, ce qui représente une contrainte majeure à l'utilisation des inhibiteurs d'immune checkpoints de façon générale. L'apparition de ces effets indésirables, liés à l'induction d'une réaction auto-immune, est variable et imprévisible, mais survient le plus souvent pendant la phase d'induction⁵³. Une autre contrainte des inhibiteurs d'immune checkpoints est l'absence de biomarqueur fiable à ce jour, permettant de prédire la réponse d'un patient donné. Malgré ces écueils, les inhibiteurs d'immune checkpoints ont aujourd'hui l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement curatif en 1^{ère} ligne de tous les mélanomes stade III inopérables et stade IV, indépendamment de leur statut *BRAF*, soit par anti-PD1 seul, soit par combinaison ipilimumab-nivolumab⁵⁴.

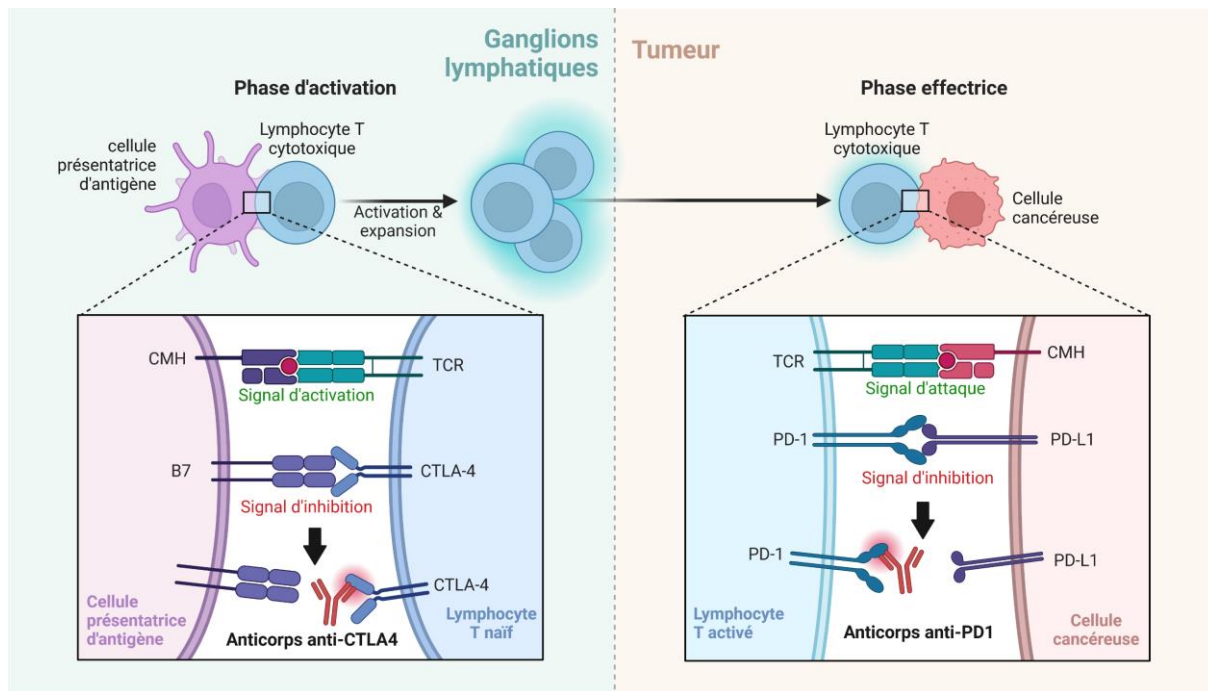


Figure 6 : représentation schématique du mode d'action des inhibiteurs d'immune-checkpoints (adaptée de Lipe et al, 2021).

c) Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont apparues comme une avancée majeure dans le traitement du mélanome métastatique, en apportant des réponses spectaculaires et des effets indésirables minimes en comparaison des chimiothérapies conventionnelles jusque-là utilisées par les praticiens. Le principe de fonctionnement des thérapies ciblées, qui explique une telle efficacité et une telle spécificité d'action antitumorale, est l'inhibition sélective des protéines ou des voies de signalisation activées de façon aberrante dans les cellules cancéreuses. Comme abordé précédemment, près de la moitié des mélanomes invasifs présentent l'altération oncogénique driver *BRAF* V600E, qui induit une activation constitutive de la voie de signalisation des MAPK. Cette altération, en combinaison avec d'autres altérations oncogéniques, permet à la cellule de proliférer et de survivre tout en ignorant les signaux qui tendent à freiner leur prolifération et à induire leur mort cellulaire. Par la même occasion, la cellule cancéreuse devient également dépendante de cette altération pour le maintien de son phénotype, ce qui constitue donc une vulnérabilité. En effet, il devient ainsi possible d'exploiter cette dépendance par le biais d'inhibiteurs spécifiques de la protéine BRAF mutée (**Figure 4**), pour induire la mort sélective des cellules de mélanome, tout en épargnant les cellules normales qui ne dépendent pas de cette voie.

En 2012, le vemurafenib, le premier inhibiteur de BRAF (BRAFi), a reçu l'AMM en 1^{ère} ligne de traitement du mélanome non résecable ou métastatique porteur d'une altération *BRAF* V600 (**Figure 7**). Une étude randomisée ouverte avait évalué son efficacité comparativement à la chimiothérapie

conventionnelle (dacarbazine), et avait montré un gain de la survie globale de 3,6 mois et un taux de réponse presque 9 fois plus important⁵⁵. En 2014, c'est au tour du dabrafenib, un BRAFi plus spécifique de BRAF V600 que le vemurafenib, d'obtenir l'AMM dans cette même indication. L'étude randomisée ouverte qui l'avait comparé à la chimiothérapie n'avait pourtant pas objectivé d'amélioration de la survie globale⁵⁶.

En effet, l'acquisition d'une résistance secondaire aux BRAFi en monothérapie est fréquente après une survie médiane sans progression de 6 à 7 mois⁵⁷. Divers mécanismes ont été décrits pour expliquer cette résistance acquise, et seront détaillés plus tard dans une autre partie. Par ailleurs, malgré une toxicité plus faible que les chimiothérapies conventionnelles, les BRAFi peuvent provoquer des effets indésirables chez certains patients, comme des éruptions cutanées, des douleurs articulaires, une photosensibilité accrue pour le vemurafenib et de la fièvre dans le cas du dabrafenib. Mais des effets indésirables plus graves, spécifiques de cette famille de molécules, ont également été rapportés. En effet, de nombreuses études ont montré que ces traitements peuvent induire l'apparition de tumeurs cutanées bénignes et malignes (papillomes, kératoacanthomes, carcinomes épidermoïdes principalement), ou encore favoriser la progression de tumeurs préexistantes par le biais d'une activation paradoxale de la voie MAPK. Ce phénomène, qui survient chez 14 à 26% des patients traités⁵⁸, est médié par l'hétérodimérisation de BRAF avec une kinase paralogue appelée CRAF⁵⁹, uniquement dans des cellules *BRAF* WT qui comportent une altération oncogénique sur l'un des autres gènes de la voie des MAPK, comme *KRAS*, *NRAS* ou *NF1*⁶⁰.

Dans le but de réduire l'incidence de ces effets indésirables, et de ralentir l'acquisition d'une résistance aux thérapies ciblées, des combinaisons d'inhibiteurs de BRAF et de MEK, une autre kinase située en aval de la voie MAPK, ont ensuite été évaluées. En 2012, l'inhibiteur de MEK (MEKi), nommé tramétinib, avait déjà montré une efficacité clinique en monothérapie supérieure à la chimiothérapie dans les mélanomes mutés *BRAF*⁶¹ (**Figure 7**). Très peu de temps après, le 1^{er} essai de phase II à évaluer l'efficacité du dabrafenib combiné au tramétinib par rapport au dabrafenib seul a permis une amélioration de la survie globale (9,4 mois vs 5,8 mois) et du taux de réponse globale (76% vs 54%), ainsi qu'une réduction importante de la survenue d'effets indésirables liés à l'activation paradoxale de la voie MAPK (exemple : apparition secondaire de carcinomes épidermoïdes cutanés = 7% vs 19%)⁶¹. D'autres essais montreront par la suite des résultats similaires⁶²⁻⁶⁵. Ainsi, en 2015 le dabrafenib obtient une extension d'indication en association au tramétinib dans le traitement du mélanome non résecable ou métastatique porteur d'une mutation *BRAF* V600⁶⁶. Par la suite, c'est au tour du vemurafenib d'obtenir l'AMM en combinaison avec un autre puissant MEKi, nommé cobimétinib⁶⁷ (**Figure 7**). Cette autorisation a été octroyée sur la base d'un essai de phase III qui avait montré des résultats comparables à celui du dabrafenib/tramétinib⁵⁷. Enfin, l'encorafenib, un BRAFi de seconde

génération, utilisé en combinaison avec un nouveau MEKi appelé binimetinib, obtient l'AMM en 2018 (**Figure 7**). L'encorafenib présente une meilleure efficacité de liaison avec la protéine BRAF mutée, ce qui favorise une inhibition prolongée de son activité et une réduction de la dose administrée⁶⁸. La méta-analyse de 4 essais de phase III montre que cette combinaison, bien qu'efficace, est associée à une survie globale et un taux de réponse global relativement comparables aux autres combinaisons BRAFi/MEKi⁴³. En revanche, une autre méta-analyse conclut à la supériorité de la combinaison encorafenib/binimetinib en termes de survie globale, de réponse globale, et de réduction des effets indésirables⁶⁹.

Pour conclure sur cette partie, l'avènement des immunothérapies et des thérapies ciblées a apporté une telle amélioration dans le traitement des patients atteints d'un mélanome métastatique, que la chimiothérapie conventionnelle s'est rapidement effacée de la pratique clinique courante, pour laisser place à ces nouvelles molécules comme traitements de référence.

FDA APPROVALS

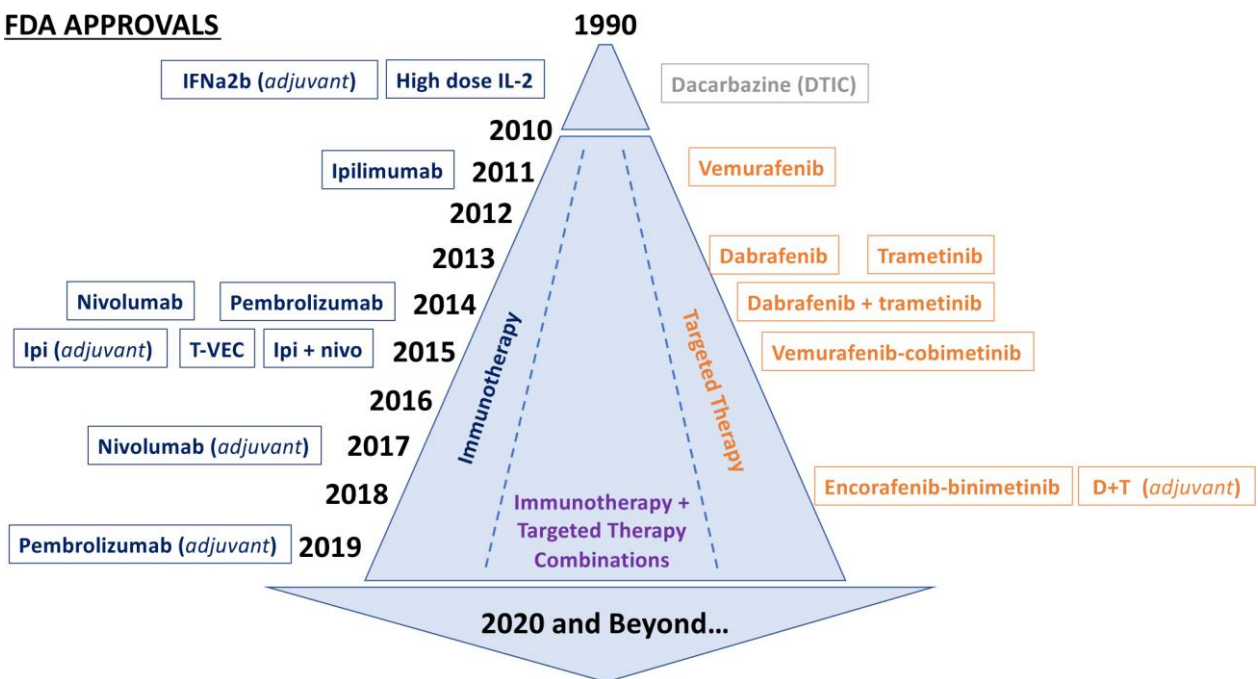


Figure 7 : Historique des principales thérapies du mélanome (tirée de Jenkins et al., 2020)⁴⁴.

Nota Bene : les dates correspondent aux autorisations de la FDA aux USA, et non à celles de l'ANSM en France

3. La résistance aux thérapies ciblées

Malgré l'avancée majeure que constitue la thérapie ciblée par combinaison BRAFi/MEKi en termes d'amélioration de la durée et de la qualité de vie des patients atteints d'un mélanome muté *BRAF*, le développement d'une résistance quasi-systématique demeure un obstacle majeur pour leur traitement. La compréhension des mécanismes à l'origine de cette résistance est cruciale pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces. Ces mécanismes peuvent être

classés en fonction de différents critères, comme le délai d'apparition de la résistance (résistance primaire ou secondaire), leur caractère génétique ou non génétique, ou encore du type de modification phénotypique qu'ils induisent pour permettre aux cellules tumorales d'échapper à la thérapie.

1. Les différents types de résistance aux thérapies ciblées

La principale difficulté rencontrée dans l'étude de la résistance aux thérapies ciblées dans les mélanomes, est l'impressionnante diversité des mécanismes identifiés à ce jour. Certains sont intrinsèquement présents dans la cellule tumorale initiale (résistance primaire ou intrinsèque) (**Figure 8**), tandis que d'autres sont acquis au cours du traitement (résistance secondaire ou acquise). Ils peuvent aboutir à la réactivation de la voie MAPK ou bien à l'activation de voies oncogéniques alternatives. La résistance peut être médiée par les cellules tumorales elles-mêmes, ou bien par le biais du microenvironnement tumoral. Elle peut être le fruit de modifications génétiques, épigénétiques, post-transcriptionnelles, voire post-traductionnelles. La multitude de modes d'action rend ainsi leur classification très complexe. Cette partie va donc tenter de synthétiser les mécanismes connus en fonction de critères communs, tels que leur caractère génétique ou non-génétique, ou encore le type de voie sur laquelle ils agissent, afin de mieux appréhender cette complexité.

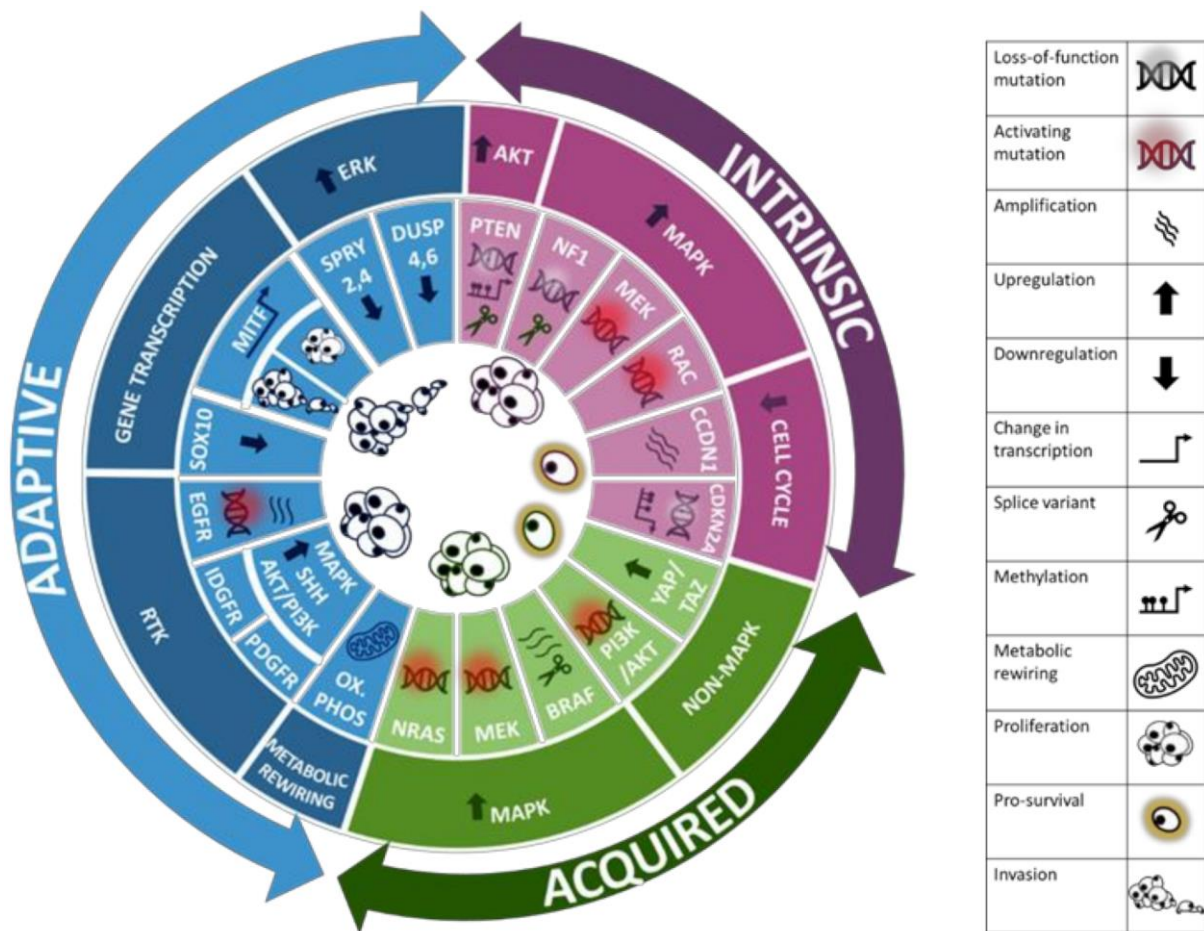


Figure 8 : Synthèse des principaux mécanismes de résistance primaire (« intrinsic »), secondaire (« acquired ») et adaptative (« adaptive ») aux thérapies ciblées dans le mélanome (tirée de McKenna et al., 2021)⁷⁰.

a) *Résistance primaire*

La résistance « primaire », aussi appelée résistance « intrinsèque », se caractérise par l'absence de signe de régression au cours du traitement initial. Cette forme de résistance peut se traduire par une progression de la maladie avec absence totale de réponse, qu'elle soit complète ou partielle, comme définit par les « Response Evaluation Criteria in Solid Tumors » (RECIST). Elle peut également se traduire par une simple stabilisation de la maladie, dont la progression se retrouve donc ralentie par le traitement, sans pour autant montrer des signes de régression tumorale. Ces deux situations sont révélatrices de l'existence d'un mécanisme de résistance intrinsèque, c'est-à-dire déjà présent dans les cellules tumorales avant même l'administration de la (ou des) molécule(s). Dans le mélanome, environ 30% des patients présentent une résistance primaire au traitement par combinaison BRAFi/MEKi^{71,72}. Selon certains auteurs, plusieurs mécanismes sont spécifiquement associés à ce type de résistance, comme la perte de *PTEN* ou *NF1*, l'amplification du gène *cyclin D1* (**Figure 8**), certaines

mutations des gènes *HOXD8*, *RAC1* et *MEK*, ou encore la sécrétion de Hepatocyte Growth Factor (HGF) par les cellules du microenvironnement tumoral⁷³.

Un gène suppresseur de tumeur codant pour un important répresseur de la voie oncogénique PI3K/Akt/mTOR, appelé *PTEN*, est fréquemment altéré dans les mélanomes mutés *BRAF* naïfs de tout traitement, notamment à des stades de progression avancés^{17,33}. Il s'agit d'altérations génétiques induisant une « perte de fonction » qui provoquent l'activation constitutive de cette voie de signalisation et favorisent ainsi l'émergence de résistances primaires aux BRAFi/MEKi^{73,74}.

Les altérations perte de fonction sur le gène *NF1*, un régulateur négatif de la voie des MAPK, sont également observées. Cependant, contrairement aux altérations activatrices de *NRAS* et *KRAS*, elles sont impliquées uniquement dans la résistance primaire aux thérapies ciblées^{74,75}.

Dans les mélanomes mutés *BRAF*, l'activation de la voie des MAPK entraîne principalement une prolifération cellulaire incontrôlée, en modifiant une autre voie d'aval nommée « voie Rb ». La voie Rb (Rétinoblastome) est un régulateur essentiel de la prolifération cellulaire dans des conditions physiologiques. Elle implique cinq familles clés de protéines : les CDKN (ex : p16, codée par *CDKN2A*), les cyclines-D (ex : cycline-D1), les cdk (principalement cdk4 et cdk6), les protéines Rb, et les facteurs de transcription E2F. Lorsque les cellules répondent à des signaux de croissance, le complexe cycline-D/cdk4-6 est activé et induit à son tour l'activation de Rb et E2F pour déclencher l'entrée dans le cycle cellulaire. Les CDKN comme p16, quant à elles, tendent à inhiber la voie Rb, afin de réguler la division cellulaire. L'amplification du gène *CCND1*, codant pour la cycline-D1, a été observée dans environ 20% des échantillons de mélanome^{68,74}. Par ailleurs, la perte de p16 par différents mécanismes (délétion/altérations perte de fonction/méthylation du gène *CDKN2A*) est un mécanisme fréquemment observé au cours de l'oncogénèse du mélanome, de façon mono-allélique dans un premier temps, puis bi-allélique aux stades les plus avancés de la maladie. Une étude clinique a montré que la délétion de *CDKN2A* et l'amplification de *CCND1* étaient associées à une survie sans progression plus courte chez les patients traités par BRAFi⁷⁶, renforçant ainsi leur implication dans la résistance primaire aux thérapies ciblées.

L'altération activatrice P29S sur le gène *RAC1*, une petite GTPase de la famille des Rho impliquée dans la régulation de la prolifération et de la migration cellulaires, peut être observée dans près de 4% des mélanomes au moment du diagnostic. La présence de cette altération endogène dans les tumeurs est corrélée à la résistance primaire à l'inhibition de BRAF^{74,77}.

Enfin, un dernier gène de la voie MAPK connu pour être altéré dans les mélanomes résistants aux BRAFi/MEKi est *MAP3K8* (alias *COT*). Ce gène code pour une protéine kinase capable de phosphoryler MEK, de façon indépendante de la signalisation RAF d'amont. Des altérations activatrices de *MAP3K8*

sont présentes dans environ 1,5 % de tous les mélanomes naïfs de tout traitement, et sont donc pourvoyeuses de résistance primaire^{78,79}.

b) *Résistance secondaire*

La résistance secondaire (ou résistance acquise), quant à elle, correspond à l'échappement ou la rechute de la maladie après une période initiale de réponse au traitement. Dans certains cas cela peut se traduire par une réponse partielle, suivie d'une progression malgré la poursuite du traitement. Il s'agit du scénario le plus fréquent dans le mélanome muté *BRAF*, avec environ 50% de réponses partielles aux combinaisons BRAFi/MEKi^{71,72}. Dans d'autres cas la résistance secondaire se traduit par une réponse complète, suivie d'une période de rémission, aboutissant finalement à une résurgence de la maladie des mois, voire des années plus tard. Ce cas de figure est appelé « récurrence », ou encore « rechute ». Dans le mélanome, le temps médian entre la réponse initiale aux BRAFi/MEKi et la survenue d'une résistance secondaire (correspondant au temps de survie sans progression) est d'environ 11 à 12 mois^{71,72}. Le principal mécanisme de résistance aux BRAFi connu consiste en la réactivation de la voie des MAPK. Cette réactivation peut avoir lieu suite à plusieurs événements impactant l'expression et/ou la fonction des différents acteurs de la voie de signalisation (**Figure 8**). La résistance acquise peut également impliquer la réactivation de voies de signalisation oncogéniques parallèles comme la voie PI3K/AKT/mTOR. Il peut être tentant de penser que ces réactivations surviennent suite à l'acquisition d'altérations dans le génome des cellules tumorales. Cependant, d'après une méta-analyse de 2015, la résistance des mélanomes mutés *BRAF* aux thérapies ciblées peut être imputée à une altération génétique dans 50% à 60% des cas⁸⁰⁻⁸². Cela signifie que près de la moitié des cas de résistance sont dus à des mécanismes non génétiques qui sont, encore aujourd'hui, mal compris. Dans cette partie, nous allons nous concentrer uniquement sur les mécanismes de résistance secondaire médiés par des altérations génétiques connues et bien documentées.

(1) *Altérations de la voie des MAPK*

L'initiation et la progression des mélanomes mutés *BRAF* V600 repose sur l'activation constitutive de la voie de signalisation des MAPK. Le principe du traitement par une combinaison BRAFi/MEKi consiste justement à supprimer cette activation. De façon logique, la grande majorité des altérations génétiques responsables de la résistance secondaire à ces thérapies sont localisées sur des gènes impliqués dans cette même voie^{80,83,84} (**Figure 8**). L'exemple le plus évident est celui des altérations secondaires récurrentes sur les gènes *BRAF*, *MEK1* et *MEK2*, codant pour les cibles mêmes des inhibiteurs. Concernant *BRAF*, une altération secondaire de résistance est observée dans près de 30% des mélanomes résistants⁷⁸. Trois types d'altérations ont été décrites à ce jour : des amplifications du gène muté V600^{84,85}, des variants aberrants d'épissage du variant V600 capables de se dimériser spontanément⁸⁶, et l'altération activatrice secondaire *BRAF* L505H⁸⁷. Quant à *MEK1* (*MAP2K1*) et son

paralogue *MEK2* (*MAP2K2*), deux kinases centrales dans la voie MAPK, des variants activateurs sont observés de façon récurrente dans les cas de résistance acquise (**Figure 8**), bien que plus rares que les altérations secondaires de *BRAF*. Les plus fréquemment identifiés sont Q56P, E203K, C121S et K57E pour *MEK1*, et E207K et Q60P pour *MEK2*^{79,84}.

Une altération de résistance est également fréquemment observée dans les gènes *NRAS* et *KRAS*, deux kinases situées en amont de *BRAF* au sein de la voie MAPK (**Figure 8**). Une altération activatrice sur l'un de ces deux gènes est classiquement observée comme driver dans des mélanomes naïfs de tout traitement, principalement des variants activateurs simple nucléotide sur les codons G12, G13 et Q61 pour *NRAS*, et G12 et Q61 pour *KRAS*. Ces variants *NRAS/KRAS* et les variants *BRAF* V600 sont mutuellement exclusifs dans les mélanomes nouvellement diagnostiqués, mais une co-occurrence est observée dans près de 20% des mélanomes résistants aux BRAFi/MEKi^{73,78,80}. Il s'agit donc d'altérations vectrices de résistance secondaire, car acquises au cours du traitement.

(2) Altérations de la voie PI3K-Akt-mTOR

Dans certains cas, la résistance aux thérapies ciblées n'est pas médiée par une réactivation de la voie MAPK, mais par l'activation d'une voie de signalisation oncogénique alternative. La principale est la voie PI3K-Akt-mTOR, qui partage plusieurs similarités avec celle des MAPK : leur activation par des récepteurs tyrosine kinase sous l'action de ligands extracellulaires, leur fonctionnement basé sur une cascade de phosphorylations, leur capacité à induire un programme d'expression associé principalement à la prolifération et la survie cellulaire, et leur fréquente dérégulation dans de nombreux cancers. Ces deux voies peuvent également s'activer ou s'inhiber mutuellement par un système de cross-talk, permettant de basculer rapidement de l'une à l'autre en fonction du contexte cellulaire ou environnemental⁸⁸. Des altérations génétiques récurrentes sur certains gènes impliqués dans cette voie ont été documentées par Shi et al dans 22% des cas de mélanomes ayant développé une résistance secondaire aux thérapies ciblées. Ces altérations touchent principalement les gènes *AKT1*, *AKT2* et *AKT3*, codant pour les effecteurs d'aval de cette voie (**Figure 8**). Il s'agit la plupart du temps de variants simple nucléotide activateurs sur les codons Q79 et E17⁷⁸. Il est important de noter qu'il n'y a pas d'exclusion mutuelle entre les altérations de la voie PI3K-Akt-mTOR et celles de la voie MAPK. Les deux types d'altérations peuvent être observées en co-occurrence au sein du même clone tumoral, et ainsi contribuer de façon conjointe à la résistance des mélanomes aux thérapies ciblées⁷⁸.

Finalement, la grande diversité des altérations génomiques imputées dans l'acquisition de la résistance, et leur implication dans différentes voies oncogéniques, limite fortement l'efficacité à long

terme de la thérapie ciblée dans le mélanome. De plus, les tumeurs de mélanomes situées sur des sites distincts chez un patient donné ont une évolution très ramifiée. Ces dernières peuvent donc acquérir des altérations de résistances propres, complexifiant encore d'avantage la mise en place d'une stratégie thérapeutique efficace⁷⁸.

c) Réponse adaptative

Tandis que la majorité des cellules de mélanome sont détruites sous la pression initiale induite par la combinaison BRAFi/MEKi, et que la tumeur répond objectivement au traitement, certaines cellules adoptent une réponse adaptative précoce médiée par un processus complexe de reprogrammation transcriptionnelle. Cette réponse adaptative les rend capables de modifier profondément leur état phénotypique afin de survivre transitoirement malgré le stress infligé par la thérapie⁷⁴. Il ne s'agit pas d'un état de résistance à proprement parler, mais plutôt de tolérance au traitement. Les cellules qui tendent vers cet état sont nommées "cellules persistantes", et constituent ce que l'on appelle la maladie résiduelle (MRD, pour « minimal residual disease ») (**Figure 9**). Ces cellules persistantes se caractérisent le plus souvent par une croissance lente et une dédifférenciation, perdant ainsi leur capacité à induire la progression tumorale. En revanche, elles bénéficient de plus de temps que les autres cellules de mélanome pour développer des mécanismes de résistance stables⁸⁹. Elles sont le moyen principal par lequel une résistance secondaire émerge chez les patients traités par BRAFi/MEKi.

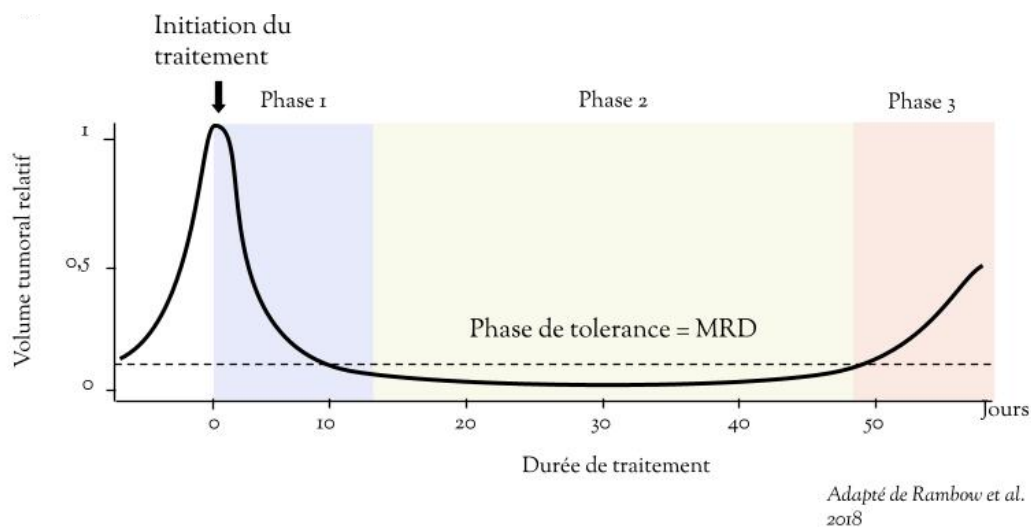


Figure 9 : Maladie résiduelle au cours de la thérapie ciblée dans le mélanome (Adaptée de Rambow et al., 2021)⁹⁰.

Dans les cas de réponses partielles, ce mécanisme de réponse adaptative survient dans un grand nombre de cellules, ce qui favorise le développement rapide d'une résistance secondaire et donc d'une progression tumorale avant même que le patient ait atteint la rémission. Au contraire, dans les cas de

réponses complètes, la résistance adaptative n'est amorcée que dans un très faible contingent de cellules tumorales, invisible à l'examen clinique ou radiologique. Le patient entre ainsi en rémission, tandis que les rares cellules à avoir amorcé une résistance adaptative développent des mécanismes de résistance stables. Une fois cela fait, ces dernières basculent de nouveau vers un état prolifératif et induisent la reprise de la progression tumorale

(1) Altérations de la voie YAP/TAZ

La voie de signalisation Hippo/YAP/TAZ, naturellement activée par certains facteurs de croissance et par des contraintes mécaniques imposées par la matrice extracellulaire, régule des voies d'expression impliquées notamment dans le contrôle de la taille des organes, de l'homéostasie des cellules souches et de la différenciation cellulaire. Dans le cadre du mélanome, Lin et al ont montré que YAP est impliqué dans l'acquisition de la résistance aux BRAFi/MEKi, et que son inhibition améliore la sensibilité aux médicaments dans les cellules cancéreuses⁹¹. Peu après, Kim et son équipe ont déterminé plus précisément qu'en conséquence du remodelage du cytosquelette d'actine induit par les BRAFi, la voie YAP/TAZ contribue à la résistance adaptative des cellules de mélanomes mutées *BRAF* exposées à cette molécule, en favorisant l'expression de gènes liés au cycle cellulaire et à la survie⁹².

(2) Voie des GTPases Rho

Les Rho sont des petites GTPases homologues de RAS, activées par divers récepteurs de la membrane plasmique, qui régulent de nombreux processus dans les cellules. Elles déclenchent une cascade de phosphorylation pouvant influencer l'activité des voies MAPK, PIK3-Akt-mTOR, ainsi que de nombreuses autres voies de signalisation

Dans le mélanome, la sous-famille RhoA est connue pour promouvoir l'invasion et les métastases⁹³. Misek et al ont montré que les GTPases RhoA induisent l'activation du co-facteur de transcription YAP, connu pour favoriser la résistance au BRAFi/MEKi dans le mélanome par la suppression de l'apoptose⁹³. L'accumulation de la protéine YAP et l'enrichissement d'une signature YAP ont été documentés dans environ 40 % des échantillons cliniques de mélanome provenant de patients qui ont rechuté après traitement par des inhibiteurs de la voie MAPK⁸¹.

Delmas et al ont montré que les BRAFi/MEKi induisent l'expression de RhoB, une autre GTPase de la même sous-famille que RhoA, par le biais de l'activation du facteur de transcription c-Jun. RhoB active à son tour AKT, favorisant ainsi la survie des cellules et la résistance aux thérapies ciblées⁹⁴.

Les résultats de Orgaz et al montrent que la signalisation des protéines Rho est enrichie dans les cellules résistantes de mélanome. Ils suggèrent également que les Rho induisent, par le biais de leur

protéine cible ROCK, la résistance aux BRAFi/MEKi en favorisant le remodelage du cytosquelette d'actine-myosine⁹⁵.

(3) Voie RAC1/PAK/C-RAF

Les PAKs (P21-activated kinases), qui sont des sérine/thréonine kinases, contribuent à l'activation de la voie des MAPK. Les PAKs peuvent phosphoryler directement les protéines CRAF et MEK, entraînant l'activation subséquente de ERK, l'effecteur final de la voie MAPK. Lu et al ont montré que les protéines PAK1 et PAK2 sont activées dans de nombreuses lignées résistantes de mélanomes, et se retrouvent surexprimées dans les tumeurs de mélanomes résistantes chez certains patients après progression sous thérapies ciblées. Leurs résultats montrent que les PAKs favorisent la résistance des mélanomes par le biais de la réactivation de ERK, de la voie JNK- β -caténine, et aussi possiblement de la voie PIK3-Akt-mTOR⁹⁶. Les PAKs sont elles-mêmes activées en amont par les protéines RAC1 et CDC42, qui sont également surexprimées dans les tumeurs progressant sous BRAFi/MEKi. Cela permet ainsi d'expliquer en partie comment survient cette augmentation de l'activité des PAKs dans les mélanomes résistants.

(4) Surexpression des récepteurs tyrosine kinase

En conditions physiologiques, les récepteurs tyrosine kinases s'activent en présence de ligands extracellulaires spécifiques, tels que des cytokines et des facteurs de croissance, ce qui déclenche la cascade de phosphorylation des voies de signalisation d'aval. Ce fonctionnement est perturbé dans de nombreux cancers par l'intervention de différents mécanismes. Dans le cas du mélanome, les résultats concordants de plusieurs études suggèrent que le traitement par BRAFi entraîne la surexpression coordonnée de multiples récepteurs tyrosine kinase dans les cellules cancéreuses⁹⁷. Il s'agit principalement de EGFR, ERBB3, MET, PDGFR- α , IGF-1R, et AXL⁹⁸⁻¹⁰³ (**Figure 8**). Cela permet ainsi aux cellules de mélanome de maintenir l'activation de la voie MAPK, ou d'induire l'activation de voie alternatives comme la voie PIK3-Akt-mTOR. Plusieurs travaux ont montré que cette surexpression des récepteurs tyrosine kinase est médiée par la régulation de facteurs de transcription comme l'activation de FOXD3 pour ERBB3⁹⁹, ou la suppression de SOX10 pour PDGFR- α et EGFR¹⁰².

(5) Modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques sont des altérations héréditaires de la chromatine, sans changement de la séquence d'ADN sous-jacente, qui influencent et régulent l'expression des gènes dans la cellule. Ces modifications peuvent inclure, mais ne sont pas limitées à, l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation des histones, ainsi que la méthylation de l'ADN.

Hugo et al ont étudié les changements épigénétiques contribuant à la résistance aux thérapies ciblées qui surviennent dans les cellules de mélanome. L'étude a comparé les données d'expression et de méthylation de divers gènes impliqués dans la résistance. Leurs résultats montrent, parmi d'autres, une augmentation significative de l'expression et de l'activité du gène *c-MET*, dans les tumeurs de patients en progression sous BRAFi/MEKi. Cette surexpression est accompagnée d'une diminution du niveau de méthylation de plusieurs îlots CpG dans le gène *c-MET*, suggérant la nature épigénétique du mécanisme de régulation sous-jacent. Le même phénomène a pu être observé dans des lignées de mélanomes mutées *BRAF* rendues progressivement résistantes par exposition prolongée aux BRAFi/MEKi.

Les modifications post-traductionnelles des histones jouent également un rôle important dans l'acquisition de la résistance aux thérapies ciblées. Par exemple, l'inhibition de l'histone méthyltransférase EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2), connue pour induire la répression transcriptionnelle de certains gènes, améliore la réponse au vémurafénib dans les lignées cellulaires résistantes¹⁰⁴. La surexpression de *BMI1*, une autre histone méthyltransférase, induit une diminution de la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF en provoquant la suractivation de la voie de signalisation WNT- β -Caténine. Les histones désacétylases (HDAC), dont l'activité inhibe l'expression de nombreux gènes, semblent également jouer un rôle important. Par exemple Strub et al ont montré sur des lignées cellulaires que l'haploinsuffisance de l'HDAC SIRT6 augmente l'acétylation du locus *IGFBP2*, ce qui favorise son expression et déclenche la signalisation de survie médiée par IGF-1R. Comme cela a été abordé précédemment, il en résulte une résistance accrue des cellules aux inhibiteurs de BRAF et de MEK¹⁰⁵. Au-delà de cet exemple, l'inhibition des HDAC peut resensibiliser les mélanomes à la thérapie ou au contraire promouvoir la résistance, en fonction de la classe d'HDAC ciblée¹⁰⁶.

Enfin, les ARN non codants, notamment les micro-ARN (miARN) et les ARN longs non codants (lncARN), font eux-aussi partie des mécanismes épigénétiques qui contribuent à l'acquisition d'une résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome. Ils peuvent interagir avec la chromatine, les protéines et d'autres ARN impliqués dans la tumorigenèse, et leur expression est souvent modifiée dans le cancer. Par exemple, Gambi et al ont montré, à partir de lignées cellulaires et d'un modèle PDX de mélanome résistant aux thérapies ciblées, que le lncRNA *LENOX* contribue à la résistance des mélanomes aux thérapies ciblées en modulant la phosphorylation oxydative (OXPHOS) grâce à son interaction avec la GTPase oncogénique *RAP2C*¹⁰⁷. De multiples miARN, tels que miR-7, miR-125a, miR-204-5p et miR-211-5p, ont également été impliqués dans la résistance aux MAPKi, montrant l'importance de leur rôle dans la résistance aux thérapies du mélanome¹⁰⁸.

Collectivement, ces exemples montrent que les changements épigénétiques sont largement impliqués dans l'acquisition de la résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome, au même titre que les altérations génétiques.

(6) Influence du microenvironnement tumoral

L'analyse protéomique d'une cohorte de mélanomes a montré que la sécrétion d'hépatocyte growth factor (HGF) par les cellules stromales entraîne la réactivation des voies MAPK et PI3K-Akt-mTOR, par le biais de son récepteur MET, induisant ainsi la résistance primaire aux BRAFi¹⁰⁹. Les résultats d'une autre étude suggèrent que cette sécrétion de HGF provient des fibroblastes du microenvironnement tumoral, qui se retrouvent activés sous l'effet d'une quantité importante de FGF1. Ce dernier est lui-même sécrété par les cellules de mélanome sous l'induction du traitement par BRAFi¹¹⁰. Il semble donc y avoir un dialogue entre cellules de mélanome et cellules du microenvironnement qui favorise la résistance aux thérapies ciblées.

En outre, Miskolczi et al ont montré que l'abondance accrue de collagène dans la matrice extracellulaire influence l'état de différenciation des cellules de mélanome, et donc *in fine* leur résistance aux thérapies ciblées¹¹¹. Hirata et al ont également étudié ce phénomène à partir d'un modèle de lignée murine de mélanome greffée sur des souris et ont ainsi observé que le traitement par BRAFi induit l'activation "paradoxe" des fibroblastes associés au mélanome, ce qui favorise la production et le remodelage de la matrice extra-cellulaire. Cela conduit alors à une activation accrue de l'axe intégrine $\beta 1$ /FAK/Src dans les cellules de mélanome, qui favorise à son tour la résistance à la molécule¹¹².

Ces exemples illustrent ainsi le fait que le microenvironnement tumoral est un facteur important de la résistance aux thérapies ciblées, car l'activité des cellules stromales et la composition de la matrice extracellulaire influencent la sensibilité des cellules de mélanome aux thérapies ciblées

2. Switch phénotypique et hétérogénéité tumorale

Comme abordé précédemment, la résistance secondaire se met en place dans un 1^{er} temps par le biais d'une réponse adaptative, qui correspond à un ensemble de mécanismes rapides contribuant à la tolérance de la cellule aux thérapies ciblées⁷⁴. Ce phénomène survient dans un faible contingent de cellules tumorales appelé « cellules persistantes », qui peuvent ainsi survivre temporairement malgré la pression exercée par le traitement. Durant cette phase, les cellules persistantes perdent généralement une grande partie de leur capacité proliférative et ne contribuent donc plus à la

croissance tumorale (**Figure 9**). Cependant elles constituent un réservoir au sein duquel des mécanismes de résistance stables ont le temps de se mettre en place pour amorcer la reprise de la prolifération cellulaire et donc la rechute de la maladie⁹⁰. Ce basculement vers un état transitoire, puis vers un état prolifératif ou invasif, appelé communément « switch phénotypique », n'est pas médié par l'acquisition de nouvelles altérations génétiques. C'est un ensemble de modifications épigénétiques profondes et de régulations post-transcriptionnelles/post-traductionnelles complexes qui régulent ce phénomène sous l'influence du micro-environnement tumoral^{90,113}. Tout ceci est révélateur de la plasticité phénotypique des cellules de mélanome, qui leur octroie la capacité de basculer d'un état vers un autre de façon réversible, alimentant ainsi une importante hétérogénéité cellulaire au sein d'une même tumeur⁹⁰.

a) *Identification des différents états phénotypiques dans le mélanome*

Au début des années 2000, les chercheurs ont identifié deux profils transcriptionnels distincts parmi les différentes lignées de mélanome : un groupe de lignées avec une expression majoritaire des marqueurs mélanocytaires *EDNRB* et *MLANA*, caractérisé par une forte prolifération, et l'autre groupe associé à l'expression de *WNT5A*, *TGFβ* et *AXL*, caractérisé par une forte capacité invasive¹¹⁴. Des études ultérieures, par séquençage ARN de biopsies de patients ont permis d'étendre les signatures génétiques précédemment définies. Cela a conduit à l'identification d'une signature « proliférative » gouvernée par les facteurs de transcription MITF et SOX10, et d'une signature « invasive » gouvernée quant à elle par les facteurs de transcription AP1 et TEAD¹¹⁵. De façon intéressante, ces signatures se sont révélées indépendantes des altérations « drivers » connues du mélanome, telles que *BRAF V600E* ou *NRAS Q61L*. Par la suite, Tirosh et al ont analysé ces signatures par séquençage de l'ARN sur cellules uniques (scRNAseq) à partir de tumeurs de patients, et ont montré qu'elles co-existent systématiquement au sein d'une même tumeur¹¹⁶. En se basant sur cette même technologie de scRNAseq, réalisée sur un modèle PDX et des biopsies de patients traités par thérapie ciblée, Rambow et al ont par la suite identifié de nouvelles signatures caractéristiques. Ils ont également montré que les proportions respectives de chaque sous-population exprimant ces signatures évoluent au cours du traitement par inhibiteurs de la voie MAPK⁹⁰. Parallèlement, Tsoi et al ont constaté de leur côté que ces différentes sous-populations peuvent être décrites au sein d'un continuum de signatures transcriptionnelles, formant une trajectoire de différenciation/dédifférenciation suivie par les cellules de mélanome sous l'influence du traitement¹¹³ (**Figure 10**).

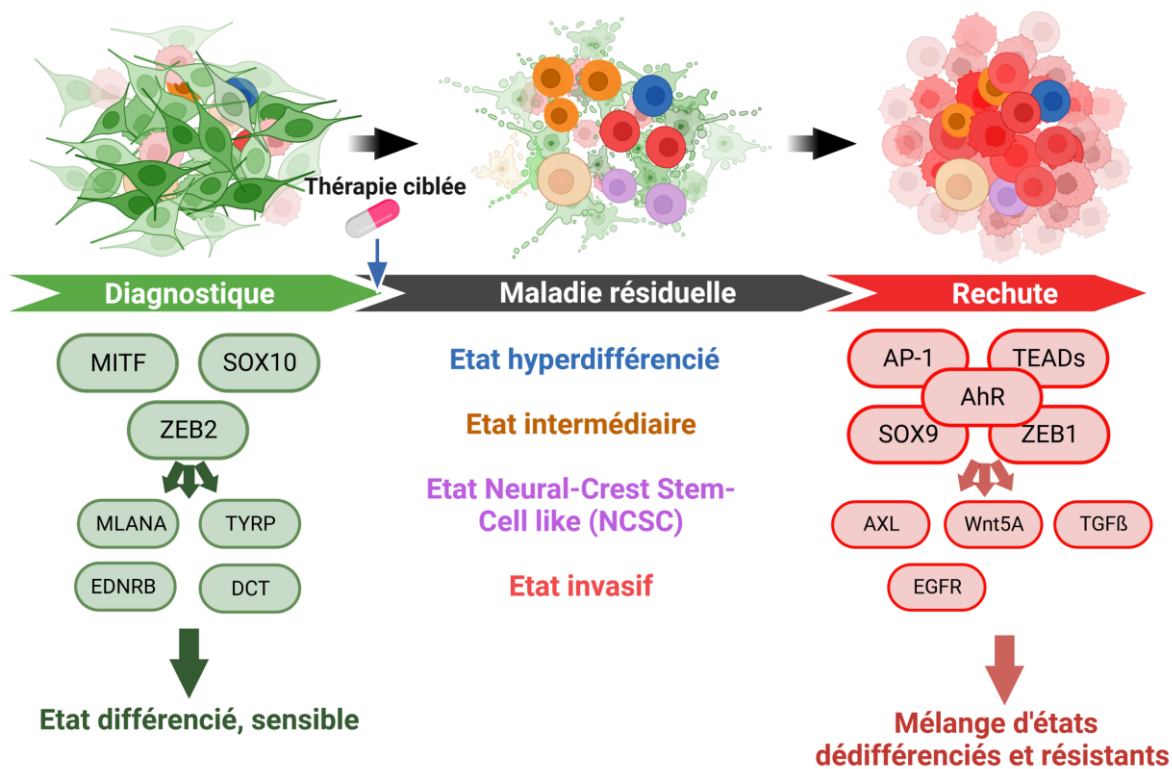


Figure 10 : Schéma simplifié du switch phénotypique et de ses mécanismes de régulation au cours de l'acquisition de la résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome cutané¹¹⁷

b) Description des différents états phénotypiques dans le mélanome

De façon schématique les différents travaux évoqués juste avant ont permis d'identifier cinq états phénotypiques (**Figure 10**), correspondant chacun à une signature transcriptionnelle spécifique et un profil de sensibilité aux thérapie particulier.

(1) État prolifératif (différencié/de type épithélial)

Cette population présente une signature d'expression associée à la différenciation mélanocytaire, caractérisée notamment par une forte expression du facteur de transcription *MITF* (dont le rôle sera détaillé plus loin) et une faible expression du récepteur tyrosine kinase *AXL* (profil $MITF^{high}/AXL^{ow}$) (**Figure 10**). Les gènes cibles de *MITF*, comme *MLANA*, *PMEL*, *DCT* et *TYRP*, qui sont impliqués dans la pigmentation, sont également considérés comme des marqueurs spécifiques de cet état prolifératif. Les cellules appartenant à cette population possèdent une capacité de prolifération importante, mais sont également plus sensibles aux inhibiteurs de *BRAF* et de *MEK* ¹¹⁸.

(2) État intermédiaire

Il s'agit d'un état transitoire qui survient probablement lorsque les cellules de mélanome passent du phénotype prolifératif au phénotype invasif. Ces cellules présentent une expression de MITF intermédiaire et sont marquées par un enrichissement à la fois en gènes de la signature des crêtes neurales et en gènes de la pigmentation. Les cellules dans cet état intermédiaire peuvent adopter un comportement mixte, c'est-à-dire une prolifération importante, mais plus lente que l'état prolifératif/différencié, et une capacité d'invasion modérée. Une sous-population particulière a été également identifiée au sein de cet état, appelée starved-like (SMC), qui présente une signature métabolique spécifique et une tolérance accrue à la privation en nutriments, ainsi qu'aux thérapies ciblées¹¹⁸.

(3) État invasif (indifférencié/mésenchymateux)

Cette population caractérisée par un profil MITF^{low}/AXL^{high}, présente une signature typique d'un phénotype mésenchymateux, avec une prolifération lente, un potentiel invasif élevé et une résistance aux thérapies ciblées¹¹⁸. Le changement phénotypique d'un état prolifératif vers un état invasif a été caractérisé par Hoek et al dès 2008 sur la base de signatures transcriptionnelles. Cette sous-population surexprime des gènes dont les produits sécrétés sont impliqués dans la modification de l'environnement extracellulaire (par exemple *INHBA*, *COL5A1* et *SERPINE1*), ou des gènes connus pour réguler négativement la voie Wnt/ β -Catenine (comme *WNT5A*, *DKK1* et *CTGF*)¹¹⁹.

(4) État semblable aux cellules souches de la crête neurale (NCSC)

Cet état correspond à des cellules qui ont retrouvé un profil d'expression similaire à celui des cellules progénitrices issues des crêtes neurales, dont dérivent les mélanocytes. Ce profil comporte notamment une faible expression de MITF, similaire à l'état invasif, mais également des niveaux élevés d'expression de NGFR, SOX10, AQP1, GFRA2 et RXR γ . Cette population hérite ainsi de certaines propriétés propres aux cellules des crêtes neurales, notamment une plasticité phénotypique et épigénétique accrues et des capacités de migration et d'invasion importantes. Comme les cellules de l'état invasif, il s'agit d'une population résistante aux thérapies ciblées¹¹⁸.

(5) État hyperdifférencié

Cet état est caractérisé par des niveaux très élevés d'expression de MITF ainsi que de ses gènes cibles, notamment ceux impliqués dans la pigmentation. Alors que les cellules prolifératives MITF^{high}/AXL^{low}

sont sensibles aux thérapies ciblées, cet état hyperdifférencié MITF^{high} est paradoxalement associé à une forte résistance¹¹⁸. Des analyses scRNAseq et immunohistochimiques réalisées sur modèle PDX traités par MAPKi ont révélé que cette population émerge de façon très précoce au cours du traitement, et est donc probablement un acteur clé de la réponse adaptative⁹⁰.

L'existence de ces sous-populations a été ensuite confirmée sur des échantillons de patients par immunohistochimie multiplexée. De façon plus surprenante, il a été montré que ces différents états sont déjà présents au sein de la tumeur avant la mise en place du traitement⁹⁰. Cela suggère que dans des tumeurs naïves, bien que la majorité des cellules de mélanome présente un état prolifératif, contribuant à la croissance tumorale, certaines cellules sont capables de passer de manière stochastique vers d'autres états, probablement sous l'influence de signaux intrinsèques et de facteurs environnementaux.

c) *Rôle de MITF dans le switch phénotypique*

MITF est un facteur de transcription de type basic helix-loop-helix leucine zipper qui joue un rôle essentiel dans l'établissement et le maintien du lignage mélanocytaire. Il permet le développement des mélanocytes à partir des cellules de la crête neurale et est indispensable à leur survie. Il régule l'expression d'une multitude de gènes impliqués dans la différenciation mélanocytaire, la production de mélanine, la survie, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, et le métabolisme¹²⁰. Il possède de nombreuses isoforme, notamment l'isoforme MITF-M (nommé par la suite MITF), qui est spécifique des mélanocytes et des cellules de mélanome¹²¹.

Plusieurs travaux ont montré que *MITF* joue également un rôle très important dans l'oncogénèse et la progression du mélanome, en régulant l'expression de gènes impliqués dans d'autres processus biologiques, tels que la survie cellulaire, l'invasion, la biogénèse et l'autophagie des lysosomes et la perte de sénescence¹²². Différents niveaux d'expression de MITF induisent l'expression variable de chacun des programmes transcriptionnels qu'il gouverne, favorisant ainsi le développement de plusieurs phénotypes distincts (**Figure 11**). Schématiquement, un niveau d'expression élevé de MITF favorise un phénotype mélanocytaire pigmenté, sensible aux thérapies ciblées, tandis qu'un niveau faible de MITF mène la cellule vers un état dédifférencié, invasif et résistant. Cependant, un niveau très élevé de l'expression de MITF peut également être associé à une résistance importante aux BRAFi/MEKi, comme c'est le cas dans la population hyperdifférenciée décrite par Rambow et al⁹⁰. Une grande variété de facteurs intrinsèques et environnementaux peut influencer le niveau d'expression de MITF, déclenchant ainsi le passage d'un état phénotypique vers un autre (**Figure 11**).

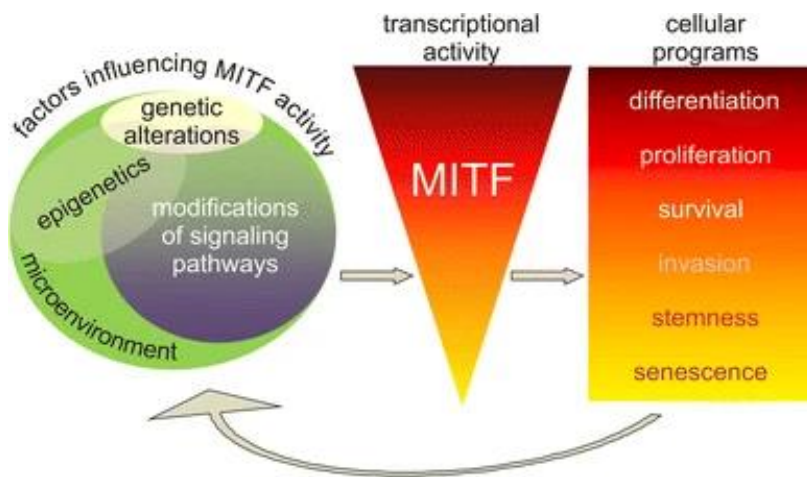


Figure 11 : Influence du niveau d'expression/activité de MITF sur le phénotype des cellules de mélanome (tirée de Hartman et al., 2015)¹²¹.

d) Facteurs régulant l'expression de MITF

Dans le cadre de la recherche sur le cancer, une attention particulière a été portée sur le microenvironnement tumoral et son rôle dans la plasticité phénotypique adaptative. Les cellules non cancéreuses du microenvironnement tumoral, ainsi que les conditions métaboliques, peuvent avoir un impact significatif sur les phénotypes des cellules de mélanome, en modulant l'expression et l'activité de MITF (**Figure 12**).

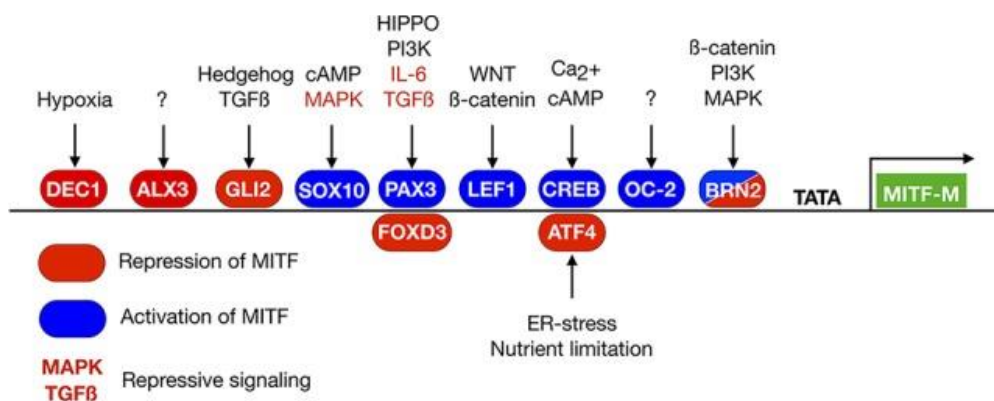


Figure 12 : Diagramme schématique des voies de signalisation et conditions environnementales régulant positivement ou négativement l'expression de MITF (tirée de Goding et al., 2019)¹²²

(1) Les conditions métaboliques du microenvironnement tumoral

La disponibilité du dioxygène, de nutriments, et de toutes les autres ressources indispensables au bon fonctionnement des cellules de mélanome et des cellules du microenvironnement, a un très fort impact sur leur phénotype. En 2013 Widmer et al démontrent, dans les biopsies tissulaires, que les

cellules de mélanome dédifférenciées sont principalement situées dans les régions hypoxiques de la tumeur, comme déterminé par leur expression de marqueurs spécifiques¹²³. L'importante hypoxie à laquelle peuvent être exposées les cellules de mélanome en raison de la mauvaise vascularisation de la tumeur induit une surexpression du facteur de transcription BHLHB2/DEC1/BHLHE40 par le biais du facteur de transcription HIF1 α , ce qui entraîne la répression de *MITF*¹²⁴ (**Figure 12**). D'autres situations de stress, comme le stress du réticulum endoplasmique (RE), la privation en glucose ou encore en acides aminés (**Figure 12**), peuvent réprimer l'expression de *MITF* par la voie de réponse intégrée au stress (ISR). Cette voie est médiée notamment par le facteur de transcription ATF4 qui inhibe l'expression de *MITF* en entrant en compétition avec CREB pour la liaison à son promoteur^{125,126}. Les situations de stress contribuent également à cette inhibition par l'intermédiaire du facteur de transcription BRN2, activé par diverses voies oncogéniques (voies MAPK, PI3K/PAX3, Wnt/ β -caténine et TNF α /MYC), capable lui aussi de se lier directement au promoteur de *MITF* pour réprimer sa transcription¹²⁷. Le stress cellulaire peut aussi favoriser l'activation de la voie du facteur AP-1, un complexe constitué de plusieurs familles de facteurs de transcription comme c-JUN et Fra1 (FOSL1), qui inhibe l'expression de *MITF* par l'intermédiaire du modificateur de chromatine HMGA1, conduisant ainsi les cellules de mélanome vers un état invasif et résistant aux BRAFi/MEKi¹²⁴. Enfin, certains stress environnementaux peuvent induire l'activation de kinases spécifiques, qui déclenchent conjointement à leur tour la phosphorylation de eIF2 α . Ce dernier est un important facteur d'initiation de la traduction. Sa phosphorylation a pour effet d'inhiber spécifiquement la traduction de *MITF*, et plus généralement de médier la réponse intégrée au stress conjointement avec ATF4¹²⁸.

(2) Les cellules et le stroma du microenvironnement tumoral

Les fibroblastes associés au cancer (CAF) peuvent influencer le phénotype des cellules de mélanome par le biais de facteurs sécrétés. C'est notamment le cas du TGF β , qui peut induire l'activation des axes c-JUN (AP-1) et YAP-TAZ-TEAD, ce qui a pour conséquence de réprimer l'expression de *MITF* dans les cellules de mélanome¹²⁴. D'autre part, Girard et al ont montré qu'au cours d'un traitement par MAPKi, les cellules de mélanome acquièrent un phénotype similaire aux CAF. Ce dernier est caractérisé par une activité contractile dépendante de l'axe actine/myosine-YAP-MRTF et la capacité à produire du collagène de type I, entraînant une augmentation de la densité et de la rigidité du stroma tumoral¹²⁹. Ce phénomène est décrit comme une boucle de rétroaction positive entre les cellules de mélanome et le remodelage de la matrice extra-cellulaire, contribuant ainsi à la résistance aux médicaments. Le même groupe de chercheurs a également montré que les récepteurs du domaine discodine DDR1 et DDR2, qui sont des récepteurs du collagène de type I, sont capables de réguler la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion des cellules de mélanomes¹¹¹.

Les cellules immunitaires sont également une source de nombreux facteurs sécrétés qui ont un impact majeur sur le phénotype des cellules de mélanome. Par exemple, le recrutement de neutrophiles et de lymphocytes T activés au sein de la tumeur induit une inflammation et la sécrétion de $TNF\alpha$, qui peut favoriser un état $MITF^{low}$ en activant les facteurs de transcription BRN2 et c-Jun¹²⁴. WNT5A, un facteur sécrété par les cellules myéloïdes suppressives, contribue également à inhiber l'expression de MITF en activant c-JUN par l'intermédiaire de la voie Wnt- β caténine¹²⁴. L'interleukine 1 (IL-1), une cytokine pro-inflammatoire principalement produite par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, est capable de déclencher la voie de réponse au stress médiée par l'axe JNK/c-Jun, et d'augmenter l'expression de $HIF1\alpha$, deux voies connues pour réprimer l'expression de *MITF* et favoriser la dédifférenciation des cellules de mélanome. L'IL-1 est également impliquée dans la production de la métalloprotéinase 9 (MMP-9), qui joue un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire et renforce l'invasion des cellules tumorales¹²⁴. En effet, comme cela a été abordé dans le précédent paragraphe, la composition de la matrice extra-cellulaire, sous le contrôle des différentes cellules stromales de la tumeur, a également une grande influence sur le niveau d'expression de MITF.

De façon générale, les divers changements survenant au sein du microenvironnement tumoral induisent de fortes variations du niveau d'expression de *MITF*, ce qui améliore l'adaptabilité des cellules de mélanome à différents types de stress et favorise ainsi leur survie.

e) *Switch phénotypique et acquisition de la résistance*

Comme cela vient d'être décrit, le passage de certaines cellules d'un état prolifératif vers un état invasif, SMC ou encore NCSC, est favorisé par des facteurs environnementaux qui déclenchent des voies innées de réponse au stress ou à l'inflammation (voie $HIF1\alpha$, voie AP-1-TEAD, voie ATF4). Ces changements phénotypiques peuvent aussi être déclenchés par des fluctuations intrinsèques de voies de signalisations. Cela permet aux différents états phénotypiques de coexister à tout moment au sein de la tumeur dans des proportions variées. Alors que le traitement d'une tumeur de mélanome par BRAFi/MEKi induit dans un premier temps la mort des cellules prolifératives, qui représentent initialement la population majoritaire au sein de la tumeur, il a été montré que l'exposition à cette combinaison induit également l'émergence de la population hyperdifférenciée $MITF^{high}$ de façon très précoce⁹⁰. Cette population, qui résiste fortement aux BRAFi/MEKi, se retrouve enrichie par un effet de sélection, mais également par un switch progressif des autres cellules vers cet état phénotypique. En effet, par le biais de plusieurs mécanismes, l'inhibition de la voie MAPK provoque initialement la surexpression de MITF dans les cellules de mélanome, et favorise donc la transition vers cet état hyperdifférencié $MITF^{high}$ ¹³⁰. Parallèlement, l'exposition chronique aux BRAFi/MEKi sélectionne

également les cellules invasives, NCSC ainsi que les cellules intermédiaires, et renforce le switch vers ces états phénotypiques¹²⁸. Le renforcement de ces programmes transcriptionnels est médié par les voies de réponse au stress et à l'inflammation évoqués dans la partie précédente. De façon intéressante, les cellules de type « cellules souches de la crête neurale » (NCSC) peuvent également promouvoir le switch des autres cellules vers cet état phénotypique de manière paracrine, favorisant davantage sa propagation au sein de la tumeur¹³¹. Les NCSC sont des cellules très permissives à la reprogrammation non-génétique, capables de s'adapter aux différentes conditions de stress, et sont donc considérées par certains auteurs comme un élément clé de l'acquisition de la résistance aux thérapies ciblées. Cette séquence d'événements n'est pas parfaitement reproductible et est amenée à varier d'un patient à l'autre. Cependant, il est supposé que de façon générale, la thérapie ciblée sélectionne les cellules ayant préalablement adopté un état qui favorise la tolérance aux thérapies ciblées (**Figure 10**), et que ces dernières vont alors renforcer et stabiliser un programme transcriptionnel associé à la résistance par le biais de nouvelles altérations génétiques, ou de boucles de rétroaction positives qui sont ensuite fixées par des mécanismes épigénétiques¹²⁸. Ces clones, ou « épiclones », en fonction du mécanisme sélectionné, deviennent alors progressivement une population majoritaire au sein de la tumeur et induisent finalement la rechute de la maladie. Ainsi, les populations invasives MITF^{low}/AXL^{high}, NCSC et SMC, existent de façon ubiquitaire dans toutes les tumeurs de mélanome et constituent ensemble un réservoir de cellules persistantes, à partir duquel la rechute survient inévitablement.

f) Rôle du facteur de transcription Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)

Notre équipe (Gene Expression and Oncogenesis) a, ces dernières années, contribué à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le changement phénotypique des cellules de mélanome. Notre laboratoire a ainsi montré que le facteur de transcription ligand-dépendant AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) intervient dans la dédifférenciation cellulaire et favorise l'expression de programmes de résistance aux BRAFi¹³². Il régule notamment, de façon directe ou indirecte, l'expression de gènes de résistance bien connus, comme AXL et EGFR. A l'aide d'un criblage CRISPR médié par l'activation d'expression génique (CRISPR-SAM), les travaux de l'équipe ont révélé plus spécifiquement l'importance de l'axe AhR-SMAD3 dans le processus d'acquisition de la résistance aux thérapies ciblées¹³³. Enfin, notre équipe a démontré qu'une fois activé AhR régule directement l'expression d'un éventail de gènes cibles induisant un phénotype invasif dans les cellules de mélanome, et déclenche l'activation de la voie SRC. Cette dernière est bien connue pour favoriser la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, ainsi que la résistance aux BRAFi dans le mélanome. À l'aide d'un modèle PDX (patient derived xenograft) de mélanome résistant au BRAFi, nous avons

démontré que l'inhibition de cette kinase SRC (à l'aide du dasatinib ou du bosutinib) re-sensibilise de manière significative les cellules de mélanome¹³⁴.

Outre son rôle avéré dans l'émergence de la résistance des cellules de mélanome aux thérapies ciblées, certaines données de la littérature impliquent également AhR dans la régulation du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses¹³⁵⁻¹³⁷. De plus, le facteur de transcription MITF, jouant un rôle primordial dans le contrôle du phénotype des cellules de mélanome et dont l'activité est inversement corrélée à celle de AhR, est également très impliqué dans la régulation de leur métabolisme énergétique comme nous le verrons plus tard. Par ailleurs, la reprogrammation des voies de production de l'énergie cellulaire devient progressivement un champ de recherche central dans l'étude de l'initiation, de la progression et de la résistance des tumeurs cancéreuses. C'est à partir de ce constat que notre laboratoire s'est intéressé aux changements métaboliques survenant au cours de l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK des cellules de mélanome, ainsi qu'au rôle potentiel que pourrait jouer AhR dans ce processus.

4. Résistance et reprogrammation métabolique

1. Généralités sur le métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique comprend toutes les réactions chimiques qui assurent la production continue de l'énergie nécessaire au soutien des fonctions cellulaires et des activités globales de l'organisme. Cette énergie est utilisée pour générer des mouvements mécaniques, pour le transport actif de diverses molécules, la biosynthèse de macromolécules complexes et pour de nombreuses autres fonctions cellulaires. Le métabolisme peut être divisé en deux processus principaux : le catabolisme et l'anabolisme. Le catabolisme est la décomposition de macromolécules complexes en molécules plus simples, ce qui libère de l'énergie. L'anabolisme est le processus inverse, qui consiste en l'assemblage de macromolécules complexes à partir de molécules plus simples, en consommant de l'énergie.

L'une des molécules les plus importantes pour le transfert d'énergie dans les cellules est l'adénosine triphosphate (ATP) (**Figure 13**). L'ATP est un nucléotide doté d'une structure triphosphate linéaire, qui peut stocker et libérer facilement une grande quantité d'énergie chimique. Un autre transporteur d'énergie essentiel est le NAD⁺, qui stocke l'énergie sous sa forme réduite NADH¹³⁸. Ce dernier agit comme un transporteur d'électrons universel, transportant les électrons des sites cataboliques vers la chaîne respiratoire mitochondriale. Les cellules animales utilisent principalement cinq types de substrats pour produire cette énergie : les glucides (et majoritairement le glucose), les acides gras, les cétones, les acides aminés (notamment la glutamine) et le lactate¹³⁸. Le glucose, les acides gras et les acides aminés proviennent généralement de sources alimentaires, mais certains peuvent être

synthétisés de façon endogène dans la cellule. Le glucose et les acides gras peuvent être stockés dans l'organisme sous forme de glycogène et de triglycérides respectivement, afin d'être mobilisés en cas de privation de nutriments. Les acides aminés, quant à eux, peuvent être libérés par dégradation des protéines. En revanche, les cétones et le lactate ne sont produits que de manière transitoire et ne sont pas stockés.

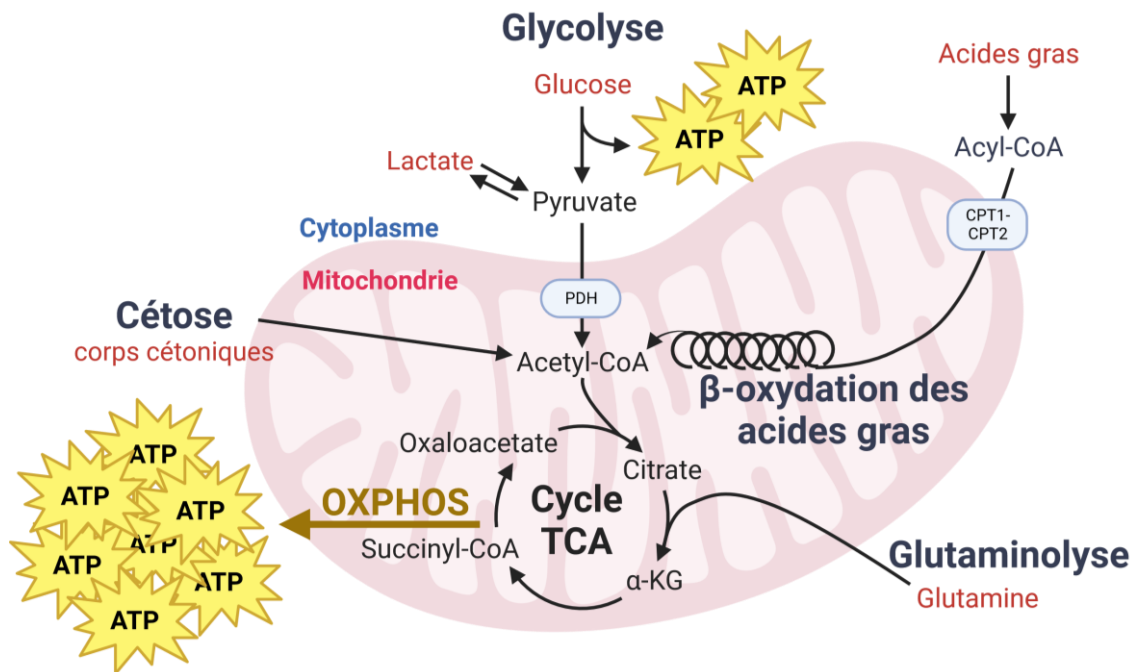


Figure 13 : Différentes voies du métabolisme énergétique

La glycolyse est la première étape du catabolisme du glucose, et consiste à décomposer le glucose en deux molécules de pyruvate par le biais de dix réactions enzymatiques successives dans le cytosol. La glycolyse produit 2 molécules d'ATP par molécule de glucose et s'appuie sur le NAD⁺ pour accepter les électrons libérés par ces réactions, formant ainsi du NADH¹³⁹. En présence d'oxygène, le pyruvate est transporté dans les mitochondries, où il est converti en acétyl-CoA, un processus catalysé par l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA entre ensuite dans le cycle de l'acide tricarboxylique (cycle TCA), également connu sous le nom de cycle de l'acide citrique, ou cycle de Krebs, qui se déroule dans la matrice mitochondriale. Il est important de noter que l'acétyl-CoA peut également être produit par le biais d'autres voies cataboliques, notamment par la β-oxydation des acides gras¹³⁹. Le cycle TCA correspond à une succession de réactions d'oxydo-réduction générant des transporteurs d'électrons à haute énergie, tels que le NADH et le FADH₂, ainsi qu'une petite quantité d'ATP¹³⁸. Ces transporteurs d'électrons sont ensuite utilisés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale à la surface de la membrane interne. L'énergie qu'ils contiennent y est utilisée pour transférer des protons à l'intérieur de l'espace intermembranaire de la mitochondrie, générant ainsi un important gradient

électrochimique. Ce gradient génère de l'énergie sous la forme d'une différence de potentiel électrique, qui est convertie pour produire une grande quantité d'ATP (**Figure 16**). A la dernière étape de la chaîne respiratoire, le dioxygène joue le rôle d'accepteur final d'électrons. Grâce à ce processus, plus communément appelé phosphorylation oxydative (OXPHOS), jusqu'à environ 30 molécules d'ATP peuvent être produites par molécule de glucose¹³⁸.

Cependant, bien que très rentable sur le plan énergétique, l'OXPHOS nécessite de grandes quantités de dioxygène pour produire de l'ATP. En l'absence d'oxygène, la cellule ne dispose plus d'accepteurs efficaces d'électrons, ce qui provoque l'arrêt de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le pyruvate produit par la glycolyse n'est alors plus converti en acétyl-CoA dans la mitochondrie. A la place, il reste dans le cytosol où il est réduit en acide lactique par fermentation lactique, un processus catalysé par La lactate-Déshydrogénase (LDH)¹³⁹. Ce processus consomme le NADH produit en amont, et le NAD⁺ qui en résulte peut alors entrer de nouveau dans la glycolyse. Bien que cette glycolyse anaérobie produise beaucoup moins d'ATP que l'OXPHOS, elle est nécessaire à la survie des cellules individuelles dans des conditions de faible teneur en dioxygène.

2. Métabolisme des cellules prolifératives

Les cellules de mélanome, et particulièrement celles présentant la mutation *BRAF* V600, montrent une dépendance plus importante à l'égard de la glycolyse, mais également une production accrue de lactate en comparaison des mélanocytes normaux¹⁴⁰. Plutôt que d'être oxydée dans les mitochondries pour alimenter la respiration mitochondriale, une grande partie du pyruvate produit par la glycolyse est convertie directement en lactate dans le cytosol, même en présence d'une quantité suffisante d'oxygène. Ce phénomène est communément appelé glycolyse aérobie, ou encore effet Warburg (**Figure 14**)**Figure 13**, en hommage à Otto Warburg, le premier scientifique à l'avoir observé dans les années 1920¹⁴¹.

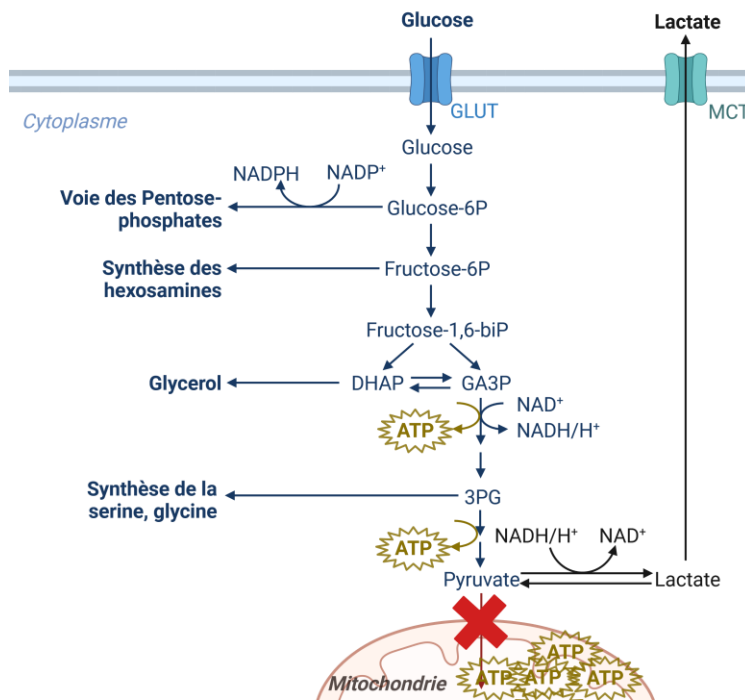


Figure 14 : Effet Warburg et promotion de l'anabolisme

Comme expliqué ci-dessus, l'oxydation du pyruvate par le cycle TCA dans les mitochondries permet de produire une grande quantité d'énergie, tandis que sa conversion en lactate par la Lactate-Déshydrogénase (LDH) n'en produit que très peu. En présence d'oxygène, il peut donc sembler paradoxal que les cellules cancéreuses, qui ont pourtant un besoin élevé en énergie, n'investissent pas le glucose consommé dans la phosphorylation oxydative. Cependant, l'effet Warburg survient spontanément dans de nombreux cancers car il offre une multitude d'avantages pour la survie des cellules cancéreuses, ainsi que pour la croissance et la progression tumorales.

a) *Avantages de l'effet Warburg*

(1) *Adaptation à l'hypoxie*

La croissance et la progression tumorale nécessitent la formation concomitante d'un réseau vasculaire pour maintenir un afflux sanguin au sein de la tumeur. Ce processus, également connu sous le nom de néoangiogenèse, est régulé par une balance entre des facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Il survient de façon naturelle dans les tissus sains, notamment au cours de la cicatrisation¹⁴². Cependant, dans le cadre du cancer, la néoangiogenèse se met en place de façon plus rapide et moins structurée que dans les tissus sains. En effet, la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales, ainsi que par les cellules du microenvironnement, mène à la

formation de vaisseaux désorganisés et hyperperméables, affectant ainsi la circulation des fluides et des macromolécules¹⁴². De plus, les vaisseaux de la tumeur sont souvent comprimés par les cellules cancéreuses, ce qui augmente d'autant plus la résistance au flux sanguin¹⁴³. La perte d'efficacité du réseau vasculaire nouvellement formé, combinée avec la forte consommation d'oxygène par les cellules environnantes, contribuent à créer un environnement hypoxique dans certaines régions de la tumeur. Les cellules proches des vaisseaux sanguins ont un accès abondant à l'oxygène et aux nutriments, ce qui leur permet d'adopter un métabolisme oxydatif, tandis que les cellules plus éloignées se trouvent dans un environnement hypoxique et pauvre en nutriments¹⁴². Ainsi, le fait d'adopter constitutivement un métabolisme basé en majorité sur la glycolyse et la fermentation lactique favorise l'adaptabilité et donc la survie des cellules tumorales en croissance rapide dans des conditions changeantes d'accès à l'oxygène.

(2) Acidification du microenvironnement

Dans les tumeurs solides, les cellules cancéreuses présentent un pH intracellulaire neutre et un pH extracellulaire acide, tandis que ce gradient est inversé dans les cellules non tumorales différenciées¹⁴⁴. L'effet Warburg induit une production importante d'acide lactique, ce qui libère une grande quantité de protons et permet donc d'expliquer cette inversion du gradient de pH. Plus précisément, afin de prévenir une acidose intracellulaire, les protons et l'acide lactique produits dans le cytosol sont exportés vers le milieu extracellulaire par divers canaux et transporteurs, en particulier les transporteurs de lactate MCT-1 et MCT-4¹⁴⁵ (**Figure 13**). Cette acidification du microenvironnement tumoral peut avoir des effets bénéfiques sur la survie et la prolifération des cellules de mélanome, ainsi que sur la progression tumorale et la formation de métastases. À titre d'exemple, la grande quantité de lactate ainsi sécrétée, peut être absorbée par les cellules stromales pour produire du pyruvate qui, à son tour, peut être sécrété pour alimenter les cellules cancéreuses¹⁴⁶. Il se produit ainsi un phénomène de coopération métabolique entre les deux populations cellulaires. Un autre avantage intéressant de l'acidification du milieu extracellulaire est l'induction d'un switch phénotypique des cellules de mélanome. Les résultats obtenus par l'équipe de Calorini suggèrent en effet que l'acidité déclenche l'expression de gènes associés à la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules de mélanome, favorisant l'émergence de populations cellulaires invasives et la formation de métastases¹⁴⁷. De la même façon, Boussadia et al. ont démontré, à partir de lignées cellulaires, qu'un microenvironnement acide entraîne une sécrétion accrue d'exosomes contenant des molécules pro-invasives qui peuvent avoir un impact sur la progression de la maladie¹⁴⁸. L'acidose extracellulaire favorise également la formation de métastases en induisant la sécrétion, par les cellules de mélanome et les macrophages associés à la tumeur, de VEGF-C, un facteur de croissance lymphangiogénique¹⁴⁷. L'acidité promeut ainsi la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques à travers lesquels les cellules

invasives peuvent s'exfiltrer hors de la tumeur primitive pour former de nouvelles tumeurs à distances. D'après les résultats de Matsuo et al, obtenus sur un modèle de mélanome murin, l'acidité du microenvironnement déclenche également l'activation de mécanismes adaptatifs permettant la survie des cellules en conditions de privation de glucose¹⁴⁹. Enfin, beaucoup de données convergent vers une capacité de l'acidification extracellulaire à entraver la réponse à l'immunothérapie et à favoriser l'échappement immunitaire des cellules tumorales dans le mélanome¹⁵⁰.

(3) Promotion de l'anabolisme

La glycolyse aérobie ne contribue pas seulement à la production d'ATP, mais sert également à produire de nombreux intermédiaires métaboliques essentiels pour la synthèse des macromolécules, principalement les protéines, l'ADN et les acides gras^{150,151}. Plutôt que de suivre la séquence classique de réactions successives aboutissant à la production de pyruvate, ces intermédiaires peuvent s'engager dans des voies anaboliques parallèles à la glycolyse, appelées « voies de branchement ». Par exemple, le glucose-6-phosphate, issu de la première réaction de la glycolyse, peut entrer dans la voie des pentoses phosphates et y être converti en ribulose-5-phosphate, substrat indispensable pour la synthèse des nucléotides. La voie des pentoses phosphates produit au passage du NADPH, un puissant transporteur d'électron nécessaire principalement pour la synthèse des acides gras et la prévention du stress oxydant¹⁴³ (**Figure 13**). Par ailleurs, le dihydroxyacétone phosphate, issu de la 4^{ème} réaction de la glycolyse, peut être converti en glycérol-3-phosphate, qui est à son tour utilisé pour la synthèse des acides gras^{152,153} (**Figure 13**). Les acides gras sont essentiels pour soutenir la prolifération cellulaire, car ils constituent les composants principaux des différentes membranes cellulaires.

Une autre voie de branchement majeure est celle de la biosynthèse de la sérine, dont le substrat de départ est le 3-phosphoglycérate, issu de la 6^{ème} réaction de la glycolyse¹⁵² (**Figure 13**). La sérine étant un acide aminé, elle est bien-sûr nécessaire à la synthèse des protéines, mais peut également contribuer à celle des nucléotides et des lipides, favorisant ainsi la croissance et la prolifération rapides des cellules cancéreuses. Enfin, la biosynthèse des hexosamines, dont le point de départ se situe entre la 2^{ème} et la 3^{ème} réaction de la glycolyse, transforme le Fructose-6-Phosphate en uridine-diphosphate N-acétylglucosamine (**Figure 13**). Ce dernier est un composé critique pour les réactions de glycosylation des protéines et des lipides, qui ont-elles-mêmes une influence importante sur la signalisation cellulaire, dont les voies de signalisation oncogéniques¹⁵⁴.

L'enzyme PKM2, qui catalyse la dernière réaction de la glycolyse, joue un rôle clé dans la régulation de l'activité des voies de branchement, particulièrement dans les cellules cancéreuses. Il s'agit de l'isoforme de l'enzyme PKM (pyruvate kinase muscle) la plus exprimée dans les cellules de mélanome, mais également celle qui possède la plus faible activité enzymatique. En outre, son activité peut être

d'avantage réduite par phosphorylation sous l'action de certaines kinases. Cette faible activité, qui peut sembler paradoxale au premier abord, crée un goulot d'étranglement et provoque l'accumulation d'intermédiaires glycolytiques en amont, qui peuvent ainsi être plus facilement redirigés vers les voies de branchement^{143,150}. A travers ce mécanisme, la glycolyse favorise par conséquent les réactions anaboliques nécessaires à la croissance rapide des cellules cancéreuses.

b) Effet Warburg et glutaminolyse

Etant donné que l'effet Warburg contribue parfois d'avantage à la génération d'intermédiaires glycolytiques et aux voies anaboliques correspondantes qu'à la génération d'ATP¹⁵⁵, les cellules cancéreuses peuvent avoir recours à des sources de carbone différentes du glucose pour produire leur énergie. Dans ces circonstances, la glutamine peut devenir un substrat métabolique préférentiel. En effet, cet acide aminé, souvent très abondant dans le milieu extracellulaire, peut entrer dans le cycle TCA, après transformation en glutamate puis en α -cétoglutarate (**Figure 13**) par les enzymes glutaminase (GLS) et glutamate déshydrogénase (GDH) respectivement¹⁵⁶. Ce catabolisme de la glutamine, plus couramment appelé glutaminolyse, peut ainsi produire de l'ATP au sein des mitochondries par l'intermédiaire de la phosphorylation oxydative¹⁵⁷. En condition hypoxique, Fan et al ont montré sur des cellules transformées que la phosphorylation oxydative dépend davantage de la glutaminolyse que de la glycolyse¹⁵⁸. En absence totale d'oxygène cependant, le cycle TCA étant découplé de la chaîne respiratoire, la glutaminolyse ne peut plus servir à la production d'énergie. Elle peut néanmoins toujours contribuer à la croissance cellulaire par un processus appelé cataplérose¹⁵⁷. De façon analogue aux voies de branchement de la glycolyse, la cataplérose définit l'ensemble des réactions utilisant les intermédiaires du cycle TCA, non pas comme substrats énergétiques, mais comme précurseurs pour la synthèse de composés essentiels, tels que certains acides aminés, les nucléotides, et les acides gras. Contrairement à la phosphorylation oxydative, la cataplérose ne consomme pas de dioxygène et peut donc participer à l'activité anabolique des cellules en conditions hypoxiques.

La protéine ASCT2, un échangeur d'acides aminés qui permet l'absorption de la glutamine, a été montrée comme étant cruciale pour la croissance tumorale¹⁵⁹. Cette protéine est fortement exprimée dans les cellules de mélanome, et son inhibition réduit la prolifération cellulaire dans des cultures de lignées de mélanome¹⁶⁰. Ces éléments suggèrent donc fortement que la glutaminolyse joue un rôle important dans le développement et la progression du mélanome.

c) Drivers de l'effet Warburg dans le mélanome

Il devient clair que l'Effet Warburg n'est pas simplement une conséquence passive de la transformation maligne, mais plutôt une stratégie métabolique active qui confère aux cellules de mélanome des

avantages sélectifs. Il semble donc intéressant d'examiner les mécanismes moléculaires qui orchestrent cette reprogrammation métabolique, dans le but de mieux comprendre ce phénomène et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

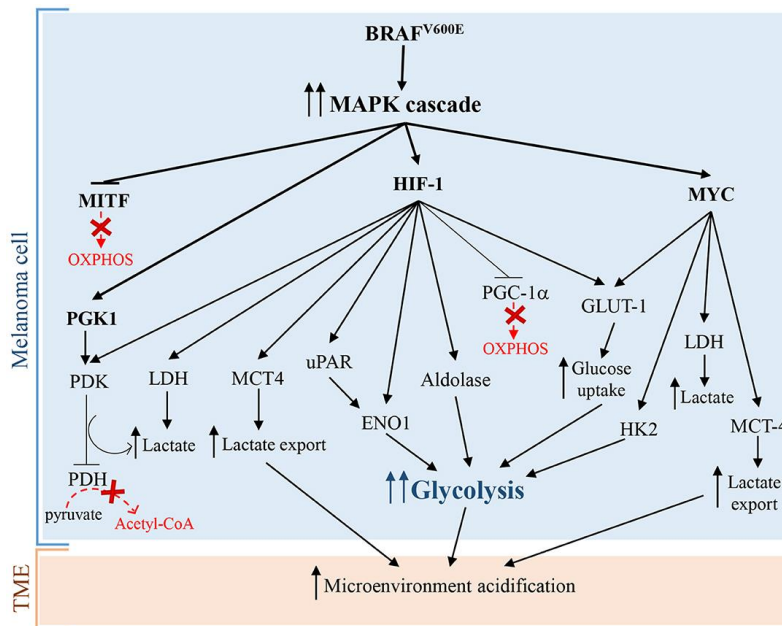


Figure 15 : Principaux mécanismes pilotant l'induction de l'effet Warburg dans les cellules de mélanome (tirée de Avagliano et al., 2020)¹⁴³.

(1) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)

HIF-1, un facteur de transcription constitué des deux sous-unités, HIF-1 α et HIF-1 β , est considéré comme l'un des principaux pilotes de l'effet Warburg dans de multiples cancers, dont le mélanome. Dans un environnement pauvre en dioxygène, ce dernier active la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans l'adaptation à l'hypoxie, notamment ceux liés au métabolisme énergétique et, plus précisément, à la glycolyse. En effet, HIF-1 α , en partenariat avec HIF-1 β , induit la transcription de plusieurs enzymes clés de la glycolyse, notamment l'aldolase, l'énolase 1 (ENO1) et la lactate déshydrogénase (LDH)¹⁴³ (**Figure 15**). Cela favorise ainsi grandement le flux glycolytique, ainsi que la fermentation lactique dans les cellules hypoxiques. De plus, HIF-1 α active la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), qui phosphoryle et inhibe la PDH (**Figure 15**). Cette dernière étant responsable de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, son inhibition empêche l'entrée du pyruvate dans le cycle TCA¹⁴³. Par ce mécanisme, HIF-1 provoque l'accumulation de pyruvate dans le cytosol, ce qui favorise sa conversion en lactate par la LDH. De plus, en stimulant l'expression du transporteur de glucose GLUT-1, HIF-1 augmente la disponibilité intracellulaire de glucose, ce qui renforce d'autant plus l'activité glycolytique¹⁴³ (**Figure 15**).

De nombreux résultats expérimentaux ont montré que HIF-1 α et plusieurs de ses gènes cibles sont fortement exprimés dans les cellules de mélanome, non seulement en conditions d'hypoxie mais aussi en normoxie¹⁶¹. Il y contrôle ainsi l'expression de différents gènes impliqués dans l'angiogenèse, le métabolisme, la prolifération, la mort cellulaire et le pouvoir métastatique des cellules de mélanome¹⁶². Lorsque les quantités de dioxygène sont suffisantes, l'activité de HIF-1 est naturellement inhibée en raison de la faible expression de HIF-1 α , ainsi que de sa dégradation rapide médiée par la protéine PHD2. Cependant, même en normoxie, les cellules de mélanome maintiennent une activité importante de HIF-1 en exprimant plus fortement *HIF-1 α* , ainsi qu'en réprimant PHD2 par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. Par exemple, il a été montré que l'antigène spécifique du mélanome MAGE11 contribue à inhiber PHD2, et donc à stabiliser HIF-1 α dans les cellules de mélanome¹⁶³. Les principales voies de signalisation oncogénique participent également à ce phénomène, malgré la présence de dioxygène. L'analyse de tissus tumoraux et de lignées cellulaires de mélanome a permis d'observer que l'activation constante de la voie MAPK par l'altération BRAF V600 induit une forte activité de HIF-1^{161,164} (**Figure 15**). Plusieurs études ont montré que c'est également le cas de l'axe PIK3CA-AKT-mTOR^{165,166}, qui peut être activé par la surexpression de plusieurs récepteurs tyrosine kinase, la perte de PTEN, certaines altérations activatrices des gènes AKT ou PIK3CA, ou encore la signalisation endothelin-1/endothelin-3/ET_BR^{167,168}.

D'autre part, Busca et al. ont pu montrer que le facteur de transcription MITF régule l'expression du gène *HIF-1 α* en se fixant directement sur son promoteur¹⁶⁹. A l'inverse, selon Louphrasitthiphol et al., en condition d'hypoxie une surexpression de MITF est temporairement induite par HIF1 α , et les deux facteurs corégulent un sous-ensemble de gènes cibles communs, notamment le *VEGFA* et le cotransporteur sodium/glucose *SLC5A9*¹⁷⁰. Ils participent ainsi à la modulation des gènes du métabolisme des cellules de mélanomes, permettant ainsi de contrôler la plasticité cellulaire en fonction du niveau d'hypoxie.

(2) Rôle ambigu de MITF

Les travaux de Busca et al ont révélé que HIF-1 α fait partie des cibles transcriptionnelles directes de MITF¹⁶⁹, qui est lui-même fortement exprimé dans la plupart des mélanomes, comme cela a déjà été abordé précédemment. Cependant, à partir de lignées cellulaires et de modèles PDX, Haq et al ont observé, quant à eux, que l'altération *BRAF* V600 tend à réprimer l'expression de *MITF* dans les cellules de mélanome¹⁷¹. Or, le facteur de transcription *PGC-1 α* , un régulateur clé de la biogénèse mitochondriale, fait partie des cibles directes de MITF. Cela implique que l'altération *BRAF* V600 inhibe la phosphorylation oxydative et favorise la glycolyse aérobie, en réprimant indirectement l'expression de *PGC-1 α* . En effet, cette étude met en évidence l'association entre l'altération *BRAF* V600 et la diminution de l'expression de *MITF* et des enzymes oxydatives, la réduction du nombre et de l'activité

des mitochondries, et l'augmentation de la production de lactate¹⁷¹. Ces résultats soulignent le rôle ambigu de MITF vis-à-vis du métabolisme énergétique, puisque parmi ses cibles transcriptionnelles il existe à la fois des gènes soutenant le basculement vers une glycolyse aérobie (*HIF-1 α* ¹⁶⁹) et des gènes soutenant une activité de phosphorylation oxydative (*PGC-1 α* ¹⁷¹). L'effet de MITF sur le métabolisme énergétique semble donc dépendre du contexte cellulaire : dans les cellules non mutées *BRAF*, la glycolyse aérobie est favorisée par la forte expression de *MITF* à travers sa régulation de HIF-1, tandis que dans les cellules mutées *BRAF* V600, la glycolyse aérobie est favorisée cette fois par la faible expression de *MITF* et la répression consécutive de *PGC-1 α* .

(3) Autres drivers

Outre les facteurs HIF-1 et MITF, de nombreux autres mécanismes contribuent à favoriser la glycolyse aérobie dans les cellules de mélanome. L'activation de ERK1/2 causée par les altérations activatrices de *BRAF* ou de *NRAS*, entraîne la translocation mitochondriale de PGK1, une enzyme très importante de la glycolyse. Une fois dans la matrice mitochondriale, Li et al ont découvert que PGK1 est capable de phosphoryler et d'activer PDK, qui à son tour inhibe la PDH¹⁷². Etant donné que l'inhibition de la PDH empêche l'entrée du pyruvate dans le cycle TCA, l'activation de ERK1/2 permet donc de favoriser la glycolyse aérobie dans les mélanomes. ERK1/2 possède aussi la capacité de phosphoryler PKM2, l'isoforme la plus exprimée de la pyruvate kinase¹⁴³, qui convertit le phosphoenolpyruvate (PEP) en pyruvate lors de la dernière réaction de la glycolyse. Cette phosphorylation transforme rapidement la PKM2 tétramérique active en monomères inactifs, capables de se transloquer dans le noyau et d'induire l'expression de nombreux gènes d'enzymes glycolytiques, par le biais de modifications épigénétiques sur leurs promoteurs¹⁷³.

La surexpression de plusieurs récepteurs tyrosine kinase comme *HER2* et *EGFR*, outre leur effet sur la prolifération et la survie des cellules tumorales, induit également la phosphorylation des enzymes glycolytiques PGAM1, PKM2 et LDHA. Cela a pour effet de renforcer leur activité enzymatique, et par conséquent d'accroître le flux glycolytique¹⁷⁴.

Enfin, le facteur de transcription c-MYC, qui joue un rôle crucial dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et le métabolisme, participe grandement à l'émergence de l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses¹⁷⁵. En effet, ce dernier accroît l'absorption intracellulaire de glucose, le flux glycolytique et la fermentation lactique, en renforçant notamment l'expression du transporteur de glucose (*GLUT-1*), de l'enzyme glycolytique Hexokinase 2 (*HK2*) et de la lactate déshydrogénase A (*LDHA*) respectivement¹⁷⁶ (**Figure 14**). Par ailleurs, il peut également stimuler la glutaminolyse en augmentant l'expression d'enzymes clés, comme la glutaminase¹⁵⁰. Cela renforce

donc l'idée selon laquelle la glutaminolyse et la glycolyse aérobie fonctionnent de concert dans les cellules de mélanome.

L'expression et l'activité de c-Myc sont importantes dans la plupart des mélanomes, car c'est une cible en aval de plusieurs voies de signalisation souvent activées dans cette maladie, notamment les voies des MAPK, PIK3CA/AKT/mTOR et Wnt/ β -caténine¹⁷⁷. Cela en fait donc, parmi d'autres fonctions, un acteur majeur de la reprogrammation métabolique des cellules de mélanome, notamment au cours de l'acquisition de la résistance aux BRAFi/MEKi.

3. Métabolisme des cellules invasives

a) *Plasticité métabolique des cellules de mélanome*

A un instant donné, des cellules de mélanome présentant différents états phénotypiques, malgré un patrimoine génétique identique, peuvent coexister au sein d'une même tumeur. Les capacités propres à chacun de ces états phénotypiques permettent aux cellules de mélanome de proliférer, de migrer en direction d'un autre site, de rejoindre la circulation sanguine, d'envahir un nouveau tissu, ou encore de survivre à des conditions environnementales stressantes. La possibilité de basculer d'un état vers l'autre, et ainsi de s'approprier ces différentes capacités, favorise grandement la progression tumorale et la formation de métastases. La transition entre ces états phénotypiques s'accompagne d'une reprogrammation du métabolisme énergétique^{90,178}, ce qui implique donc également la coexistence de plusieurs profils métaboliques au sein de la tumeur. Cette plasticité métabolique, guidée par les changements de programmes transcriptionnels ainsi que par les restrictions imposées par le microenvironnement tumoral, permet aux cellules de mélanome de passer d'un substrat préférentiel à un autre, ou de satisfaire un besoin spécifique¹⁵¹. Le facteur de transcription MITF étant un régulateur clé de l'identité phénotypique des cellules de mélanome, il est de façon logique également impliqué dans la régulation du profil métabolique. Les connaissances actuelles suggèrent fortement que MITF fonctionne comme un senseur métabolique, qui couple les signaux nutritionnels extrinsèques avec des réponses métaboliques intrinsèques, pour conduire les cellules de mélanome vers des phénotypes spécifiques et garantir ainsi leur survie à travers les conditions changeantes du microenvironnement¹⁵¹. Lorsque la concentration de glucose est élevée dans le milieu extracellulaire, la forte expression de *MITF* favorise une prolifération rapide, ainsi qu'un métabolisme de type Warburg capable de satisfaire la demande importante en énergie et en précurseurs anaboliques imposée par cette prolifération. En revanche, des conditions métaboliques stressantes, comme la pénurie de nutriments, l'absence d'oxygène, ou encore un pH acide, régulent à la baisse l'expression de MITF au niveau de sa transcription et de sa traduction^{125,179}, ce qui contribue à l'établissement d'un phénotype à cycles de divisions cellulaires lents, et provoque des changements métaboliques généralement

associées à l'invasion et la résistance aux thérapies¹⁸⁰. Parmi ces changements, les plus fréquemment observés sont le switch vers un métabolisme oxydatif et une dépendance accrue vis-à-vis des acides gras exogènes

b) *Phosphorylation oxydative et β -Oxydation des acides gras*

Bien que les cellules de mélanome naïves de tout traitement présentent en grande majorité un phénotype prolifératif, une forte expression de *MITF* et un métabolisme de type Warburg, certaines sous-populations de cellules tumorales adoptent parallèlement des profils métaboliques radicalement différents¹⁵¹. Plus précisément, plusieurs auteurs ont montré qu'un contingent de cellules tumorales, plutôt que d'effectuer une glycolyse aérobie, maintiennent le couplage de la glycolyse avec la respiration mitochondriale, car cela permet de produire de grandes quantités d'ATP à partir d'une faible quantité de glucose¹⁴⁰. Cette stratégie métabolique, bien que très rentable sur le plan énergétique, nécessite la présence de glucose dans la cellule ou dans son microenvironnement. Pour cette raison, certaines cellules couplent la respiration mitochondriale à l'oxydation des acides gras plutôt qu'à la glycolyse.

Les acides gras peuvent être transloqués dans les mitochondries par des protéines spécifiques où ils subissent un processus de dégradation appelé β -Oxydation (**Figure 16**). Il s'agit d'une suite de réactions cataboliques, qui génère des molécules d'acétyl-CoA et des transporteurs d'électron hautement énergétiques NADH et FADH₂. Le nombre de molécules ainsi générées est important, et proportionnel à la longueur de la chaîne carbonée. Les NADH et FADH₂ peuvent directement transférer leur énergie dans la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire de l'ATP, tandis que les molécules d'acétyl-CoA peuvent entrer dans le cycle TCA (**Figure 16**). De cette façon, ces dernières produisent davantage de transporteurs d'électrons, qui produiront à leur tour de l'ATP. Par conséquent, les acides gras permettent de générer de l'ATP, et donc de l'énergie, avec un rendement beaucoup plus important que celui de la glycolyse.

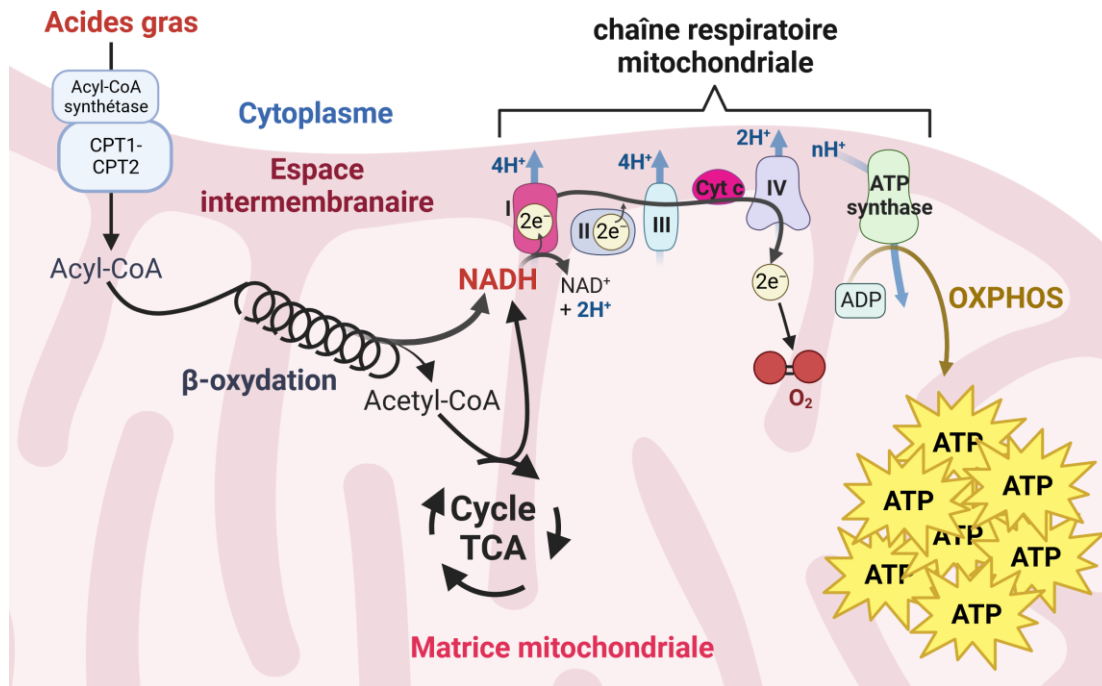


Figure 16 : β -oxydation des acides gras et phosphorylation oxydative (OXPHOS)

c) *Phosphorylation oxydative et invasion*

Pour les populations de type invasives et NCSC, les acides gras semblent devenir un substrat préférentiel. Une première façon d'expliquer ce phénomène est leur exposition fréquente à des environnements riches en lipides, du fait de leur migration à travers divers tissus adipeux. Par ailleurs, ces populations cellulaires ont un rythme de divisions lent nécessitant peu de précurseurs anaboliques en provenance de la glycolyse et de la glutaminolyse. En revanche, leur importante mobilité, ainsi que leur activité de remodelage de la matrice extracellulaire, imposent un besoin accru en énergie. La transition vers un métabolisme OXPHOS reposant sur l'oxydation des acides gras semble donc tout à fait logique pour ces cellules. Confortant cette hypothèse, une étude extensive, basée sur plus de 9000 échantillons de tumeurs, dont des mélanomes, a révélé une forte association entre les signatures transcriptionnelles du métabolisme des acides gras et les programmes de transition épithélio-mésenchymateuse, d'avantage exprimés dans les cellules invasives. Dans cette même étude, une amplification de gènes impliqués dans l'absorption des acides gras exogènes, tels que *CAV1* et *CD36*, a été détectée de façon spécifique au niveau des métastases. En outre, un ensemble d'éléments suggère que l'importation d'acides gras exogènes est corrélée avec une augmentation de leur oxydation mitochondriale, et que la combinaison des deux phénomènes favorise l'agressivité du mélanome¹⁸¹⁻¹⁸³, probablement en favorisant les populations invasives.

d) *Phosphorylation oxydative et résistance adaptative*

En 2013, Roesch et al ont montré qu'au sein des tumeurs de mélanome existe une sous-population de cellules à cycle lent, présentant naturellement une résistance plus importante aux thérapies ciblées, une consommation accrue en dioxygène, une surexpression des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi qu'une surexpression de l'histone déméthylase JARID1B par rapport aux autres populations cellulaires¹⁸⁴. Plus tard, l'analyse transcriptomique par scRNAseq de nombreuses cellules de mélanome issues de modèles PDX traités par MAPKi a montré que, parmi les différents états phénotypiques persistant dans la tumeur après le traitement, l'un d'eux, nommé starved-like, présente une nette surexpression du transporteur d'acides gras CD36⁹⁰. Il semble donc que la respiration mitochondriale et l'absorption des acides gras exogènes soient aussi des caractéristiques de la résistance aux thérapies ciblées. Les résultats de Shen et al, après réalisation d'une expérience similaire, confortent cette hypothèse en montrant que les cellules persistantes de mélanome dépendent davantage de la β -oxydation des acides gras que les cellules sensibles initiales, et plus précisément de l'oxydation des acides gras à très longue chaîne dans le compartiment peroxysomal¹⁸⁵.

De la même façon, les travaux menés par Aloia et al sur des modèles cliniques et pré-cliniques montrent que le traitement par MAPKi s'accompagne d'une augmentation rapide et constante de l'oxydation mitochondriale des acides gras, ainsi que d'une diminution du flux glycolytique¹⁸¹. Tous ces éléments suggèrent que, de façon précoce, le traitement par MAPKi inflige un stress métabolique aux cellules de mélanome, qui les force à basculer de la glycolyse aérobie vers un métabolisme oxydatif dépendant des acides gras. En effet, le blocage de la voie MAPK inhibe, par la même occasion, sa capacité à activer les voies HIF et MYC. Les MAPKi déclenchent ainsi une forte diminution d'expression de leurs gènes cibles, dont certains codant pour des protéines clés de la glycolyse aérobie comme *GLUT1*, *HK2* et *MCT1*. Les cellules se retrouvent donc forcées à trouver de nouvelles voies métaboliques compensatrices pour survivre.

e) *Mécanismes du switch métabolique des cellules résistantes*

Dans les cellules de mélanome, l'induction d'un métabolisme OXPHOS est principalement pilotée par le récepteur PGC1 α . Ce dernier est un cofacteur transcriptionnel qui régule, de façon directe ou indirecte, l'expression de nombreuses protéines impliquées dans la chaîne respiratoire mitochondriale, la réplication de l'ADN mitochondrial, la fission et la fusion des mitochondries, ainsi que la régulation du stress oxydatif¹⁸⁶. Dans un environnement riche en dioxygène, l'activation de la voie PIK3CA-Akt et de son effecteur d'aval, la sérine-thréonine kinase mTOR, déclenchent la translocation nucléaire de MITF, qui entraîne à son tour la transcription de nombreux gènes cibles.

Dans certaines cellules de mélanome, plutôt que d'induire l'expression de *HIF1α* et de favoriser ainsi la glycolyse aérobie, MITF induit l'expression de *PGC1α*, ce qui favorise la biogénèse mitochondriale et un métabolisme oxydatif¹⁸⁷ (Gopal et al., 2014 ; McQuade et Vashisht Gopal, 2015). C'est notamment le cas des cellules survivant à un traitement par MAPKi, peu de temps après le début de leur exposition. En effet, l'hyperactivation constitutive de la voie MAPK dans les cellules de mélanome mutées BRAF naïves inhibe naturellement l'expression de MITF, de façon partielle. Par conséquent, le blocage de la voie MAPK par les BRAFi/MEKi lève cette inhibition, rétablissant ainsi une forte expression de MITF et de ses cibles transcriptionnelles, dont *PGC1α*.

Un autre acteur important dans la régulation de l'activité de *PGC1α* est la protéine AMPK. Le stress énergétique induit par la thérapie MAPKi, ou encore par une pénurie de nutriments, provoque de facto une augmentation du rapport AMP/ATP, qui déclenche à son tour l'activation de la protéine AMPK. Par ailleurs, la réduction du niveau de phosphorylation de ERK induite par les MAPKi provoque également l'activation de l'AMPK. Une fois activée, cette kinase favorise l'expression et l'activation de *PGC1α* par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

Enfin, Ferraz et al ont révélé que le traitement par Vemurafenib sur des lignées de mélanome induit, de façon précoce, la surexpression des protéines régulant la fusion mitochondriale MFN1, MFN2 et OPA1, et inhibe parallèlement la phosphorylation de DRP1, une protéine clé dans le processus de fission mitochondriale. Leurs résultats montrent que ces mécanismes moléculaires aboutissent in fine à la formation d'un réseau mitochondrial hyperfusionné¹⁹¹. D'après certains travaux, la fusion des mitochondries favorise la phosphorylation oxydative en protégeant les mitochondries contre l'autophagie et en stimulant l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale¹⁹². En revanche, certains auteurs stipulent que l'hyperfusion mitochondriale, lorsqu'elle devient chronique, est associée à la sénescence cellulaire et la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène¹⁹³.

f) Phosphorylation oxydative et résistance acquise

Après avoir induit une résistance acquise dans une lignée de mélanome par exposition prolongée aux MAPKi, Martinez et al ont effectué une analyse protéomique sur des cultures de sphéroïdes. L'analyse de leur jeu de données révèle que les trois voies cellulaires les plus exprimées à l'échelle protéique sont la phosphorylation oxydative, le cycle TCA et la β -oxydation des acides gras¹⁹⁴. En outre, Gopal et al ont constaté que la lignée A375 rendue résistante aux thérapies ciblées, de la même façon que précédemment, présente une sensibilité accrue à l'inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale OPI, en comparaison de la lignée parentale sensible¹⁹⁵. De façon analogue, Figarola et al ont observé un effet cytotoxique du découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale plus important sur les lignées de mélanome résistantes que sur les lignées parentales sensibles¹⁹⁶. L'utilisation de la β -Oxydation des acides gras, et de la phosphorylation oxydative de façon générale,

semble donc être également une caractéristique de la résistance acquise aux BRAFi/MEKi, et non uniquement de la résistance adaptative. Cependant, la plupart des cellules résistantes expriment faiblement le gène *MITF*, ce qui signifie que l'induction et la stabilisation de cette reprogrammation métabolique ne peuvent pas être exercées par l'axe *MITF*-*PGC1α* évoqué précédemment. Zhang et al ont montré que les protéines *TFAM* et *TRAP1*, impliquées dans la réplication/transcription du génome mitochondrial et le repliement des protéines mitochondriales respectivement, jouent un rôle important dans la résistance à la fois adaptative et acquise aux BRAFi/MEKi dans le mélanome¹⁸⁶. Ces deux protéines pourraient donc constituer l'un des mécanismes par lesquels la biogénèse et l'activité mitochondriales sont favorisées dans les cellules ayant développé une résistance acquise aux MAPKi, malgré leur faible expression de *MITF*. La β -oxydation des acides gras constitue une étape importante dans l'acquisition et le maintien du phénotype de résistance aux thérapies ciblées du mélanome. Même si de nombreuses études ont permis d'enrichir les connaissances sur les mécanismes de régulation du métabolisme mitochondrial, sur le rôle des lipides, de l'environnement (adipocytes) ainsi que sur le rôle de la reprogrammation transcriptionnelle associée au changement métabolique, il reste encore de nombreuses pistes à étudier. De nombreuses questions concernent notamment le contrôle de l'expression et de l'activité des régulateurs de la biodisponibilité des acides gras, de leur stockage et de leur métabolisme permettant de réguler les besoins énergétiques des cellules résistantes via la β -oxydation des acides gras.

5. Résistance et stress oxydant

1. Définition du stress oxydant

Le stress oxydant correspond à un état de déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS) et les mécanismes antioxydants mobilisés par la cellule. Les ROS sont des molécules ou des ions dérivés de l'oxygène possédant un fort pouvoir oxydant, c'est-à-dire capables d'arracher un électron à d'autres atomes ou molécules. Les principaux sont l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), généré en majeure partie dans la chaîne respiratoire mitochondriale, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit essentiellement à partir de $O_2^{\bullet-}$ par l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), un ROS extrêmement réactif formé par la réaction de H_2O_2 avec le fer ou cuivre via la réaction de Fenton, et les radicaux peroxy ($ROO\bullet$) et alkoxy ($RO\bullet$), issus de l'oxydation lipidique. Ces divers ROS ont des sources et des mécanismes de production spécifiques, mais ils sont souvent interconnectés dans un réseau réactionnel complexe. Dans les cellules de mélanome, les ROS proviennent notamment de la phosphorylation oxydative, plus particulièrement les anions $O_2^{\bullet-}$ générés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi que H_2O_2 et les radicaux hydroxyle $\bullet OH$ qui en dérivent (**Figure 17**).

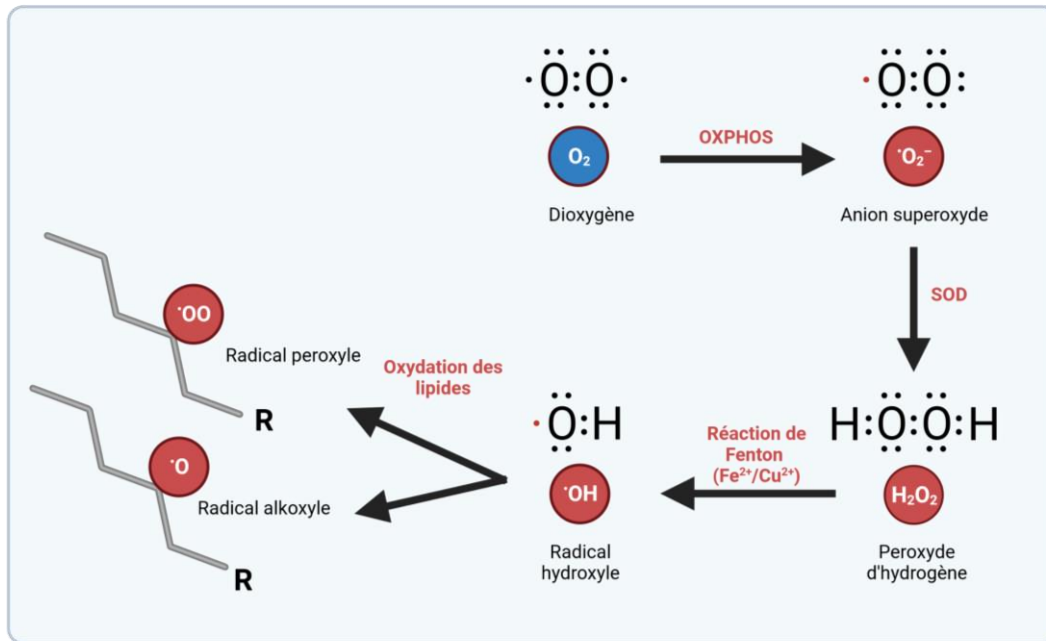


Figure 17 : Les principaux ROS et leur mode de production (ROS : espèces réactives de l'oxygène ; SOD : superoxyde dismutase ; R : chaîne carbonée lipidique

2. Corrélation entre résistance aux thérapies ciblées et stress oxydant

Après exposition aux BRAFi/MEKi, l'inhibition de la glycolyse aérobie induite par ces molécules force certaines cellules de mélanome à reprogrammer leur métabolisme énergétique vers la respiration mitochondriale, afin de maintenir les niveaux d'ATP. Les résultats de plusieurs travaux suggèrent que ce basculement vers la phosphorylation oxydative s'accompagne d'une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et par conséquent d'une certaine vulnérabilité vis-à-vis du stress oxydant. Par exemple, après avoir induit la résistance aux MAPKi dans des lignées de mélanome, à la fois sur des cultures cellulaires et sur des xenogreffes de souris, Corzaao-Rosas et al ont observé l'élévation de l'activité mitochondriale et de la production de ROS. Ils ont également constaté que ces cellules résistantes présentaient une sensibilité accrue à l'elesclomol, une molécule de synthèse conçue pour augmenter la production de ROS au sein des mitochondries¹⁹⁷. Des résultats similaires ont été observés par Khamari et ses collaborateurs sur des modèles comparables de cellules de mélanome résistantes aux thérapies ciblées¹⁹⁸. Cette équipe a également observé une augmentation de la quantité de glutathion réduit dans ces cellules résistantes, une molécule essentielle pour la protection contre le stress oxydant. Le glutathion réduit (GSH) sert de cofacteur pour plusieurs enzymes anti-oxydantes cruciales, notamment les Glutathione Peroxidases (GPXs) et les Glutathione S-Transférase (GSTs). Leurs résultats suggèrent que cette augmentation est médiée par NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), un facteur de transcription considéré comme un master régulateur de la

réponse antioxydante. Lorsqu'il est activé, NRF2 se transloque dans le noyau où il se lie aux éléments de réponse antioxydants (ARE) dans les régions promotrices de ses gènes cibles pour induire leur transcription. Notamment, dans leur modèle de cellules résistantes, Khamari et al ont constaté que la résistance aux thérapies ciblées est corrélée à une forte augmentation de la translocation nucléaire de NRF2. Cela stimule ainsi, parmi d'autres gènes, l'expression de *SLC7A11*, codant pour une protéine chargée d'importer la cystine dans le cytosol, un précurseur indispensable pour la synthèse de glutathion. L'activation de NRF2 favorise ainsi la production de glutathion réduit dans les cellules résistantes, ce qui renforce l'hypothèse d'une corrélation entre résistance aux thérapies ciblées et stress oxydant. Pour conforter davantage ce modèle, ils ont également effectué un test clonogénique sur leurs cellules sensibles et résistantes exposées à des doses croissantes de vemurafenib après traitement par un siRNA contrôle, ou par un siRNA dirigé contre NRF2. Aucune différence de sensibilité n'a pu être observée dans le cas des cellules sensibles entre les deux siRNA. En revanche, les cellules résistantes ont montré une diminution de leur résistance par rapport au siRNA contrôle, confirmant l'implication de NRF2 dans la résistance aux thérapies ciblées. Tous ces résultats semblent donc indiquer que les ROS et le stress oxydant de façon plus générale sont nécessaires à l'émergence et au maintien d'un phénotype résistant aux thérapies ciblées dans le mélanome.

3. Rôles du stress oxydant dans la résistance aux thérapies ciblées

Les réactions oxydatives provoquées par les ROS et les RNS peuvent endommager les protéines, les lipides et l'ADN, conduisant à des dysfonctions cellulaires, voire à l'apoptose ou d'autres formes de mort cellulaire. Cependant, les ROS peuvent également jouer un rôle bénéfique pour la tumeur en favorisant, par exemple, l'instabilité génomique et donc l'apparition d'altérations contribuant à la progression tumorale ou à la résistance aux thérapies. Une augmentation des ROS et des dommages oxydatifs à l'ADN ont été observés dans des modèles cellulaires de mélanome doublement résistants au trametinib et au dabrafenib, à la fois *in vitro* et *in vivo*¹⁹⁹. L'étude a également révélé que la suppression des ROS à l'aide de N-acétylcystéine, un puissant antioxydant, a restauré la sensibilité des cellules résistantes aux BRAFi. Cela suggère que les ROS peuvent également contribuer à la résistance, de façon réversible, par des mécanismes autres que la génotoxicité. En effet, d'autres études ont montré que les ROS peuvent agir comme des molécules de signalisation, activant les voies associées à la prolifération cellulaire, la survie et l'invasion²⁰⁰. Il a par exemple été montré que la surproduction de ROS mitochondriaux, notamment d'anions superoxydes, provoquée par une activité aberrante du cycle TCA, joue un rôle crucial dans l'acquisition des capacités pro métastatiques de la lignée de mélanome murin B16F10, après xénogreffes successives sur des souris. Plus précisément, Porporato et al ont mis en évidence la capacité des ROS mitochondriaux à activer l'axe Src-Pyk2-SMAD, et ainsi à réguler à la hausse l'expression d'un programme transcriptionnel associé à l'invasion²⁰¹. De la même

façon, une autre étude a révélé, à partir d'un modèle de mélanome sur zebrafish, que les ROS peuvent activer la voie NF- κ B²⁰², connue pour être liée à l'invasion et à la résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome¹¹⁸. Également, Dey et son équipe ont montré, dans des lignées humaines de mélanome, que le stress oxydant induit par le détachement de la matrice extracellulaire active la voie de réponse intégrée au stress médiée par le facteur de transcription ATF4²⁰³. Ce dernier est déjà connu pour favoriser le switch des cellules de mélanome d'un état prolifératif sensible vers un état invasif et plus résistant aux thérapies ciblées. Par ailleurs, Park et al ont mis en lumière l'augmentation des capacités de migration et d'invasion des cellules murines de mélanome B16F10 induite par traitement au H₂O₂. Ils ont également constaté l'activation concomitante de RAC1, une petite GTPase de la famille des Rho surexprimée dans les cellules résistantes, et connue pour promouvoir l'invasion par le biais du remaniement du cytosquelette d'actine. L'inhibition de RAC1 par une approche de dominant négatif a supprimé cette augmentation de l'invasion induite par H₂O₂²⁰⁴. Cela suggère donc que les ROS stimulent l'invasion, et probablement aussi la résistance, par l'intermédiaire de l'activation de RAC1 et de son influence subséquente sur le cytosquelette. En outre, la protéine RAC1 fait partie des complexes NADPH Oxydase 1 et 3 (NOX1/NOX3), dont l'activité enzymatique produit un ion superoxyde par oxydation d'une molécule de NADPH en NADP⁺²⁰⁵. Les ROS et la protéine RAC1 semblent donc entretenir une boucle de rétroaction positive favorisant le stress oxydant et l'invasion/résistance.

En outre, il est intéressant de noter que les ROS ont également la capacité de moduler les fonctions des cellules non cancéreuses au sein de la tumeur, telles que l'activation des fibroblastes et macrophages associés au cancer (CAFs et TAMs respectivement), les propriétés immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs, et l'inhibition des capacités des lymphocytes T cytotoxiques^{143,206}. Cette interaction complexe entre les cellules cancéreuses et les cellules non cancéreuses médiée par les ROS contribue ainsi à la progression tumorale en favorisant l'évasion immunitaire et la coopération entre les différentes populations cellulaires.

Pour conclure sur cette partie, il est donc tout à fait envisageable que les cellules de mélanome exposées aux MAPKi basculent de la glycolyse aérobie vers un métabolisme oxydatif, non seulement pour maintenir la production d'ATP, mais aussi pour favoriser la production de ROS et ainsi mobiliser des mécanismes complexes favorisant la résistance des cellules et la progression de la maladie.

6. Résistance et ferroptose

1. Définition de la ferroptose

En 2003, à l'occasion d'un criblage cherchant à identifier des molécules létales vis-à-vis des cellules exprimant la protéine oncogénique RAS^{V12}, des chercheurs du laboratoire de Stockwell ont découvert une molécule capable d'induire la perte de viabilité cellulaire d'une façon morphologiquement et

biologiquement différente de l'apoptose²⁰⁷. Cette molécule, appelée érastine, provoque ainsi un arrondissement et un décollement rapide des cellules, sans libération mitochondriale du cytochrome c, ni activation des caspases, ni fragmentation de l'ADN, ni formation de corps apoptotiques. Cette mort cellulaire se manifeste par un morphotype nécrotique, et est donc considérée par certains auteurs comme une forme de nécrose. Cependant, elle s'en distingue sur plusieurs aspects, notamment sur ses facteurs déclenchants et les mécanismes biochimiques en jeu. La nécrose peut être provoquée par un large éventail d'agents physiques et chimiques, et se caractérise par une dégradation non spécifique de la membrane plasmique, ainsi qu'une libération incontrôlée du contenu cytosolique. La mort cellulaire induite par l'érastine, quant à elle, ne peut être déclenchée que par l'inhibition de voies spécifiques, se caractérise par l'accumulation de lipides peroxydés dans les membranes, et dépend de la présence intracellulaire de fer libre (**Figure 18**). C'est en se basant sur cette dernière caractéristique que les scientifiques lui ont attribué le nom de « Ferroptose ».

2. Mécanismes de la ferroptose

La ferroptose est médiée par l'accumulation membranaire de peroxydes lipidiques, qui peuvent être générés de façon enzymatique ou non enzymatique. La peroxydation lipidique enzymatique est assurée principalement par les lipoxygénases (LOX), tandis que la peroxydation lipidique non enzymatique se produit par une réaction d'autoxydation initiée par les ROS, notamment les radicaux hydroxyles (**Figure 18**). La peroxydation non enzymatique d'un lipide donné induit la formation d'un lipide radicalaire adjacent, qui à son tour induit la formation d'un lipide radicalaire adjacent, provoquant ainsi une réaction en chaîne d'autoxydations, qui se propage à travers la bicouche lipidique. Cette propagation est d'autant plus importante que la quantité d'ions ferreux libres (Fe^{2+}) est élevée, car ces derniers entretiennent l'entretien par l'intermédiaire de la réaction de Fenton (Conrad & Pratt, 2019) (**Figure 17**). Par conséquent, les processus qui augmentent la disponibilité cellulaire du fer libre, tels que la ferritinophagie médiée par NCOA4, peuvent favoriser la ferroptose, tandis que les chélateurs du fer comme la déféroxamine (DFO), tendent à l'inhiber.

Une série d'études lipidomiques a permis de déterminer que les lipides les plus susceptibles de subir ces réactions de peroxydation sont les phospholipides contenant des acides gras polyinsaturés (ou « PUFAs » pour Poly-Unsaturated Fatty Acids). Ces derniers ont la particularité de présenter plusieurs doubles liaisons carbone-carbone dans leur chaîne aliphatique, ce qui modifie leurs propriétés physicochimiques et les rend cruciaux pour divers processus biologiques, comme la dynamique membranaire et la signalisation cellulaire. Ces doubles liaisons carbone-carbone sont chimiquement plus vulnérables vis-à-vis des radicaux et des lipoxygénases, ce qui en fait les positions clés des réactions de peroxydation. Les enzymes favorisant de façon spécifique l'incorporation des PUFAs dans

les phospholipides, telles que ACSL4 et la lysophosphatidylcholine acyltransférase 3 (LPCAT3), contribuent à enrichir les membranes cellulaires avec ces composés lipidiques et rendent ainsi la cellule plus sensible à la ferroptose.

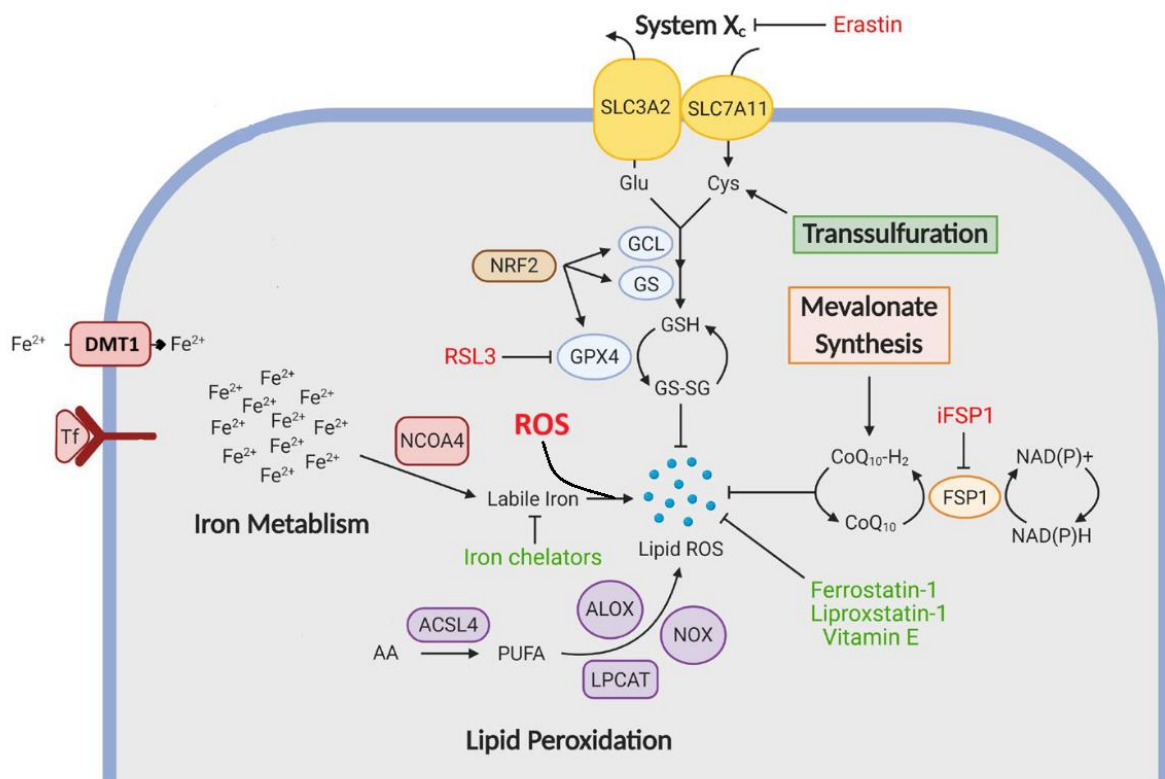


Figure 18 : Le ferroptose et ses principaux mécanismes de régulation (Tf : transferrine ; Cys : cystine ; Glu : glutamate ; AA : acide arachidonique ; PUFA : acides gras polyinsaturés ; GSH/GS-SG : glutathion réduit/oxydé) (adaptée de Talty et Bosenberg, 2021)²⁰⁸

3. Régulation de la ferroptose

L'enzyme glutathion peroxydase 4 (GPX4), catalysant la réduction des hydroperoxydes lipidiques en alcools, est apparue comme le principal inhibiteur endogène de la ferroptose. En contrôlant le degré d'accumulation de lipides peroxydés, elle agit comme un rhéostat, prévenant ou non son déclenchement en fonction de facteurs bien définis. La ferroptose est donc une mort cellulaire « régulée », ou « programmée », au même titre que l'apoptose, ce qui la distingue une fois de plus de la nécrose. Pour catalyser cette réaction, GPX4 transfère un électron depuis une molécule de glutathion, la faisant passer d'une forme réduite (GSH) vers une forme oxydée (GS-SG). Le glutathion oxydé est ensuite converti sous forme réduite par la Glutathion Réductase, en présence de NADPH, afin de maintenir l'activité de GPX4.

Des études ultérieures ont permis de déterminer que l'érastine agit en bloquant l'activité du système antiporteur cystine/glutamate X_c^- , ce qui induit une importante diminution de la concentration intracellulaire de cystéine, un précurseur indispensable pour la synthèse de glutathion réduit (GSH). Sans possibilité de maintenir le stock intracellulaire de glutathion, la cellule ne peut plus assurer l'activité enzymatique de GPX4, ce qui aboutit à l'accumulation membranaire de lipides peroxydés et finalement à la mort par ferroptose. Par ailleurs, l'étude initiale ayant permis la découverte de la ferroptose a identifié une autre molécule, nommée RSL3 (pour RAS-Selective Lethal N°3), capable d'induire, elle aussi, cette forme de mort cellulaire sur les lignées exprimant la protéine oncogénique RAS^{V12 209}. Les travaux menés quelques années plus tard par une autre équipe ont révélé que RSL3 agit par inhibition directe de l'activité peroxydase de GPX4. Au fil du temps, une multitude de travaux ont identifié de nouvelles molécules capables d'induire la ferroptose, soit par blocage du système antiporteur X_c^- ou de l'activité de GPX4, de la même façon que l'érastine et RSL3 respectivement, soit par l'intermédiaire d'autres mécanismes, comme la déplétion du glutathion réduit, l'induction d'une surcharge en fer, l'oxydation du fer libre, ou encore l'inhibition de l'axe FSP1-CoQ10-NAD(P)H. Les différentes molécules inductrices et leurs cibles respectives sont résumées dans la **Figure 19**.

Class	Class Characteristics	Impact on Ferroptosis	Compound Examples	Suitable for in vivo use
Class 1	Inhibition of system x_c^-	Prevents cystine import, causes GSH depletion and loss of GPX4 activity	Erastin, PE, IKE, other erastin analogs, sulfasalazine, sorafenib, glutamate	PE, IKE, sorafenib
Class 2	Direct inhibition of GPX4	Covalently interacts with GPX4 and inhibits its enzymatic activity	RSL3, ML162, DPI compounds 7,10,12,13,17,18,19	No
Class 3	Depletion of GPX4 protein and CoQ ₁₀	Depletes GPX4 protein and simultaneously causes depletion of CoQ ₁₀ via SQS-mevalonate pathway	FIN56 and CIL56	Unknown
Class 4	Induction of lipid peroxidation	Oxidizes iron, drives lipid peroxidation and indirect inactivation of GPX4	FINO ₂	Unknown
Others: BSO, DPI2, cisplatin, cysteinase, statins, ferric ammonium citrate, trigonelline, CCl ₄ , silica-based nanoparticles, nonthermal plasma				

Abbreviations: BSO, buthionine sulfoximine; CCl₄, carbon tetrachloride; CIL56, caspase-independent lethal 56; CoQ₁₀, coenzyme Q₁₀; DPI, diverse pharmacological inhibitor; FIN56, ferroptosis inducer 56; FINO₂, ferroptosis inducer endoperoxide; GPX4, glutathione peroxidase 4; GSH, glutathione; IKE, imidazole ketone erastin; ML162, Molecular Libraries 162; PE, piperazine erastin; RSL3, RAS-selective lethal 3; SQS, squalene synthase

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006203.t001>

Figure 19 : Principales molécules chimiques inductrices de la ferroptose

4. Résistance aux thérapies ciblées et sensibilité à la ferroptose

En 2016, Viswanathan et ses collègues ont voulu identifier des vulnérabilités associées aux états cellulaires résistants aux thérapies dans différents cancers. Pour cela, ils ont d'abord calculé un score d'état mésenchymateux pour 516 lignées cellulaires cancéreuses à partir des données d'expression du Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). Ils ont ensuite croisé ce score avec les données de sensibilité à 481 composés chimiques disponibles pour chaque lignée sur la base de données Cancer Therapeutics Response Portal (CTRP). Cette stratégie a permis de révéler que les états mésenchymateux, qui sont le plus souvent résistants aux thérapies conventionnelles, présentent une sensibilité accrue à deux

classes distinctes de molécules : les inducteurs de ferroptose et les statines. En croisant de nouveau ces résultats avec des données de sensibilité à l'ARN interférence à l'échelle génomique pour 349 de ces lignées, l'équipe a découvert que l'inhibition de GPX4 était le principal facteur de corrélation entre l'état mésenchymateux et la sensibilité aux inducteurs de la ferroptose²¹⁰. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont confirmé que GPX4 est effectivement un gène crucial pour la survie de ces populations cellulaires, ainsi que la cible directe des molécules identifiées. Parallèlement, une autre équipe a observé des résultats comparables sur des modèles de cellules persistant après différents traitements, ce qui renforce l'idée d'une corrélation entre susceptibilité à la ferroptose et la résistance aux chimiothérapies ou aux thérapies ciblées²¹¹. De façon intéressante, en étudiant les cellules de la lignée humaine de mélanome A375 greffées sur des souris, cette même équipe a montré que, contrairement à leur contrepartie sauvage, les cellules rendues KO pour le gène *GPX4* ne rechutaient pas suite à un traitement par dabrafenib et trametinib. Ce résultat suggère donc fortement que GPX4 est indispensable à l'émergence d'un phénotype résistant aux thérapies ciblées dans le mélanome, et que son inhibition représente une opportunité thérapeutique prometteuse. Un an plus tard, Tsoi et al publient les résultats de travaux similaires à ceux effectués initialement en 2016, mais centrés cette fois exclusivement sur le mélanome. En analysant les données d'expression de 53 lignées humaines de mélanome, ils tout d'abord mis en évidence l'existence d'états phénotypiques distincts, constituant un continuum de différenciation mélanocytaire. L'intégration des signatures transcriptionnelles correspondantes à la base de données pharmacogénomiques CTRP a ensuite révélé que l'état le plus différencié est positivement corrélé à la sensibilité à l'érastine, au RSL3, ainsi qu'à deux autres inhibiteurs de GPX4, ML162 et ML210. Enfin, après avoir confirmé ces résultats dans leurs propres lignées cellulaires, ils ont également montré que la combinaison des BRAFi et des inducteurs de ferroptose induit une diminution spectaculaire *in vitro* du nombre de cellules persistant après le traitement.

Selon leur interprétation, il existe une synergie entre les deux classes de molécules : les inducteurs de ferroptose agissent de façon privilégiée sur les cellules différenciées, tandis que les BRAFi ciblent plus spécifiquement les cellules différenciées. Par conséquent, cette combinaison thérapeutique permet de cibler un plus large spectre d'états phénotypiques à la fois, limitant de ce fait les probabilités d'émergence d'une population résistante.

7. Synthèse

Malgré l'avancée majeure que représente l'élaboration d'inhibiteurs ciblant spécifiquement la voie MAPK et les points de contrôle immunitaires dans le mélanome, les résultats cliniques demeurent, à ce jour, en deçà des espérances. En effet, même si près de 70% des patients répondent aux thérapies

ciblées, une résistance secondaire survient presque systématiquement peu de temps après leur initiation²¹². Quant aux immunothérapies, bien qu'offrant des réponses durables, voire des rémissions définitives dans certains cas, seuls 15 à 20% des patients y répondent réellement. En outre, le taux de survie sans progression à 7 ans n'est que de 23,8% et 13,3% pour le pembrolizumab et l'ipilimumab respectivement²¹².

Cette résistance peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment l'apparition d'altérations génétiques favorisant la réactivation de la voie MAPK, ou l'activation de voies oncogéniques alternatives. Cependant, ce mécanisme ne permet pas de récapituler à lui seul l'ensemble du processus d'acquisition d'une résistance aux thérapies ciblées. De plus, près de 50% des mélanomes résistants ne comportent aucune altération génomique pouvant expliquer cette perte d'efficacité de la thérapie. Des avancées récentes ont mis en lumière le rôle primordial de l'hétérogénéité phénotypique des cellules de mélanome, ainsi que des changements d'un état phénotypique vers un autre, gouvernés par des reprogrammations de l'épigénome et du transcriptome plutôt que par des altérations génétiques. Plus particulièrement, un nombre croissant de résultats semblent converger vers les changements de programmes d'expression liés au métabolisme énergétique des cellules cancéreuses. Tandis qu'un métabolisme reposant principalement sur la glycolyse aérobie apporte un avantage certain aux cellules de mélanome en prolifération, le basculement vers un métabolisme basé sur le catabolisme des lipides et la respiration mitochondriale semble favoriser, quant à lui, la survie des cellules résistantes. Cependant, ce switch phénotypique expose également les cellules à des vulnérabilités inattendues, qui peuvent ainsi être exploitées par de nouvelles générations de thérapies.

Ce constat accentue la nécessité de considérer l'adoption de nouvelles stratégies thérapeutiques combinatoires capables d'exploiter les vulnérabilités propres à chaque population cellulaire au sein des tumeurs. Bien que la ferroptose n'ait été découverte que récemment en tant que mécanisme de mort cellulaire, une quantité croissante de preuves suggère que sa régulation joue de multiples rôles dans la biologie du cancer. Plusieurs éléments soutiennent le rôle des voies ferroptotiques dans la modulation de l'état de différenciation des cellules de mélanome, de leur capacité métastatique et de leur résistance aux différentes thérapies. Il est donc clair que les agents inducteurs de ferroptose détiennent un fort potentiel pour la prise en charge thérapeutique du mélanome.

Contexte et objectifs du projet

L'équipe GEO de l'IGDR étudie depuis plusieurs années les mécanismes moléculaires qui confèrent aux cellules de mélanome une résistance aux inhibiteurs de BRAF (BRAFi). Le laboratoire s'est particulièrement focalisé sur le rôle de AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), un facteur de transcription ligand dépendant, initialement connu pour sa fonction de senseur environnemental et son rôle dans la détoxification des xénobiotiques (polluants environnementaux). Cependant, l'avancée des connaissances révèle une complexité croissante de ses fonctions cellulaires, notamment dans l'oncogenèse et l'inflammation. A ce jour, aucune altération génomique ne permet d'expliquer son rôle pro-tumoral. Seule une expression et une activité transcriptionnelle accrue dans les tumeurs en comparaison des tissus sains soulignent son importance dans la biologie tumorale. La réponse cellulaire à l'activation de AhR est conditionnée à la fois par la nature du ligand, ainsi que par le contexte cellulaire, le rendant alternativement pro- ou anti-tumoral²¹³. AhR émerge ainsi comme une cible thérapeutique attrayante, devant être activée ou inhibée selon le contexte. La forte corrélation entre son expression/activité et l'efficacité de plusieurs thérapies anticancéreuses le positionne également comme un marqueur potentiel de réponse.

Récemment, notre équipe a identifié le facteur AhR comme un régulateur clé d'une nouvelle voie de signalisation qui influence la sensibilité ou la résistance du mélanome aux BRAFi, indépendamment de la voie des MAPK. Cette étude a révélé que les BRAFi agissent comme une nouvelle classe de ligands pour AhR, se fixant sur un site de liaison distinct (poche β) et induisant un programme transcriptionnel différent de celui des ligands canoniques de AhR (poche α). Alors que la liaison d'un ligand canonique entraîne l'expression d'un programme de résistance, les BRAFi favoriseraient plutôt l'expression d'un programme de sensibilité aux thérapies ciblées (**Figure 20**). L'analyse des tumeurs à l'échelle cellulaire révèle une hétérogénéité au sein de laquelle une minorité de cellules ayant une activation canonique de AhR expriment cette signature transcriptionnelle de résistance et de dédifférenciation, favorisant leur persistance au cours du traitement et donc la rechute de la maladie.

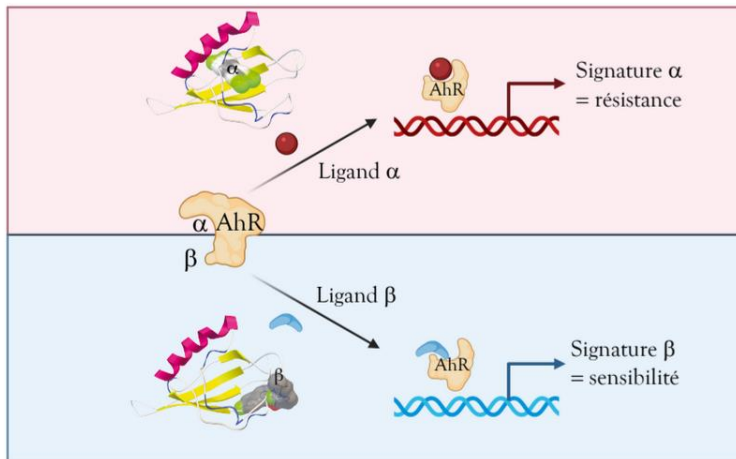
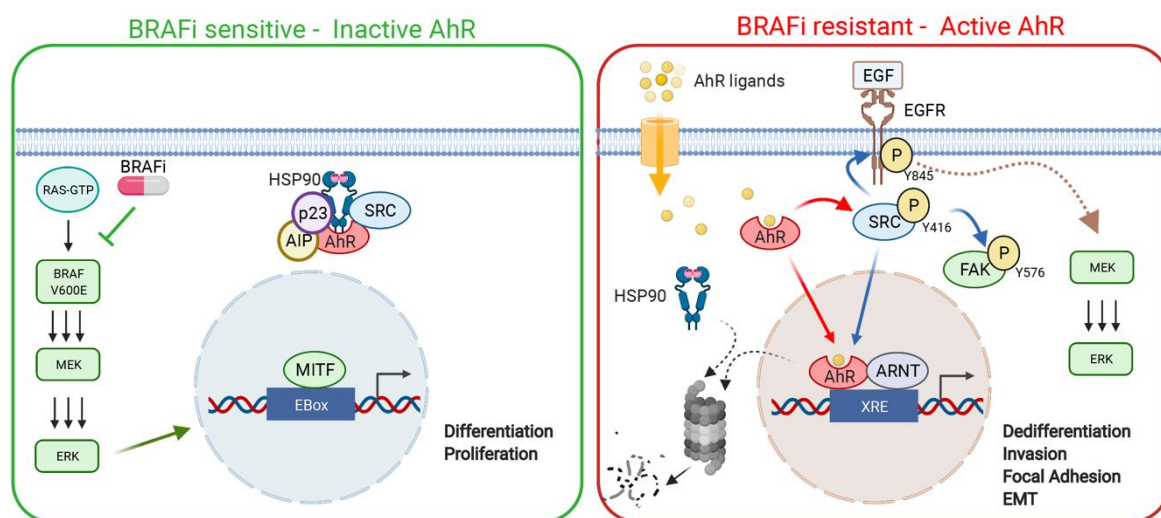


Figure 20 : les 2 classes de ligands de AhR et les signatures transcriptionnelles associées

Un précédent travail, auquel j'ai contribué, utilisant des approches moléculaires et fonctionnelles sur un modèle cellulaire de mélanome résistant, a confirmé le rôle de AhR dans la plasticité cellulaire et l'acquisition d'une résistance aux BRAFi. L'inactivation génétique de AhR via CRISPR-Cas9 conduit à une diminution significative de la résistance, ainsi que des capacités migratoires et invasives des cellules tumorales, restaurées par l'expression ectopique d'une forme constitutivement active de AhR. A partir de données d'expression de lignées de mélanomes (CCLE), mais également de données générées au laboratoire par séquençage ARN de nos propres modèles cellulaires, l'équipe a ainsi pu définir la signature transcriptionnelle régulée par AhR qui dicte l'acquisition du phénotype résistant.

Outre son activité transcriptionnelle, des travaux antérieurs de l'équipe, menés *in vitro* et *in vivo*, ont démontré qu'AhR induit directement l'activation de la kinase Src, et que ce mécanisme favorise le développement d'un phénotype agressif et résistant aux BRAFi (**Figure 21**). Ces résultats ouvrent la voie non seulement à l'identification précoce des patients susceptibles de développer une résistance, mais aussi à l'utilisation des inhibiteurs de Src comme adjuvants thérapeutiques pour resensibiliser les patients en échec de traitement.

Enfin, l'équipe GEO a exploré le potentiel thérapeutique des flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin, qui se révèlent être des antagonistes robustes de AhR et améliorent la sensibilité aux BRAFi. Bien que prometteurs, des défis demeurent quant à la stabilité et la biodisponibilité de ces composés²¹⁴.



Created with BioRender.com

Figure 21 : Rôle de l'activation de AhR et de la kinase Src dans l'acquisition de la résistance aux BRAFi du mélanome (figure tirée de Paris et al., EMBO Mol Med, 2022)¹³⁴

Au regard de ces différentes études, le facteur de transcription AhR s'avère être un acteur clé dans la régulation de la plasticité cellulaire et l'acquisition de la résistance au traitement par BRAFi dans le mélanome. Moduler à la fois son expression et son activité transcriptionnelle apparaît donc essentiel pour neutraliser cette résistance et prévenir l'apparition d'un phénotype agressif de la maladie.

C'est à la suite de ces différents travaux que s'inscrit mon arrivée au sein de l'équipe GEO en tant que doctorant. Initialement médecin spécialisé en biologie médicale, et plus spécifiquement dans le domaine de la génétique somatique des cancers, j'ai prolongé mon parcours par un Master 2 de cancérologie. Mon stage s'est déroulé à l'institut Numecan (Nutrition Métabolisme et Cancer, INSERM U1241), au sein d'une équipe étudiant la reprogrammation métabolique des cellules souches cancéreuses dans le carcinome hépato-cellulaire. Ce stage fut un terrain propice pour commencer à appréhender la complexité des régulations du métabolisme énergétique dans le contexte du cancer, et pour acquérir des compétences sur certaines techniques d'analyses spécialisées comme la technologie Seahorse. C'est au cours de ce projet que j'ai réalisé le rôle critique du métabolisme énergétique dans la résistance aux thérapies conventionnelles, ainsi que son potentiel en tant que nouvelle cible thérapeutique.

De façon logique, mon projet en tant que doctorant au sein de l'équipe GEO a donc été la compréhension des changements métaboliques associés à l'acquisition de la résistance dans le mélanome. Bien entendu, ce projet s'inscrit dans la continuité des thématiques de recherche du laboratoire, notamment sur la caractérisation des changements phénotypiques et transcriptionnels, ainsi que l'implication de AhR au cours de l'acquisition de la résistance aux thérapies ciblées, ceci dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du mélanome métastatique.

Avec la contribution d'Héloïse LECLAIR, une assistante ingénieure de notre équipe, j'ai donc mis en place des outils d'analyse *in vitro* dédiés à l'étude de ces mécanismes et des liens qui peuvent exister entre eux. J'ai ainsi pu utiliser ces outils, en complément de ceux déjà mis en place dans le laboratoire, sur des lignées cellulaires humaines de mélanome rendues résistantes aux BRAFi par exposition chronique, ainsi que sur leur contrepartie sensible. La combinaison d'approches métaboliques, cellulaires et moléculaires m'a tout d'abord permis, au cours de ces 4 années de thèse, de confirmer le basculement d'un métabolisme de type Warburg vers un métabolisme oxydatif dans les lignées résistantes, tel que décrit dans la littérature. Mes résultats ont également confirmé l'importante augmentation de la susceptibilité à la mort par ferroptose dans nos modèles cellulaires résistants, en comparaison des cellules sensibles. Enfin, les travaux que nous avons réalisés ont clarifié le rôle respectif joué par les facteurs de transcription AhR et MITF dans ces processus, et ont également révélé des phénomènes intéressants en lien avec le stress oxydant. L'ensemble des résultats obtenus a finalement abouti à la rédaction d'un article scientifique qui fera l'objet d'une soumission dans les tous prochains jours.

Résultats

Figure 1

Nous avons tout d'abord analysé les flux métaboliques sur nos modèles cellulaires par l'intermédiaire de la technologie Seahorse, capable de mesurer en temps réel l'acidification du milieu extracellulaire et la consommation en dioxygène comme témoins de l'activité glycolytique et mitochondriale respectivement. Cette expérience révèle que les cellules résistantes aux BRAFi (SKR) exhibent une réduction significative de leur activité glycolytique basale, ainsi qu'une augmentation de leur respiration mitochondriale (fig 1A). Ces changements métaboliques sont corroborés par la diminution de la consommation de glucose et de la production de lactate, et par l'augmentation du pH et de la production de pyruvate par les SKR, telles que biochimiquement mesurées dans le milieu de culture (fig 1B). L'analyse des données de séquençage ARN provenant de nos modèles cellulaires, ainsi que du CCLE, confirme également que les voies liées à la glycolyse sont moins exprimées dans les cellules résistantes (fig 1C et 1D).

Par ailleurs, la privation de glucose en culture cellulaire provoque une nette diminution de l'expression des signatures associées à la glycolyse et à la sensibilité aux BRAFi (fig 1G). Cette privation de glucose provoque également une augmentation significative de l'IC50 du vémurafenib et donc de la résistance, à la fois dans les cellules sensibles et résistantes (fig 1E), confirmant ainsi l'impact des conditions métaboliques de l'environnement sur la sensibilité aux thérapies. L'analyse par western-blot montre qu'une faible concentration de glucose inhibe fortement l'expression de MITF, sans modification de l'expression de AhR (fig 1F). De plus, le knock-down de MITF par ARN interférence inhibe l'expression des principaux gènes de la glycolyse et du cycle TCA, confirmant son rôle de senseur et de driver du métabolisme cellulaire (fig 1H).

Le knock-out (KO) de *AhR* par CRISPR-cas9 et son knock-down (KD) par ARN interférence dans les cellules résistantes ne suffisent pas à eux seuls pour restaurer un profil métabolique comparable à celui des cellules sensibles (fig 1A, 1C, 1G, 1H). L'inhibition génétique et chimique de AhR par le CH223191 ne suffisent pas non plus à prévenir la perte d'expression de MITF au cours de la privation de glucose dans les SKS (fig 1F). Enfin, le Knock-out de AhR ne permet pas d'empêcher l'augmentation de la résistance induite par la privation de glucose (fig 1E).

Figure 2

La plus faible mortalité des SKR par rapport aux SKS dans un milieu pauvre en glucose et supplémenté par du galactose, un substrat du cycle TCA, montre une fois de plus que les cellules résistantes ont une

dépendance accrue à l'OXPHOS (fig 2B). En ce sens, l'exposition à des doses croissantes de roténone, un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire, montre une IC50 plus faible, et donc une plus forte sensibilité à cette molécule dans les SKR que dans les SKS (fig 2C). En outre, l'exposition de nos lignées à 10 μ M de FCCP, un agent de découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale, réduit le taux de croissance cellulaire de façon significativement plus importante dans les SKR (fig 2D).

Afin de confirmer cette différence d'activité mitochondriale dans nos cellules, nous avons ensuite mesuré, par cytométrie en flux, à la fois la masse mitochondriale et le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) avec les marqueurs fluorescents MitoTracker™ Green et TMRM respectivement. Paradoxalement, les SKR exhibent une masse mitochondriale et un $\Delta\psi_m$ significativement plus faibles que les SKS (fig 2E et 2F). L'observation des mitochondries par microscopie confocale avec la sonde MitoTracker™ Green semble montrer, quant à elle, des mitochondries davantage fusionnées dans les SKR que dans les SKS. Néanmoins, ces résultats suggèrent que le KO de AhR n'a pas d'influence sur ce phénomène (fig 2G).

Au cours de la phosphorylation oxydative, des électrons peuvent s'échapper de la chaîne respiratoire mitochondriale, induisant la formation d'anions superoxydes par réduction d'une molécule de dioxygène. Les mitochondries peuvent ainsi contribuer, dans des proportions variables, à la génération d'un stress oxydant dans la cellule. Nous avons donc mesuré les niveaux de ROS totaux et mitochondriaux dans les cellules sensibles (SKS) et résistantes (SKR) par cytométrie en flux. Les résultats montrent que les SKR produisent davantage de peroxyde d'hydrogène dans le cytoplasme et d'anions superoxydes dans les mitochondries, tel qu'observé après marquage de nos cellules par H2-DCFDA et MitoSOX™ respectivement (fig 2H et 2I). De plus, l'absence de AhR dans le SKR semble diminuer le niveau d'anion superoxyde mitochondrial (Fig 2I).

Figure 3

Afin de caractériser les programmes transcriptionnels associés à la résistance aux BRAFi, nous avons réalisé un séquençage de l'ARNm des lignées SKS et SKR, dans des conditions de culture normales ou après privation de glucose, puis effectué une analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés avec l'outil Enrichr. Les résultats obtenus révèlent une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glutathion, la voie des pentoses phosphates et la ferroptose dans les cellules résistantes (fig 3A). De même, la privation de glucose dans nos cellules entraîne aussi une augmentation d'expression des gènes de la ferroptose (fig 3B). Il s'agit d'une forme spécifique de mort cellulaire programmée, médiée par la peroxydation massive des lipides membranaires.

La sensibilité d'une cellule vis-à-vis de la ferroptose est conditionnée, parmi d'autres facteurs, par la quantité de fer labile (ions ferreux Fe²⁺) dans son cytoplasme (fig 3C), responsable de la propagation

de la peroxydation lipidique à travers les membranes par l'intermédiaire de la chimie de Fenton. La mesure du pool d'ions ferreux, avec la sonde fluorescente FerroOrange, montre une quantité significativement plus importante dans les SKR que dans les SKS (fig 3D). Ce résultat est cohérent avec la plus forte expression des chaînes lourdes et légères de la ferritine (*FTH1* et *FTL* respectivement) par RTqPCR dans les SKR (fig 3C-1), des protéines régulant le stock de fer intracellulaire.

Un autre facteur conditionnant la susceptibilité à la ferroptose est la capacité de la cellule à synthétiser une quantité suffisante de glutathion total, mais aussi à régénérer constamment sa forme oxydée (GSSG) sous forme réduite (GSH). Cette capacité de régénération du glutathion permet à l'enzyme GPX4, dont l'activité dépend du glutathion réduit, d'accomplir sa mission de détoxification des peroxydes lipidiques (fig 3C-2). Nous avons donc mesuré le ratio entre les formes réduite et oxydée du glutathion à l'aide d'un test colorimétrique dans les SKS et les SKR, invalidées ou non pour le gène *AhR* (CRISPR-Cas9). Ce ratio est significativement plus faible dans les SKR (fig 3E), ce qui veut dire que la proportion de forme réduite est plus faible dans ces cellules. Le knock-out de *AhR* par CRISPR-Cas9 induit une augmentation de ce ratio dans les SKR, favorisant ainsi la forme réduite aux dépens de la forme oxydée, mais ne semble pas induire de changement dans les SKS.

Nous avons ensuite mesuré directement le niveau de lipides peroxydés sur nos cellules par cytométrie en flux avec la sonde fluorescente C11-BODIPY™. La proportion de lipides peroxydés est modérément plus élevée dans les SKR par rapport aux SKS à l'état basal, et cette différence devient beaucoup plus importante après déclenchement d'un stress oxydant avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'augmentation de la peroxydation lipidique après traitement par IKE, un puissant inducteur de ferroptose, est plus importante dans les SKR. Le traitement de nos cellules par roténone, en revanche, ne semble pas induire de changement sur le degré de peroxydation lipidique. Enfin, la privation de glucose provoque, à la fois dans les SKS et dans les SKR, une augmentation significative du ratio de peroxydation (fig 3F).

La ferroptose étant étroitement liée aux lipides (fig 3B-3), nous avons mesuré la quantité et la localisation des gouttelettes lipidiques dans nos cellules. Même si leurs fonctions ne sont pas encore totalement élucidées, il est aujourd'hui admis que les gouttelettes lipidiques peuvent jouer plusieurs rôles, comme le stockage temporaire des acides gras, leur transport entre différents compartiments cellulaires, la modulation des fonctions mitochondriales, ou encore la signalisation. Plus particulièrement, plusieurs auteurs ont montré qu'elles servent de réservoirs pour les lipides neutres non oxydés, qui y sont stockées sous forme estérifiée afin de les protéger de la peroxydation, préservant ainsi la cellule de la ferroptose. Nous avons donc analysé le contenu en gouttelettes lipidiques dans nos cellules par microscopie, à l'aide d'un marquage par Lipidspot 610, Interchim ou

en utilisant le contraste d'interférence différentiel (DIC). En combinant les résultats de ces différentes approches, nous constatons que le nombre moyen de gouttelettes lipidiques par cellule est légèrement plus élevé dans les SKS que dans les SKR. Le knock-out de AhR ne semble pas induire de changement significatif dans les SKS. En revanche il induit une nette diminution du nombre de gouttelettes dans les SKR (fig3G et 3H).

Enfin, la mesure de l'expression par RTqPCR de divers gènes impliqués dans la régulation de la ferroptose révèle une différence significative entre SKS et SKR pour certains d'entre eux (fig 3I). Premièrement nous observons une diminution, dans les SKR, de l'expression des gènes *GPX4* et *FASN*, qui codent pour les enzymes catalysant respectivement la détoxification des peroxydes lipidiques et la synthèse *de novo* d'acides gras saturés. Deuxièmement, nous observons que les SKR expriment de façon plus importante le gène *SIRT1*, codant pour une histone désacétylase, dont il a été montré qu'elle favorise la ferroptose²¹⁵. Nous observons également une forte surexpression de l'antiporteur cystine/glutamate *SLC7A11* dans ces cellules, un gène clé dans la régulation de la ferroptose, indispensable pour la synthèse du glutathion. Par ailleurs, les SKR surexpriment aussi les gènes *FTL* et *FTH1*, codant pour les sous-unités de la ferritine évoqués précédemment. De façon intéressante, ces différences d'expression observées entre les SKS et les SKR disparaissent dans la lignée SKR KO *AhR*, à l'exception du gène *SIRT1*.

Figure 4

Certains de nos résultats précédents convergent fortement vers une susceptibilité plus importante des SKR à l'égard de la ferroptose. Nous avons donc évalué l'IC50 de trois agents chimiques inducteurs de ferroptose sur nos cellules. Les données recueillies révèlent une IC50 de l'érastine, l'IKE et le FIN56 significativement plus faibles pour les SKR, corroborant ainsi leur sensibilité accrue à cette mort cellulaire. De plus, le comptage microscopique de nos cellules après co-marquage à l'iodure de propidium et au YO-PRO®, confirme que la mort induite par l'érastine, l'IKE et le FIN56 est plus importante dans les SKR et majoritairement non-apoptotique. Ne s'agissant pas d'apoptose, nous supposons que la mortalité cellulaire observée est provoquée par la ferroptose. Cette sensibilité des SKR est remarquablement moins importante après knock-out du gène *AhR*, telle qu'observée à la fois par IC50 et par mesure de la mortalité non-apoptotique.

Afin de déterminer si ces trois molécules inductrices peuvent réduire l'émergence de cellules résistantes au cours du traitement par BRAFi, nous avons exposé un mélange cellulaire, constitué d'autant de SKS que de SKR, à une combinaison de vemurafenib et d'IKE. La capacité constitutive des cellules sensibles et résistantes à émettre une fluorescence verte et rouge respectivement nous

permet de mesurer la proportion de chacune d'elle à l'issue de l'expérience. Ainsi, nous avons constaté que l'utilisation conjointe d'un BRAFi et d'un inducteur de ferroptose réduit significativement le nombre de cellules persistantes, à la fois sensibles et résistantes, en comparaison de l'exposition à l'une ou l'autre des molécules isolées. Ces résultats montrent donc *in vitro* qu'une telle stratégie thérapeutique pourrait améliorer la survie des patients ayant un mélanome muté *BRAF* V600.

Figure 5

Les SKR ayant de meilleures capacités de migration et d'invasion que les SKS, nous avons également évalué l'efficacité des inducteurs de la ferroptose (érasitine et IKE) pour contrer ce phénotype. Une expérience de cicatrisation menée sur les SKR traitées par des concentrations croissantes d'érasitine ou d'IKE a montré une réduction significative de leur capacité de migration. La même expérience menée sur des SKR KO pour le gène AhR montre des résultats équivalents à ceux observés dans la lignée sauvage pour les deux molécules. Parallèlement, l'observation microscopique de sphéroïdes formés à partir de la lignée SKR, permettant ainsi d'observer leur invasion à travers une matrice de collagène, révèle que des concentrations de plus en plus élevées d'érasitine ou d'IKE réduisent progressivement la croissance du sphéroïde en comparaison de la condition non traitée.

Article

Ferroptosis as a therapeutic opportunity to counteract BRAFi-resistance in melanoma

Cyrille Berra ^{1,2}, Héloïse M. Leclair ¹, Anthony Sebillot ³, Marie-Dominique Galibert ^{1,2}, and Sébastien Corre ^{1,#}

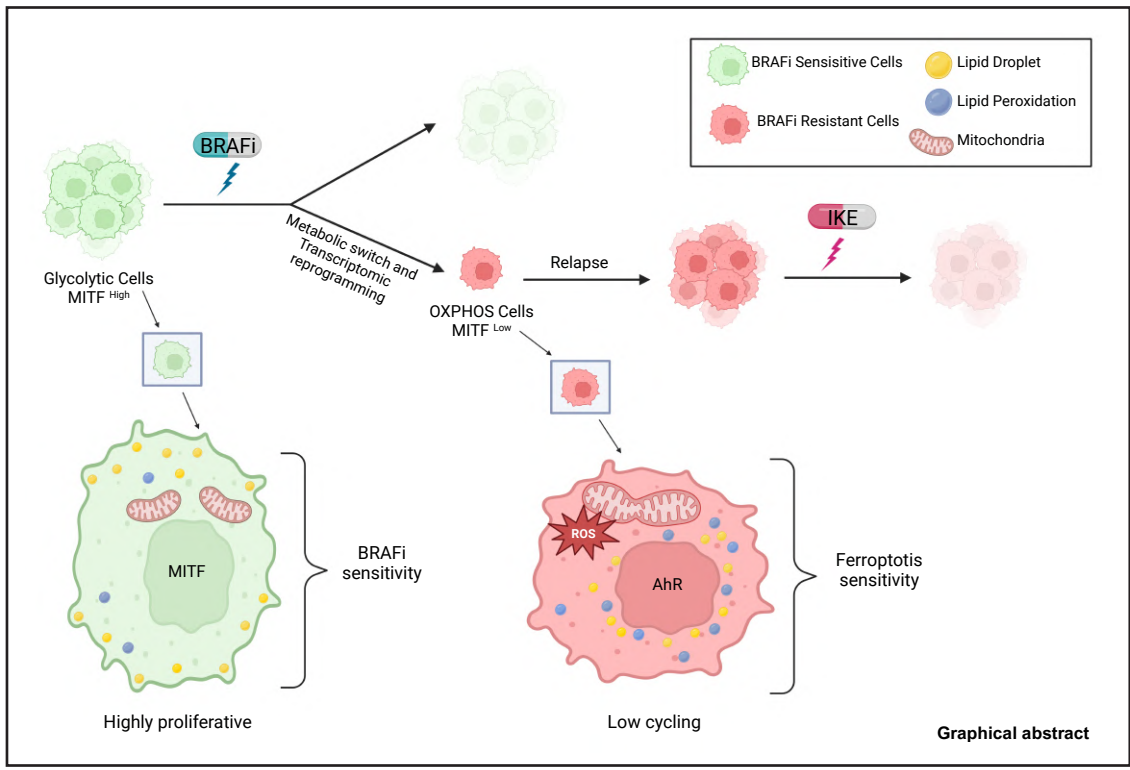
¹Univ Rennes, CNRS, INSERM, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) – UMR6290, ERL U1305, F-35000 Rennes, France.

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

#Corresponding authors (sebastien.corre@univ-rennes1.fr)

Abstract

Drug resistance limits the achievement of persistent cures for the treatment of melanoma, in spite of the efficacy of the available drugs. The aim of the present study was to explore the involvement of transcription regulation in the control of metabolism involved in melanoma resistance. In this context, we examined metabolic profiles of resistant cells and found that melanoma cells switched their metabolism from a glycolytic in BRAFi sensitive to an OXPHOS dependency in resistant cells. Interestingly, this switch was associated with a balance of expression and activity between MITF and AhR transcription factors. This metabolic rewiring was also associated in resistant cells with an increase of mitochondrial activity, the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and an increase of lipid peroxidation leading to a greater capacity for ferroptosis activation in resistant cells. Thus, we were able to show that ferroptosis constituted a therapeutic opportunity to target resistant melanoma cells with an increase of sensitivity to ferroptosis inducers in these cells, enhanced in a context of a strong activity of the AHR transcription factor.



Introduction

Metabolic rewiring is a hallmark of malignant transformation across all cancer types (Boroughs et DeBerardinis 2015; Kroemer et Pouyssegur 2008; Ward et Thompson 2012). The tumor microenvironment, which is often poorly vascularized, subjects cancer cells to oxygen and nutrient deprivation, both of which drive metabolic changes promoting their survival and growth under such stressful conditions. Rapid proliferation increases demand for energy required for macromolecular biosynthesis. As a result, central carbon metabolism is frequently altered in transformed cells. To escape from and survive outside of the primary tumor, invasive tumor cells require metabolic flexibility, first to fuel the high energy demanding migratory process (Zanotelli et al. 2018), and second to endure the nutrient-limiting environments that they might encounter. Many tumor types including melanoma rely on such metabolic rewiring to promote their growth and mediate resistance to therapeutic treatment.

Melanoma remains one of the most widespread types of cancer in western countries, and its incidence is still increasing (Leiter, Keim, et Garbe 2020). Melanoma is a complex and aggressive cancer type that contains different cell subpopulations displaying distinct phenotypes within the same tumor. Glucose, glutamine (Baenke et al. 2016) and fatty acid (Alicea et al. 2020; Vivas-García et al. 2020) metabolic reprogramming, a hallmark of cell transformation, are essential for melanoma cells to adopt these different phenotypic states necessary for adaptation to their environment. In recent years, immunotherapy (Y. Liu et al. 2021) and targeted therapies have changed the treatment scenario for advanced melanoma (Larkin 2014; Koelblinger, Thuerigen, et Dummer 2018; Robert et al. 2014). Selective inhibitors of V600E mutated form of the BRAF kinase, such as vemurafenib, dabrafenib and encorafenib, prolong survival of patients harboring this mutation (Bollag et al. 2010; Hauschild et al. 2012; Koelblinger, Thuerigen, et Dummer 2018). However, the onset of tumor resistance observed following this treatment led to the development of combo therapies with BRAF and MEK inhibitors as the current standard of care (Larkin 2014; Robert et al. 2014; Dummer et al. 2018). Unfortunately, dual therapy, although being able to provide more durable disease control compared to BRAF inhibitors alone, is also plagued by the development of drug resistance (Shirley 2018). Several pieces of evidence indicate that melanoma cells resistant to targeted therapy can exhibit distinct metabolic profiles characterized by specific transcriptional programs. These cells also possess the ability to transiently shift their phenotype under treatment or microenvironmental pressure to an invasive and treatment-resistant state, which is characterized by slow-cycling cells and elevated OXPHOS metabolism (Hoek et al. 2008).

BRAF-mutant melanoma patient-derived xenografts (PDX) exposed to MAPK inhibitors revealed up to four distinct subpopulations of drug-tolerant cells co-occurring within the same post-therapy minimal residual disease (MRD) and established through non-mutational adaptive events. These states are characterized by high (the pigmented state), intermediate (the starved state), and low (the invasive and neural crest stem cell states) levels of the Microphthalmia associated Transcription Factor (MITF) expression and activity (Rambow et al. 2018; Tsoi et al. 2018; Müller et al. 2014). MITF is a key regulator of phenotypic identity and melanoma cell fate, able to promote differentiation and proliferation (Goding et Arnheiter 2019). Low levels of MITF are associated with invasion, enhanced tumor-initiating capacity (Carreira et al. 2006; Cheli et al. 2012), as well as with drug-resistant and slow-cycling phenotypes (Müller et al. 2014; Rambow et al. 2018). Importantly, nutritional and metabolic signals in the microenvironment may downregulate MITF expression at both transcriptional and translational levels (Falletta et al. 2017; Falletta, Goding, et Vivas-García 2022; Ferguson et al. 2017; Vivas-García et al. 2020). This downregulation impairs proliferation while promoting invasion, thereby supporting MITF's role as a central coordinator of nutrient signaling and cell behavior. MITF largely participates in controlling the metabolic landscape by providing both the fuel required for the increased energy consumption of a highly replicative cell, and the metabolic bricks to build new macromolecular structures, such as membrane components and DNA. On the contrary, low MITF levels in melanoma cells presumably contribute to the establishment of a slow-cycling phenotype, as well as the metabolic abnormalities generally associated with therapy-resistance (Gonçalves et al. 2021). Furthermore, MITF controls TCA cycle by directly regulating the enzyme succinate dehydrogenase (SDHB) involved in succinate level (Louphrasitthiphol et al. 2019). MITF, also directly regulates the expression of PGC1 α and oxidative phosphorylation (Haq et al. 2013) and is a key inducer of lipogenic enzyme stearoyl-CoA desaturase (SCD) regulating the degree of FA saturation that determines the balance between the amount of intracellular long chain Saturated and Fatty Acids (SFAs) and the mono-unsaturated fatty acids (MUFAs). SCD is required for MITF^{High} melanoma cell proliferation (Vivas-García et al. 2020). In melanoma, the repression of MITF sensitizes melanoma cells to ROS levels through the direct regulation of genes involved in the response to oxidative stress. MITF has also been reported to activate expression of NRF2, a key regulator of antioxidant signaling (Han et al. 2020). SOX10 is, like MITF, heterogeneously expressed in melanoma, and has been proposed as a regulator of phenotype switching in cutaneous melanoma (Capparelli et al. 2022).

Studies carried out on understanding the molecular and metabolic plasticity of melanoma cells have mainly focused on the role of MITF, in particular via the control of its level of expression and activity. Recently, we identified the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), a ligand dependent transcription factor, of the b-HLH-PAS family as a key player of melanoma progression. First, we uncovered its capacity after activation to promote the acquisition of resistance to targeted therapy (Corre et al. 2018). Second, we demonstrated its critical role in the control of melanoma plasticity favoring a dedifferentiated and invasive phenotype (Paris et al. 2022). Global metabolomics analysis of $Ahr^{-/-}$ and $Ahr^{+/+}$ mice showed that hundreds of metabolites had their circulating levels significantly altered by loss of Ahr , indicating that AhR exerts important metabolic effects across multiple scales (e.g., organism, organ, cell, organelle) such as nitrogen elimination, peroxisomal fatty acid oxidation and mitochondrial metabolism (Granados et al. 2020). AhR also played a critical role to control antioxidant response in cells (Dietrich 2016).

In this study, we deepened the understanding of the metabolic changes associated with resistance to BRAF inhibitors in melanoma and underlined the specific role of AhR in this process. We confirmed that melanoma resistant cells switched towards an OXPHOS metabolism associated with an increase of mitochondrial metabolism and the accumulation of reactive oxygen species. We were also able to show that the BRAFi-resistant cells activated more importantly different metabolic pathways such as the glutathione metabolism and the peroxidation of polyunsaturated lipids, leading to BRAFi-resistant cells predominantly activating ferroptosis. Thus, we were able to identify a therapeutic vulnerability of resistant BRAFi cells which seems to depend on the level of expression and activity of the AhR transcription factor. Treatment with different ferroptosis inducers would therefore make it possible to treat resistant cells and open up new opportunities for patients.

Results

BRAFi resistance is associated with metabolic changes

We first used the Seahorse metabolic flux to measure glycolytic rate, named glycoPER and oxygen consumption rate OCR in BRAFi sensitive (SKS) and resistant (SKR) cell lines invalidated or not for AhR transcription factor by CRISPR-Cas 9 technology (**Appendix Figure S1A-B**). Glycolysis was significantly reduced in SKR compared to SKS while oxygen consumption rate (OCR, OXPHOS) was increased (**Fig 1A**). Thus, SKR culture medium was less acidic, less concentrated in lactate and conversely more concentrated in glucose and pyruvate (**Fig 1B**). The lack of AhR did impact slightly the metabolism of both BRAFi-sensitive and resistant cell lines with a decrease of glycolysis and an increase of OXPHOS (**Fig 1A**).

We were able to confirm by analysis of the signatures associated with glycolysis (**Table 1**) in the RNA seq data established in the SKMel28 cell lines that these pathways were significantly down-regulated at transcriptomic level in BRAFi-resistant cells (**Fig 1C**). Data that have been confirmed in BRAFi-resistant cell lines (from the CCLE) (Barretina et al. 2012) and in dedifferentiated melanoma cell lines (data from Tsoi) (Tsoi et al. 2018) (**Fig 1D**). The impact of the loss of AhR on the average gene signatures expression was minimal when cells were cultured in a medium highly concentrated in glucose (10 mM) (**Fig 1C**). When we analyzed the impact of glucose deprivation on cell sensitivity to BRAFi, we noticed that glucose deprivation (1-2 mM vs 10 mM) made cells more resistant to BRAFi treatment in SKS and SKR (**Fig 1E**). In the absence of AhR transcription factor, cells were less resistant and the impact of deprivation to increase this resistance was reduced (**Fig 1E**). Because it has been clearly established that the level of expression and activity of the transcription factors MITF and AhR has been associated with the molecular and metabolic sensitivity and plasticity of melanoma cells, we analyzed their level of expression in response to different concentrations of glucose in the culture medium. First strong expression of MITF was observed in BRAFi-sensitive melanoma cells (green) and resistant cells no longer express MITF (**Appendix Figure S1C**) while AhR protein expression level was relatively stable in the different cell lines. Level of mRNA expression of *AhR* and *MITF* seemed to be inversely correlated in melanoma cell lines (n=77, Depmap) (**Appendix Figure Fig S1D**). Starvation of cells in glucose (1-2 mM vs 10 mM) led to a significant decrease in MITF protein expression in SKS cells while AhR protein expression level remained unchanged in SKS or in SKR (**Fig 1F and Appendix Figure S1E**). Knockout of *AhR* or its inactivation by the specific inhibitor CH-223191 (10 μ M) did not influence the dysregulation of the expression level of MITF in response to the level of glucose in the culture

medium (**Fig 1F**). Comparable results were observed in the 501Mel melanoma line which expresses more strongly MITF (**Appendix Figure S1E-F**). The analysis of the RNAseq expression data in the SKS and SKR lines showed that glucose deprivation significantly reduced the expression of genes associated with glycolysis (**Fig 1G and Appendix Figure S1G**). This inhibition of the expression of glycolysis genes was mainly associated with the loss of expression and activity of the transcription factor MITF and, to a lesser extent, with the presence or absence of AhR (**Fig 1G-H and Appendix Figure S1G**). Indeed, depletion of MITF by RNA interference (siRNA) (**Fig 1H**) in SKS or in SKS KO for MITF (RNAseq data from Dilshat et al., 2021) (Dilshat et al. 2021) (**Appendix Figure S1H**) cells cultured in a high concentration of glucose (10 mM) led to a significant decrease in the level of expression of genes involved in glucose metabolism, whereas depletion of AhR only slightly impacted their expression level (**Fig 1G and Appendix Figure S1G**). In conclusion, we were able to confirm a decrease in the expression of MITF in the SKR lines also observed during glucose deprivation of the culture medium leading to a metabolic and energy change in the cells (OXPHOS) favoring their resistance to BRAFi.

The production of pyruvate via glycolytic metabolism of glucose yields 2 net ATP, the production of pyruvate via glycolytic metabolism of galactose yields no net ATP, forcing cells to have an increased reliance on oxidative phosphorylation (OXPHOS) for energy (**Fig 2A**) (36 ATP). We confirmed that SKR had an increased reliance on oxidative phosphorylation (OXPHOS) than glycolysis since glucose starved cells which were supplemented with galactose were able to proliferate again (**Fig 2B**). The proliferation of SKS cells, on the other hand, is essentially dependent on glycolysis. This dependence on OXPHOS to produce the energy necessary for the SKR was not simply due to the loss of expression of the MITF factor, expression which was not restored in the presence of galactose (10 mM) in the medium (**Fig 2B**). SKR were more dependent than SKS to oxidative phosphorylation insofar as they were more sensitive to inhibition by rotenone (inhibitor of complex I of the mitochondrial respiratory chain) (**Fig 2C**). Comparable results were obtained using the uncoupler of mitochondrial oxidative phosphorylation FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) since it prevented SKR growth (**Fig 2D**). In order to confirm the difference in mitochondrial activity in SKS and SKR, we then measured by flow cytometry both mitochondrial mass using labeling MitoTracker™ Green FM Dye (Thermo Fischer Scientific) (**Fig 2E**) and changes in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) using the fluorescent dye (Tetramethylrhodamine Methyl Ester, TMRM (Thermo Fischer Scientific) (**Fig 2F**). SKR showed significantly lower mitochondrial mass than SKS (**Fig 2E**) but also significantly lower overall membrane potential

(Fig 2F). Fragmented mitochondria constitute the preferred morphological state when respiratory activity is low. When the bioenergetic state becomes critical, for example under nutrient deprivation or exposure to certain forms of stress, highly fused mitochondria are formed to optimize mitochondrial function and were associated with elevated OXPHOS activity (Westermann 2012). The analysis of mitochondrial morphology (labeled with Mitotracker Green) revealed that mitochondria from SKS were significantly more fragmented whereas mitochondria from SKR or SKR-KO were hyperfused (**Fig 2G**) confirming SKR dependency to OXPHOS. The formation of a large hyper fused mitochondrial network induced by vemurafenib with increased oxidative phosphorylation capacity has been already hypothesized to act as a possible mechanism of tumor cell death resistance (Ferraz et al. 2020).

Both as a consequence of normal electron transport and during mitochondrial dysfunction, electrons can escape from the electron transport chain to induce formation of superoxide anions by one-electron reduction of oxygen. This means that, under certain conditions, mitochondria can substantially contribute to the generation of cellular reactive oxygen species (ROS). We then compared in BRAFi sensitive (SKS) and resistant cells (SKR) both total and mitochondrial ROS levels using respectively 5-(and-6)-chloromethyl-20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) and MitoSOX probes, respectively. The level of total (**Fig 2H**) and mitochondrial (**Fig 2I**) ROS were significantly higher in SKR than in SKS. Also, the lack of AhR in SKR seemed to decrease the level of mitochondrial ROS (**Fig 2I**). It is indeed well established that AhR activation by its ligands promotes ROS formation in cells (Ghaffarian-Bahraman et al. 2022).

Induction of ferroptosis in BRAFi resistant melanoma cells

In order to characterize the transcriptional and metabolic changes associated with resistance to BRAF inhibitors, we performed mRNA sequencing of the SKS and SKR lines in normal culture conditions or after glucose deprivation (**Fig 3A-B**). Functional analysis (Enrichr) of genes differentially expressed between SKS and SKR revealed a decrease in genes associated with the Krebs cycle, OXPHOS in SKR and conversely an increase in glutathione metabolism, in pentose phosphate pathway and ferroptosis (**Fig 3A**). Similarly, glucose deprivation in SKMel28 cells led to a decrease in genes associated with the Krebs cycle and an increase in genes associated with ferroptosis (**Fig 3B**). Ferroptosis is an iron-dependent and peroxidation-driven form of cell death associated with multiple metabolic disorders and disrupted homeostasis (**Fig 3C**). Ferroptosis is distinct from apoptosis, necrosis and other types of cell

death. It is promoted by the high iron content of cell cytoplasm (**Fig 3C1**), regulated by several proteins involved in its importation (TFRC), storage (FTH1, FTL) or release of the labile iron pool (HMOX1). The excess of Fe^{2+} participates in the accumulation of ROS and lipid peroxides in cells through the Fenton reaction (Ke et al. 2022). Ferroptosis is also highly driven by inhibition of extracellular cysteine uptake through the Xc- system (SLC7A11, SLC3A2) and impairment of GPX4 activity (**Fig 3C2**). Inactivation of GPX4 induced by GSH depletion increases intracellular lipid peroxides, resulting in ferroptosis. Indeed, ferroptosis induction is associated with the accumulation and the peroxidation of PUFA through the accumulation of ROS (**Fig 3C3**). Lipid peroxidation during ferroptosis requires the activation of several key enzymes, such as acyl-coA synthetase long chain family member 4 (ACSL4) (Doll et al. 2017). Finally, Lipid droplets (LDs) serve as storage organelles for neutral lipids, such as triacylglycerol and sterol esters. LDs are also in dynamic contact with other organelles (such as mitochondria, the ER, peroxisomes, and lysosomes) to facilitate the exchange of lipids, metabolites, and ions (Olzmann et Carvalho 2019). It is widely accepted that increasing the formation of LDs protects cells from PUFA-induced lipotoxicity and ER stress. The number of LDs increases in the early stages, but decreases in the final stages of ferroptosis. The balance between the degradation and storage of LDs affects the sequestration of toxic lipid metabolic intermediates and the sensitivity to ferroptosis (Chen et al. 2020).

Because evidence suggests that increased iron in LIP (labile iron pool) is the main cause of triggering the Fenton reaction and promoting ferroptosis, we first analyzed the level of reduced iron (Fe^{2+}) in SKS and SKR cells after labeling with BioTracker™ FerroOrange Live Cell Dye (Merck). The results showed a significant increase of Fe^{2+} in SKR compared to SKS (**Fig 3D**), that could be explained by the increase of expression in BRAFi resistant cells of divalent metal ion transporter 1 (DMT1, also known as solute carrier family 11 member 2, SLC11A2), the ferritin complex (*FTL* and *FTH1*), *PRNP* and *TFRC* (**Appendix Figure S2A**). Starvation of SKMel28 cells in glucose (1-2 mM vs 10 mM) led to a significant increase of the expression of these genes (**Appendix Figure S2A**).

Ferroptosis induction is also related to the level of glutathione in cells and the subsequent inactivation of GPX4, we next analyzed the levels of total and oxidized glutathione (T-GSH and GSSG) using colorimetric assay (ElabSciences) in both BRAFi sensitive (SKS) and resistant (SKR) cell lines invalidated or not for AhR transcription factor (**Appendix Figure S2B**). The total level of glutathione in SKR was slightly higher than in SKS (**Appendix Figure S2B**) probably linked to the increased expression of Cys2/glutamate antiporter (Xc-) SLC7A11 in SKR (**Fig 3I**). In addition, the level of oxidized glutathione (GSSG) in SKR also seemed to

be increased in SKR vs SKS since the ratio reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) was significantly decreased in SKR compared to SKS (**Fig 3E**), thereby reducing the pool of GSH to remove intracellular ROS. The loss of AhR particularly in SKR increased the ratio GSH/GSSG to a comparable level with SKS (**Fig 3E**). This result is in agreement with the reduction of the GSH/GSSG ratio previously observed in B16 melanoma cells following the activation of AhR by its canonical ligands (BaP or FICZ) (Ghaffarian-Bahraman et al. 2022). It therefore seemed that BRAFi-resistant cells accumulate more significantly oxidized glutathione (GSSG) and less reduced glutathione (GSH) in link with AhR activity. This agreed with the increase in the expression of the enzymes involved in the metabolism of glutathione, in particular after deprivation of glucose in the culture medium (**Appendix Figure S2C**).

It has been previously shown that BRAF V600E mutation promoted accumulation of long chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and that in patients with melanomas harboring the BRAF V600E mutation, immunomodulatory lipids and long chain fatty acids were significantly increased in the non-responder cohort (Turner et al. 2022, 20). We first confirmed using metabolomic data from the CCLE (Depmap), that among metabolites that are significantly enriched between sensitive and resistant cells, long chain PUFA (were significantly enriched in BRAFi resistant cells (**Appendix Figure S2D**). This is consistent with the decreased expression of *SCD1* and *FASN* (**Appendix Figure S2E**) in resistant cells or after glucose deprivation, which promotes transformation into MUFA in cells. Abnormal accumulation of reactive oxygen species (ROS) associated with a disequilibrium of scavenging factor systems such as superoxide dismutase (SODs), catalase, glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) lead to the peroxidation (-OOH) of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and promote the induction of ferroptosis. We next analyzed the level of lipid peroxidation (LPO) after labeling of SKMel28 cells using BODIPY™ (581/591) C11 (Thermo Fisher Scientific) (**Fig 3F**). The level of lipid peroxidation in SKR seemed to be significantly up-regulated compared to SKS in basal conditions but much more after induction by H₂O₂, by the inducer of ferroptosis IKE (Imidazole Ketone Erastin) or after glucose deprivation (**Fig 3F**). Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (*Acs14*) is a critical determinant of ferroptosis sensitivity by catalyzing polyunsaturated fatty acid-containing lipid biosynthesis and promoting the accumulation of lipid peroxidation. The analysis of *ACSL4* expression revealed a significant up-regulation in SKR vs SKS which is reversed in the absence of the AhR transcription factor (**Appendix Figure S2F-G**). AhR seemed to participate in lipid peroxidation in SKR required for the induction of ferroptosis notably through the regulation of *ACSL4* expression. Lipid droplet formation via DGAT-mediated triglyceride (TAG) synthesis may act as a sink for phospholipid-

derived PUFAs, thus preventing their peroxidation; lipid droplet biogenesis may also restrict lipid peroxidation by sequestering already damaged, peroxidized PUFAs (ox-PUFAs) to suppress the propagation of lipid peroxidation (Petan 2023). We then analyzed the content and distribution of LDs (labeled with Lipidspot 610, Interchim or visualized with Differential Interference Contrast (DIC) microscopy) in SKS and SKR cells (**Fig 3G**). The number of LDs in SKS was significantly higher than in SKR (**Fig 3H**). This result is related to a reduced storage capacity of peroxide PUFAs in resistant cells. The lack of AhR in SKR further reduced the number of LDs. In parallel with the quantitative analysis of the number of LDs in the cells, the analysis of their subcellular localization in the different cells showed a localization closer to the nucleus in the SKRs than in the SKS where the LDs are mainly localized at the level of the cytoplasmic membrane (**Appendix Figure S3A-B**). This difference in sub-cellular localization could be closely linked to the interaction of LDs with other organelles (mitochondria, ER, etc.) in resistant cells to promote either energy exchanges or promote the peroxidation of lipids stored in LDs. In the absence of the AhR transcription factor, LDs were found less close to the nucleus but as in the SKS closer to the plasma membrane (**Appendix Figure S3A-B**). Perilipin 3 (PLIN3) is ubiquitously expressed and plays significant roles in the formation of TAG and LD biogenesis and in lipolysis while it has been degraded (Najt, Devarajan, et Mashek 2022). PLIN3 expression was significantly increased in SKR compared to SKS in an AhR dependent manner (**Appendix Figure S2G-H**). However, this increase in expression was not linked to an increase in the number of LDs in the SKRs. Nevertheless, the decrease in PLIN3 expression following RNAi depletion in SKRs but not in SKS slightly increased the number of LDs as well as decreased their localization close to the nucleus (**Appendix Figure S3C-E**). According to these results, we suspected that AhR in SKR induces overexpression of PLIN3 promoting perinuclear localization of LDs and potentially promoting lipid peroxidation and therefore ferroptosis. Thanks to these different experiments, we were able to show in SKR compared to SKS a significant upregulation of intracellular or mitochondrial ROS, a decrease of reduced glutathione (GSH), an increase of long chain PUFAs and an increase of lipid peroxidation. Also, we observed a significant difference in lipid droplets number and sub-cellular localization in SKR, with a distribution close to the nucleus. All these cellular changes participate to make BRAFi-resistant cells more prompt to induce ferroptosis in order to defend against stress. The induction of metabolic changes favoring ferroptosis seemed also to be dependent on a high expression and activity of AhR transcription factor since its depletion in SKR counteracts this phenotype potentially through the regulation of *PLIN3* and *ACSL4* expression (**Appendix Figure S2G-H**).

Furthermore, in order to confirm the activation of ferroptosis pathway in SKR compared to SKS, we first analyzed the level of expression of several genes defined as positive markers of ferroptosis (FTL, FTH1, SLC7A11, HMOX1...) from the FerrDb database, dedicated to ferroptosis regulators and markers (<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>) (Zhou et Bao 2020). The level of expression of positive markers was significantly enriched in SKR (*NFE2L2*, *PTGS2*, *SIRT1*, *FTL*, *FTH1* and *SLC7A11*) while the level of negative markers was reduced (*GPX4*, *FASN*) confirming the activation of ferroptosis (**Fig 3I**). Interestingly, the lack of AhR transcription factors in SKR led also to the downregulation of expression of ferroptosis markers (**Fig 3I**). In addition, the analysis of gene expression for the different drivers of ferroptosis (<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>) in BRAFi sensitive (green) or resistant (red) melanoma cells from the CCLE (**Appendix Figure S4A**) or from the lab (**Appendix Figure S4B-C**) showed an enrichment of several of these genes in resistant cells but also in dedifferentiated melanoma cells (**Appendix Figure S4D**) (Tsoi et al. 2018). Indeed, we confirmed that the expression of several drivers of ferroptosis was upregulated in SKR compared to SKS (**Appendix Figure S4E**) and that the lack of AhR in SKR cells prevented this induction. Using the CellMiner database (<https://discover.nci.nih.gov/cellmineradb>) in various cancer cell lines, we showed that the inducer of ferroptosis (Erastin) (IC50) is significantly more efficient while ferroptosis markers and drivers' genes (Z-score) were highly expressed (**Appendix Fig S4F**). Volcano plots also showed a significant positive correlation ($p < 0.001$) between *AhR* expression level and Erastin sensitivity (**Appendix Fig S4F**). In conclusion, the AhR transcription factor seemed to increase the induction of genes involved in induction of ferroptosis.

BRAFi resistance cells are more sensitive to ferroptosis inducers

Insofar as BRAFi-resistant cells showed significantly increased ferroptosis activation capacities compared to sensitive cells, we then tested different ferroptosis inducers on these cells. After measuring the IC₅₀ for different ferroptosis activators (Erastin, IKE, FIN56) in SKS and SKR, we were able to show that SKR were indeed significantly more sensitive to ferroptosis inducers than SKS, with a factor ranging from 2 to 4 (**Fig 4A-C**). Comparable results were obtained for two other couples of BRAFi-sensitive and resistant melanoma cells lines (M229S/R and M238S/R) (**Appendix Figure S5A**). We then confirmed that SKR were indeed significantly more sensitive to ferroptosis than SKS since the level of necrotic cells after 16h (time for the highest induction of necrosis (**Appendix Figure S5B**)) of treatment with ferroptosis inducers (Erastin, IKE, FIN56) was significantly higher in SKR (**Fig 4D-F**). Interestingly, the lack of AhR in both SKS and SKR cells prevented the activation of necrosis by ferroptosis inducers (Erastin, IKE, FIN56). These results showing an increased sensitivity of BRAFi-resistant melanoma cells to ferroptosis inducers made it possible to consider new therapeutic strategies for cells in addition to targeted therapies. In order to illustrate the respective behavior of BRAFi-sensitive and resistant cells to targeted therapy and to inducers of ferroptosis, we treated a 50/50% mix of SKS (constitutively expressing GFP in green) and SKR (constitutively expressing dTomato in red) for 4 days with BRAFi (Vemurafenib, 0.5 μ M), IKE (0.2 μ M) or both. After treatment of the mix of SKS and SKR cells, we visualized using fluorescent microscopy and quantified by flow cytometry the number of residual cells after treatment. The percentage of mortality after Vem treatment of SKS was significantly higher than for SKR (**Fig 4G, red**). Conversely, treatment with IKE eliminates SKR but not SKS (**Fig 4G, blue**). Combination of Vem with IKE thus induced the mortality of both SKS and SKR cells (**Fig 4G, green**).

Because, SKR have higher migration and invasive capacities than SKS, we first evaluated the role of the inducers of ferroptosis (Erastin and IKE) to counteract cell migration by performing wound-healing assays of SKR after or not genetic depletion of AhR (KO AhR). Treatment with increasing concentrations of Erastin (**Fig 5A**) or IKE (**Fig 5B**) significantly reduced migration capacities of SKR cells. The lack of AhR slightly diminished the impact of ferroptosis inducers to counteract cell migration (**Fig 5A-B**). Next, we analyzed the invasive properties of SKR cell lines using tumor-spheroid assays, which mimic the 3D architecture of melanoma in the presence or absence of ferroptosis inducers (Erastin or IKE). Both treatments of SKR with Erastin (**Fig 5C**) or IKE (**Fig 5D**) significantly reduced invasive capacities of SKR at 4 and 7

days. In conclusion, we were able to show that treatment with ferroptosis inducers such as IKE could target BRAFi resistant cells and could prevent their aggressive phenotype.

Discussion

The acquisition of resistance to targeted therapy can be in part mediated by transcriptional reprogramming, eliciting a phenotypic switch towards distinct drug-tolerant transcriptional states of melanoma cells state (Rambow et al. 2018; Tsoi et al. 2018).

Here, we identified that in addition to this transcriptional reprogramming, drug resistant melanoma cells switch their metabolism from glycolysis to oxidative respiration supported by a change in mitochondrial activity (**Graphical Abstract**). This change of energy metabolism would favor the accumulation of oxygen species (ROS) in drug resistant cells. Indeed a growing body of evidence indicates that compared with normal healthy tissue, tumor tissues, including melanoma, exhibit a high level of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Meyskens et al. 2001; Cesi et al. 2017). Oxidative stress and redox homeostasis have been shown to be involved at each stage of a malignant melanocyte transformation, called melanomagenesis, as well as during drug resistance. Drug resistance to BRAFi induces metabolic switching from aerobic glycolysis to mitochondrial respiration and consequently increased ROS levels (Khamari et al. 2018). Indeed, BRAF^{V600E} melanoma cells that have developed resistance to inhibitors also display increased OXPHOS, increased dependency on mitochondria for survival, increased ROS production and associated switch from glucose to glutamine metabolism (Haq et al. 2013; Baenke et al. 2016). In addition, NRF2, a transcription factor regulating antioxidant defense, is known to be activated by ERK, other MAPKs and Akt. Thus, BRAF mutations also activate antioxidant defense downstream of the NRF2 pathway (Khamari et al. 2018; Cucci et al. 2023). Again, BRAF inhibitor treatment might also lead to increases in ROS by this mechanism. In connection with this, we were able to implicate the AhR transcription factor in this metabolic reprogramming with a high level of expression and activity in resistant cells while sensitive cells have a high level of Mitf. Because AhR activation by its canonical ligands led to the increase of cellular ROS (Ghaffarian-Bahraman et al. 2022) and accordingly to the close regulation between AhR and NRF2 (Miao et al. 2005), both transcription factors participate to the accumulation of ROS in drug resistant melanoma cells through respectively their pro-oxidant and antioxidant functions.

In addition, we have shown in this study that drug resistant cells are prompt to induce ferroptosis. Ferroptosis has been studied in recent years in the context of melanoma (Talty et

Bosenberg 2021). In 2018, Tsoi et al. tested the combined effect of BRAF inhibitors and ferroptosis inducers *in vitro* and showed a dramatic decrease in the number of cells persisting after treatment of dedifferentiated melanoma cells (Tsoi et al. 2018). BRAFi resistant melanoma cells exhibit increased synthesis of polyunsaturated lipids which serve as substrates for lipoxygenase enzymes, and this change in lipid production forces a dependence on the enzyme GPX4 to prevent the accumulation of lipid peroxides and ferroptosis execution (Viswanathan et al. 2017). Knockout of upstream regulators of PUFA metabolism (ACSL4, LPCAT3) and inhibition of lipoxygenases prevent cell death due to inhibition of GPX4. However, the molecular mechanisms leading to increased susceptibility of resistant cells to BRAFi are not clearly established. In this study, we were able to establish by different approaches that the acquisition of BRAFi-resistance was associated with a change towards an increased mitochondrial energy metabolism (OXPHOS) but also with an accumulation of ROS and a disturbance of lipid-peroxidation and storage and of Iron and glutathione metabolisms (**Graphical Abstract**). These different metabolic changes in the resistant cells led to a higher capacity for ferroptosis activation. Wang et al. have shown previously that Wnt/ β -catenin signaling deficiency exacerbates ferroptosis in melanoma via the regulation of MITF through the downregulation of PGC1 α and SCD1, so that the generation of lipid peroxidation was prominently suppressed and ultimately ferroptosis is inhibited (H. Wang et al. 2022). These results are in agreement with the decrease in expression of MITF observed in cells resistant to BRAFi or during glucose starvation and its critical function to control metabolic rewiring such as TCA cycle (Louphrasitthiphol et al. 2019), fatty acid metabolism via SCD1 regulation (Vivas-García et al. 2020) or oxidative stress response (X. Liu et al. 2020). Here, we were able to show that the various changes involved were not simply associated with the loss of MITF in resistant cells but also with the overexpression and activity of the AhR transcription factor. Comparably to the phenotype switching model in which MITF^{high}/AXL^{low} was associated with the proliferative and BRAFi-responsive phenotype while MITF^{low}/AXL^{high} was associated with the invasive and resistant phenotype (Müller et al. 2014; Shao, Teramae, et Wells 2023), we observed such a balance with AhR. High combined AhR expression and activity in the absence of MITF in melanomas was associated with an OXPHOS phenotype, intracellular ROS accumulation, lipid peroxidation of PUFAs and dysregulation of glutamine metabolism. BaP activation of AhR led also to the decrease of PGC1 α expression (Lou et al. 2022). Moreover, we were able to implicate AhR in the regulation of the expression of different inducers and markers of ferroptosis. The role of AhR in the activation of ferroptosis has so far been little studied. However, Cui et al. have shown that L-kynurenine, the canonical AhR ligand induces

NK cell loss in gastric cancer microenvironment via promoting ferroptosis (Cui et al. 2023). AhR is also activated by reoxygenation during ischemia-reperfusion and induces ROS production, lipid peroxidation and ferroptotic cell death (Eleftheriadis et al. 2021). In addition, Kwong et al. have developed a nuclear receptor meta-pathway (NRM) model and described a close relationship between NRF2 and AhR expression levels with susceptibility to the ferroptosis inducer Erastin (Kwon et al. 2020). AhR and NRF2 expression and activity have to be tightly regulated to control ferroptosis in melanoma (Gagliardi et al. 2019; S. Wang et al. 2021).

We have finally shown that the activation of ferroptosis constitutes a new therapeutic opportunity in order to counteract targeted therapy resistance in melanoma. Tsoi et al. have been the first to propose the use of ferroptosis inducers such as Erastin to reduce the pool of persistent dedifferentiated melanoma cells upon combination with BRAFi (Tsoi et al. 2018). In addition, we deciphered transcriptional metabolic mechanisms and the critical role of AhR transcription factor to induce ferroptosis. Various studies in recent years have focused on identifying new strategies that come in combination with targeted melanoma therapies to improve therapeutic efficacy. These target in particular the specific metabolic pathways of resistant cells to induce ferroptosis. For example, the use of Sorafenib sensitized melanoma cells to vemurafenib by increasing ROS production through ferroptosis (Tang et al. 2020). Gambogic acid (GNA), a xanthone found in Gamboge through the upregulation of p53 expression induces ferroptosis in TGF- β 1-stimulated melanoma cells via the p53/SLC7A11/GPX4 signaling pathway (M. Wang et al. 2020). Increased patient response rates can be achieved by combining ferroptosis inducers with targeted therapies or immune checkpoint inhibitors. Recently developed ferroptosis inducers such as erastin, RSL3, ML162, ML210, JKE-1674, FIN56 and imidazole ketone erastin (for killing dedifferentiated melanoma cells) aim to be proposed and tested for melanoma patients by combining MEK and BRAF inhibitors. Such clinical trials haven't been started yet in melanoma. Other comparable strategies have been developed recently to overcome acquired resistance therapy. Talebi et al. have recently targeted lipid poly-unsaturation in therapy-resistant models by combining MAPK inhibition with preclinical FASN inhibitor TVB-3664 and attenuated cell proliferation and rendered cells exquisitely sensitive to a host of ROS inducers (Talebi et al. 2023). Vergani et al. have also shown that drug-resistant cells become more sensitive to BRAFi following lipid deprivation and that cells treated with the SOAT (a membrane-bound enzyme that catalyzes the biosynthesis of CE from long-chain fatty acyl-CoA and cholesterol) inhibitor avasimibe, displayed a higher sensitivity to Vemurafenib (Vergani et al. 2016).

Material and Methods

Cell culture and reagents

Human melanoma cell lines (SKMel28, 501Mel, M229, and M238) were grown in humidified air (37°C, 5% CO₂) in RPMI-1640 medium (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, Les Ulis, France) and 1% penicillin-streptomycin antibiotics (Thermo Fisher Scientific). SK28 (S+R) cells were obtained from J.C Marine at the VIB Center for Cancer Biology, VIB, Leuven, Belgium. M229 cells were obtained from Graeber's lab at the UCLA Molecular Biology Institute, Los Angeles, CA, USA. SKMel28. 501Mel cells (S) were obtained from the ATCC and 501Mel BRAFi-resistant cells (R) were obtained after three months of treatment with Vem (1 µM every 2 days). No difference of proliferation has been observed between resistant cells and parental ones. Melanoma cells were grown in the absence of BRAFi treatment but challenged every two weeks with BRAFi at the IC₅₀ dose of the sensitive corresponding cells to maintain a selective pressure. All cell lines were routinely tested for mycoplasma contamination.

Reagents

BRAF inhibitors:

-Vemurafenib (Vem, PLX4032) (Selleckchem, S1267)

AHR inhibitor:

-CH223191 (Selleckchem, S7711)

Ferroptosis inducers:

-IKE (Imidazole Ketone Erastin (PUN 30119), Selleckchem, S8877)

-Erastin (Selleckchem, S7242)

-FIN56 (Selleckchem, S8254)

Mitochondrial inhibitors:

-Rotenone

-FCCP

ROS inducers:

-H₂O₂ (311421, Sigma Aldrich)

Fluorescent probes:

-MitoTracker™ Green FM Dye (M7514, Thermo Fischer Scientific, USA)

-TMRN (Tetramethylrhodamine Methyl Ester) (T668, Thermo Fisher Scientific, USA)

-CM-H2DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate) (C6827, Thermo Fisher Scientific, USA)

-MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator (M36008, Thermo Fisher Scientific, USA)

-BODIPY™ 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentaméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène) (D3922, Thermo Fisher Scientific, USA)

-BODIPY™ 581/591 C11 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentaméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène) (D3861, Thermo Fisher Scientific, USA)

-DMSO (D8418, Thermo Fisher Scientific, USA)

CRISPR/Cas9 experiments

The AhR knockout was performed using CRISPR/Cas9 methodology. The guide sequence targeting AhR (Sigma-Genosys, St Louis, MO, USA) was cloned into the GeneArt CRISPR Nuclease vector according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Next, 501Mel or SKMel28 cells were transfected with the vectors and the cells seeded two days later in 96-well plates at 0.5 cells/well for single-cell clonal expansion. The clones of interest were validated by DNA-sequencing, western blot analysis and RT-qPCR.

RNA interference

siRNA were purchased from Sigma-Genosys (St Louis, MO, USA) : siCTR, siAhR#1 and #2, siMITF#1 and #2. Sequences for all siRNA are available in Supplementary Table 2 (EV2).

Cell density evaluation

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

Mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$)

After incubation, cells were detached, centrifuged ($160 \times g$ for 10 min) and suspended in 1 mL of PBS plus 20 nM TMRM. The mixture was incubated in the dark at 37 °C for 30 min, centrifuged ($160 \times g$ for 10 min), and suspended in 300 µL of PBS. Fluorescence emission were detected in a FACS LSRFortessa™ X-20 Cell Flow Cytometer (BD Biosciences) including the

BD FACSCanto™ Cell Analyzer, acquiring 10,000 events per sample. Data analysis and graphs were done using Flow Jo vX.0.7 software (Ashland, USA).

ROS Measurement

Cells were washed with PBS and were resuspended at 10^5 cells in 50 μ L reaction volume 5-(and-6)-chloromethyl-20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) and MitoSOX (Thermo Fisher Scientific, USA) were respectively used at a final concentration of 5 μ M to measure cytoplasmic ROS level and mitochondrial superoxide production. Cells were incubated in the dark at 37 °C for 30 min. After release from ice at different time points (20 and 40 min), the fluorescence of CM-H2DCFDA or MitoSOX was measured at $\lambda_{em} = 530\pm 30$ nm and $\lambda_{ex} = 489\pm 14$ nm, respectively, on a LSRFortessa™ X-20 Cell Analyzer cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo® software.

Dosage of intracellular Glutathione

Total, oxidized and reduced GSH levels in BRAFi-sensitive and resistant SKMel28 melanoma cells were quantified using GSH kit (Elabscience, E-BC-K030-M) according to the manufacturer's instructions (Rahman, Kode, et Biswas 2006).

Dosage of lipid peroxidation

Oxidized (FITC) and reduced (PE) lipid levels in BRAFi-sensitive and resistant SKMel28 melanoma cells were quantified using BODIPY™ 581/591 C11 (Thermo Fisher Scientific, USA) respectively used at a final concentration of 1 μ M. Cells were incubated in the dark at 37 °C for 30 min and the fluorescence of reduced or oxidized lipids was measured at $\lambda_{ex} = 489\pm 14$ nm and $\lambda_{em} = 565\pm 30$ nm and, respectively, on a LSRFortessa™ X-20 Cell Analyzer cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo® software.

Spheroid formation assay

The spheroid formation assay was performed as previously described (Paris et al. 2022). Cells (7000 cells/0,5 ml) were plated in 24-well plates coated with 1.5% agarose in complete RPMI medium and concentrated in the center by circular agitation. After three days, spheroids were recovered for inclusion in an extracellular matrix of collagen (100 μ l) (final concentration = 2 mg/ml in buffer (0.01 N acetic acid; neutralization buffer: 33 mM Hepes pH7.4, 0.37% sodium bicarbonate, 0.03 N NaOH; 1X MEM) in 24 well-plates coated with 1.5% agarose. Spheroids

were maintained in complete medium with or without Erastin or IKE (1 μ M) and images of the spheroids captured over several days (0 to 7 days) using an Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss) at 5x magnification. Invasion capacity was evaluated by determining the ratio between the maximum and initial diameter of the spheroid.

Wound-Healing Migration Assay

Briefly, SKmel28 cells were grown until confluency in two-well silicone inserts (Ibidi®, Gräfelfing, Germany) were placed in 12-well tissue culture dishes. The cell culture insert was removed after one day. Afterwards, the plates were washed with PBS and incubated at 37 °C in fresh RPMI-1640 medium (Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% FBS (Eurobio Scientific, Evry, France) and 1% penicillin–streptomycin antibiotics (Gibco, Invitrogen) in the presence of a vehicle (DMSO) or the indicated concentrations of Erastin or IKE. The wound was photographed at 5 \times magnification with an Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss, Vision Aalen, Germany). Wound closure was determined by measuring the distance between the edges of the wound at 0 and 15 h using ImageJ (Fiji 1.0). The distance migrated by the cells was quantified as follows: $D = (\text{size of the wound at } t = 0 \text{ h} - \text{size of the wound at } t = 15 \text{ h})$.

Apoptosis and Necrosis Assays

At the end of treatment, cells were stained by adding 25 μ L of a dye mixture containing Hoechst33342 (5 μ g/mL) propidium iodide (4 μ g/mL), and YO-PRO®-1 (0.8 μ M) directly into 100 μ L of culture media and incubated at 37 °C for at least 45 minutes. Cells were imaged, analyzed, and counted using an ArrayScan™ VTI High-Content System (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France). The apoptotic (green) and necrotic (red) cells are expressed relative to the number of Hoechst-positive cells (blue).

Metabolic flux assays

Adherent cells were seeded at 2×10^4 cells/well in normal growth media (cell line specific) in a Seahorse XF96 Cell Culture Microplate. To achieve an even distribution of cells within wells, plates were rocked at 25 °C for 20–40 min. For each staining group, one extra well on the outer perimeter of the plate was seeded to calibrate image acquisition parameters. The plate was then incubated at 37 °C overnight to allow the cells to adhere. The following day, growth media was exchanged with Seahorse Phenol Red-free DMEM and either basal OCR was measured (for wells that were to be imaged with mitochondrial dyes, see Imaging section below) or an XF

Cell Mito stress test (Agilent) was performed according the manufacturer's instructions. In both cases, the last injection port was used for cell stain/dye injection.

Lipid Droplets analysis by microscopy

Briefly, cells were rinsed in PBS and incubated with LipidSpot™-610 (1X in PBS) for 10 minutes at room temperature. Cells were washed twice with PBS and then stained with WGA staining solution (5 ug/mL) for 10 minutes at 37°. Cells were finally washed twice and incubated 5 minutes with Dapi staining solution before microscopy.

RNA extraction & RT-qPCR expression

RNA extraction & RT-qPCR expression was performed as previously described (Corre et al. 2018). The sequences of the primers used for the RT-qPCR experiments are available in Table 2 (EV1).

Western blotting

Harvested cells were solubilized as previously described. Protein samples were denatured at 95°C, resolved by SDS-PAGE, and transferred onto Hybond™-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Bucks, UK). Membranes were probed with the appropriate antibodies and the signals detected using a Fujifilm LAS-3000 Imager (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan). Primary antibody information is available in Table 2 (EV3). Horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK) and used at a dilution of 1:10,000.

RNA-Seq

Total RNA was extracted from BRAFi-sensitive or resistant SK28, Mel501, and M229, cells after or not knockout out of AhR using the NucleoSpin RNA kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). A complementary DNA library was prepared and sequencing performed according to the Illumina standard protocol by Beijing Novel Bioinformatics Co., Ltd. (<https://en.novogene.com/>). RNAseq was performed in collaboration with Novogene (Beijing, China). Libraries were generated from 500 ng total RNA using a Truseq Stranded mRNA kit (Illumina). The concentration of the library was first determined using a Qubit2.0 fluorimeter and then diluted to 1 ng/ul. The size of the insert was checked using an Agilent bioanalyzer and further quantified by qPCR (library concentration > 2 nM). An aliquot (0.5 nM) of the pool was loaded on a high-output flow cell and sequenced on a NovaSeq 6000 instrument (Illumina) with

2×150 bp paired-end chemistry in two runs. Reads were aligned to human genome release hg38 using HISAT2 V2.0.5 with default parameters. Quantification of the expressed genes was performed using CUFFDIFF v2.2.1. The quality of the RNA-Seq count data was assessed using the Novogene standard protocol.

Data mining

TCGA/SKCM RNAseq data were analyzed using the OncoLnc portal [<http://www.oncolnc.org>] (Anaya 2016). The raw data count matrix, composed of 454 samples (from SKCM melanoma cohort), was downloaded from the OncoLnc portal for the various transcriptional signatures. Expression heatmaps of differentially expressed genes between samples were obtained based on a log₂ fold change using the ComplexHeatmap 2.0.0 (Gu, Eils, et Schlesner 2016) package in R/Bioconductor. Cluster-specific gene rankings were obtained by contrasting the samples with the rest. Cell density curves for the available melanoma cell lines were established using GraphPad PRISM 10.0[®] to establish the IC₅₀ for the various treatments.

The raw data count matrices from the RNA seq data were obtained in GEO database for previous experiments on melanoma cell lines (Barretina et al. 2012) GSE36134 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE36134>] (sensitive or resistant to PLX470) (IC₅₀ values for PLX4720 were obtained from Supplementary Table 7 of ref (Barretina et al. 2012)), BRAFi- or BRAFi+MEKi-resistant cell lines GSE75299 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE752099>, (Song et al. 2017)] and GSE80829 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE80829>, (Tsoi et al. 2018)] and GSE110054 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE110054>, (Tsoi et al. 2018)], BRAFi-treated melanoma patients (GSE65185 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE65185>, (Hugo et al. 2015)] and melanoma cell lines (proliferative or invasive) (GSE60664 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE60664>, (Verfaillie et al. 2015)]).

Analysis of the RNAseq dataset from the GDSC (Sanger/Massachusetts General Hospital Genomics of Drug Sensitivity in Cancer) (Yang et al. 2013) was performed and recovered from the CellMinerCDB webtool (<https://discover.nci.nih.gov/cellminerfdb>) (Reinhold et al. 2012). CellMinerCDB is an interactive web application that simplifies access to and exploration of cancer cell line pharmacogenomic data from different sources. This webtool allows the comparison of molecular and/or drug response patterns across sets of cell lines to search for

possible associations. Pearson's correlations with the reported p-values (not adjusted for multiple comparisons) between AhR expression (Supplemental Fig 2B) and drug activity (297 compounds) were recovered for various cancer cell lines (n = 1,080).

Statistics

Data are presented as the mean \pm SD, unless otherwise specified, and differences were considered significant for a *p* value < 0.05. Comparisons between groups normalized to a control were carried out using a two-tailed *t*-test, with the Holm-Sidak multiple comparisons test when more than two groups are compared to the same control condition. Overall survival was estimated using the Kaplan-Meier method. Univariate analysis using the Cox regression model was performed to estimate the hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI). All statistical analyses were performed using GraphPad (PRISM10.0[®]) (La Jolla, CA, USA).

Data availability

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

Author information

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

Acknowledgements

The authors would like to thank the Gene Expression and Oncogenesis team for helpful discussions and technical and administrative support (Anne-Gaëlle Rio), CNRS UMR6290, and the Rennes FHU CAMIn team. The authors acknowledge the SFR Biosit core facilities of Rennes University, along with the cell imaging ImpACcell, Cytometry and Microscopy Rennes Imaging Center (MRIC) platforms (IFR BIOSIT). This study received financial support from the following: Association Contre le Cancer (ARC) (N[°]PGA1*20160203868); Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) Départements du Grand-Ouest; FHU CAMIn-CHU Rennes, Région Bretagne; University of Rennes 1; CNRS; and Inserm. N.T. is a recipient of a doctoral fellowship from the french ministry of research. A.P. is a recipient of an (Institut National du Cancer) INCa grant.

Disclosure Statement and Competing Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

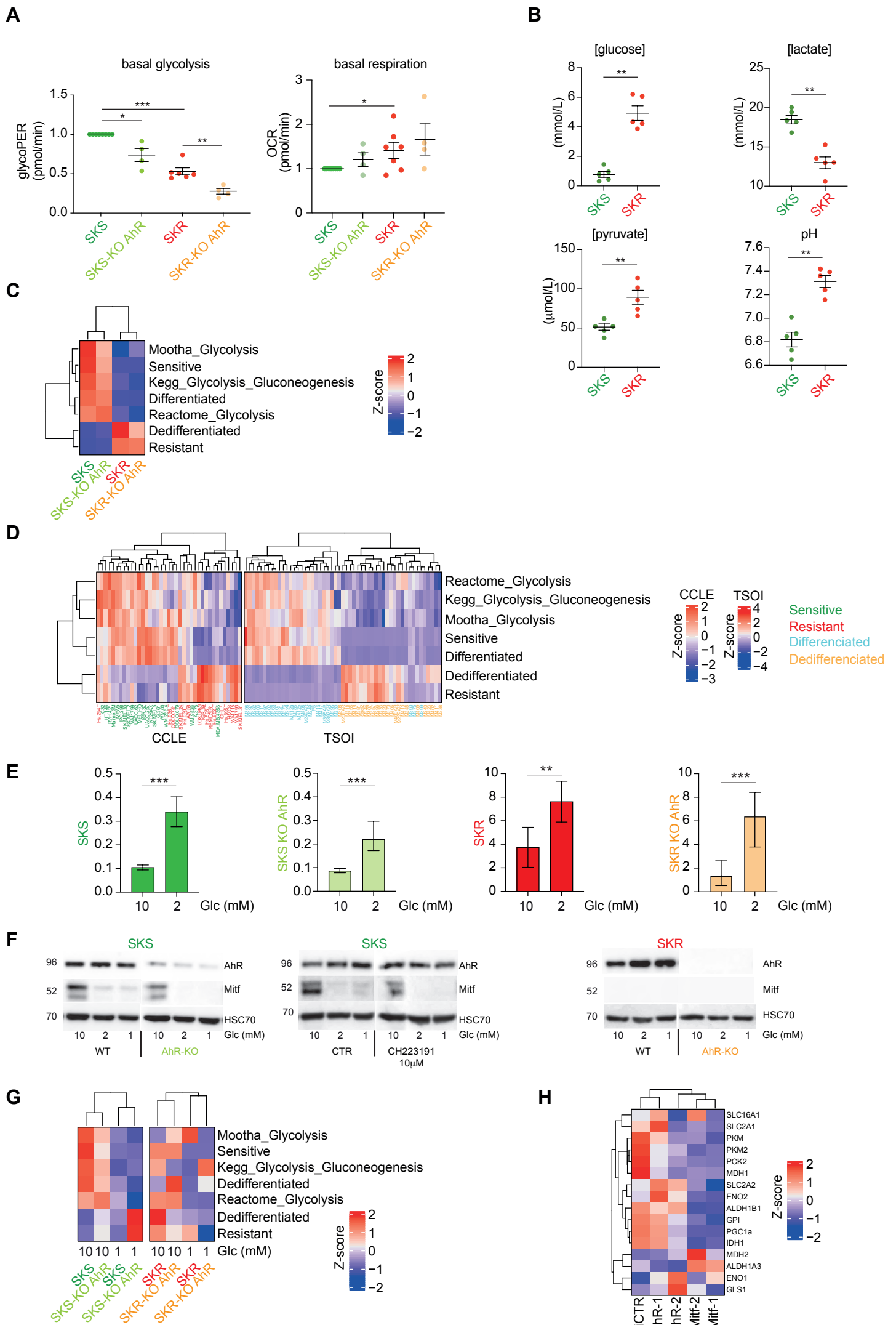


Figure 1

Figure 1. Metabolic change in BRAFi resistant cells.

- A.** Seahorse analysis of sensitive (SKS) and resistant (SKR) SKMel28 cells invalidated or not for AhR transcription factor (KO) by CRISPR/Cas9 to determine the glycolytic proton efflux rate (glycoPER) and oxygen consumption rate (OCR) in cells (mean+/sem; n=4-7; unpaired Mann-Whitney *t*-test; p<0.05 *; p<0.01 **; p<0.001 ***).
- B.** Measure of pH, glucose, lactate and pyruvate concentration in supernatant from cell culture medium for SKS or SKR after 24h (mean+/sem; n=5; unpaired Mann-Whitney *t*-test; p<0.05 *; p<0.01 **; p<0.001 ***).
- C.** Expression heatmap for various gene signatures (from Appendix Table S1 (Paris et al. 2022) and GSEA from Table S1) in SK28 BRAFi-sensitive or resistant cell lines KO or not for AhR from RNAseq data (GSE166617). Genes and clusters with similar expression profiles across the cohort are placed close to each other in the grid. The scale corresponds to the Z scores.
- D.** Expression heatmap for various gene signatures in BRAFi-sensitive or resistant melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (Barretina et al. 2012) and differentiated or dedifferentiated melanoma cell lines from the Graeber data sets (Tsoi et al. 2018). Genes and clusters with similar expression profiles across the cohort are placed close to each other in the grid. The scale corresponds to the Z scores.
- E.** BRAFi sensitivity was established in SKMel28 cells grown in the presence of a high (10mM) or low (2mM) glucose concentration, by measuring cell density for four days after treatment (every 2 days), with an increasing concentration of BRAFi (vemurafenib). The IC50 (M) was calculated using GraphPad (PRISM10.0®). Statistical analysis (using unpaired *t*-test) has been performed between the mean of 4 independent experiments at different concentrations; p<0.01 **; p<0.001 ***.
- F.** SKS or SKR invalidated or not for AhR (KO) or treated with its specific inhibitor (CH223191, 10μM) were grown in increasing concentration of glucose (1, 2 and 10 mM). AhR and MITF protein levels were analyzed in these cells by western blotting.
- G.** Expression heatmap for various gene signatures established by the median of expression for specific genes from RNAseq data from SKS and SKR, KO or not for AhR and grown in increasing concentration of glucose (1 and 10 mM). Genes and clusters with similar expression profiles across the cohort are placed close to each other in the grid. The scale corresponds to the Z scores.
- H.** Expression heatmap (results from qPCR) for various glycolytic genes after or not KD of both AhR and MITF transcription factor by siRNA (siAhR#1-2, siMITF#1-2). Genes and clusters with similar expression profiles across the cohort are placed close to each other in the grid. The scale corresponds to the Z scores.

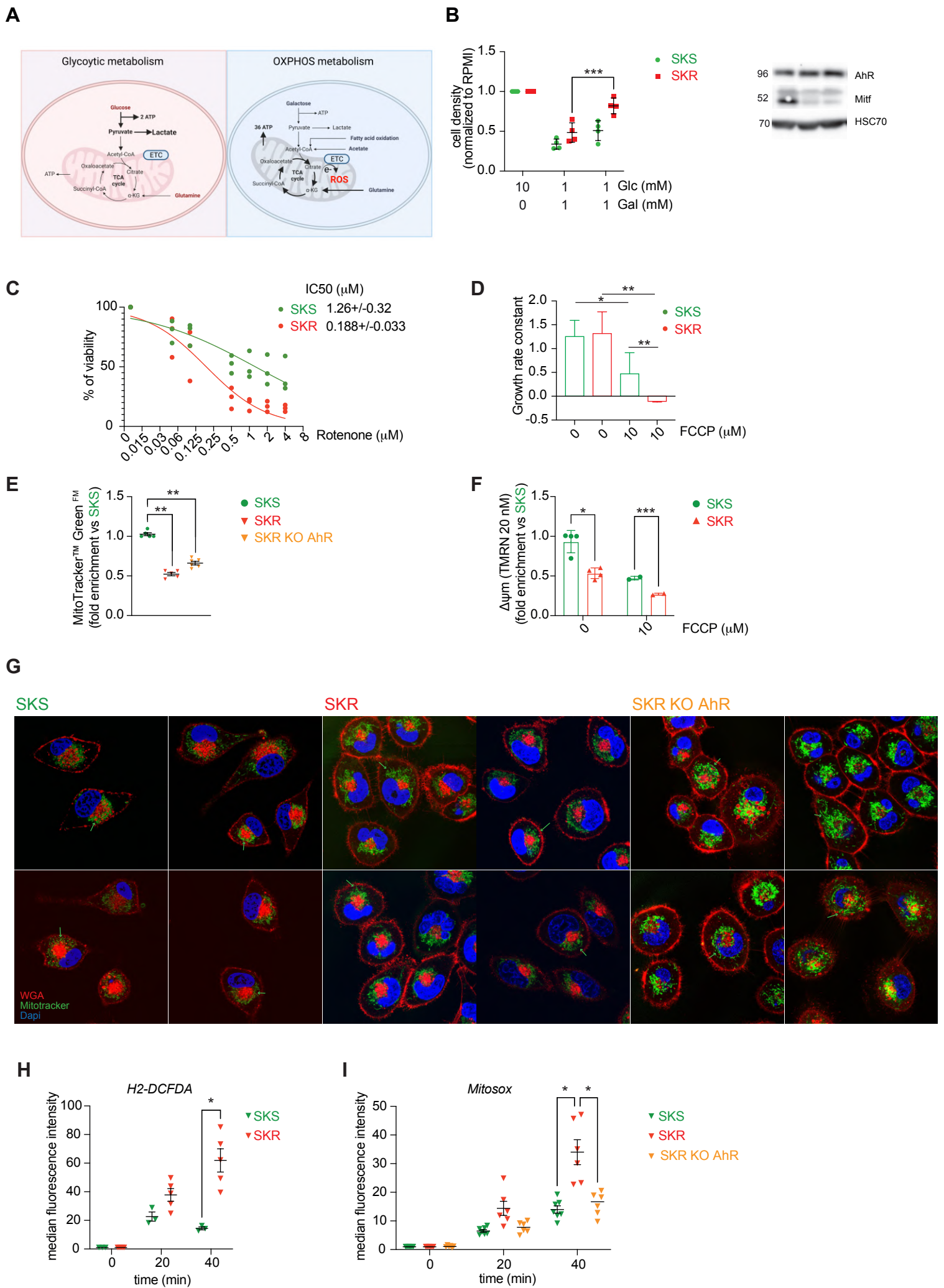


Figure 2

Figure 2. Mitochondrial and OXPHOS activity, and ROS accumulation in BRAFi resistant cells.

- A.** Schematic representation of Glycolytic and OXPHOS metabolisms in the presence of glucose or galactose.
- B.** Measurement of the cell density of SKS and SKR cells cultured under conditions of glucose deprivation and supplemented or not with galactose (10mM). Statistical analysis (using unpaired t-test) has been performed compared to the culture condition with a high concentration of glucose (10mM) (mean+/sem; n=4; p<0.01 **; p<0.001 ***). AhR and MITF protein levels were analyzed in these cells by western blotting.
- C.** Measurement of cell viability of SKS and SKR in the presence of increasing concentrations of Rotenone (inhibitor of complex I of the mitochondrial respiratory chain). The IC50 (M) was calculated using GraphPad (PRISM10.0[®]) (n=3).
- D.** SKS and SKR were grown in the presence or absence of the uncoupler of mitochondrial oxidative phosphorylation FCCP (6 μ M) for 4 days. Growth rate constant was calculated for 4 independent experiments (p<0.05 *; p<0.01 **; p<0.001 ***).
- E.** Measurement of mitochondrial mass in SKR and R-KO compared to SKS after labeling with the fluorescent marker MitoTracker[™] Green^{FM} (mean+/sem; n=4; unpaired t-test; p<0.01 **).
- F.** Measurement of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m) in SKS and R after labeling with the fluorescent marker TMRM (20 nM) under basal conditions or after treatment with FCCP (10 μ M) (n=4; unpaired t-test p<0.05 *; p<0.01 **; p<0.001 ***).
- G.** Confocal microscopic analysis (Confocal Microscope Leica TCS SP8 with AOBS and Resonant Scanner (8kHz), x40) of mitochondrial morphology in SKS, SKR and SKR-KO after labeling with the fluorescent probe MitoTracker[™] Green^{FM} (mitochondria, green), Dapi (blue) and WGA (cell membrane, Red).
- H.** Measurement of the accumulation (0, 20 and 40 min) of total cellular ROS (Reactive Oxygen Species) in SKS and R after labeling with the fluorescent marker CM-H2DCFDA (5 μ M) (mean+/sem; n=3-4; unpaired t-test p<0.01 **).
- I.** Measurement of the accumulation (0, 20 and 40 min) of mitochondrial ROS (Reactive Oxygen Species) in SKS, R and R-KO after labeling with the fluorescent marker MitoSOX[™] (5 μ M) (mean+/sem; n=3-4; unpaired t-test p<0.01 **).

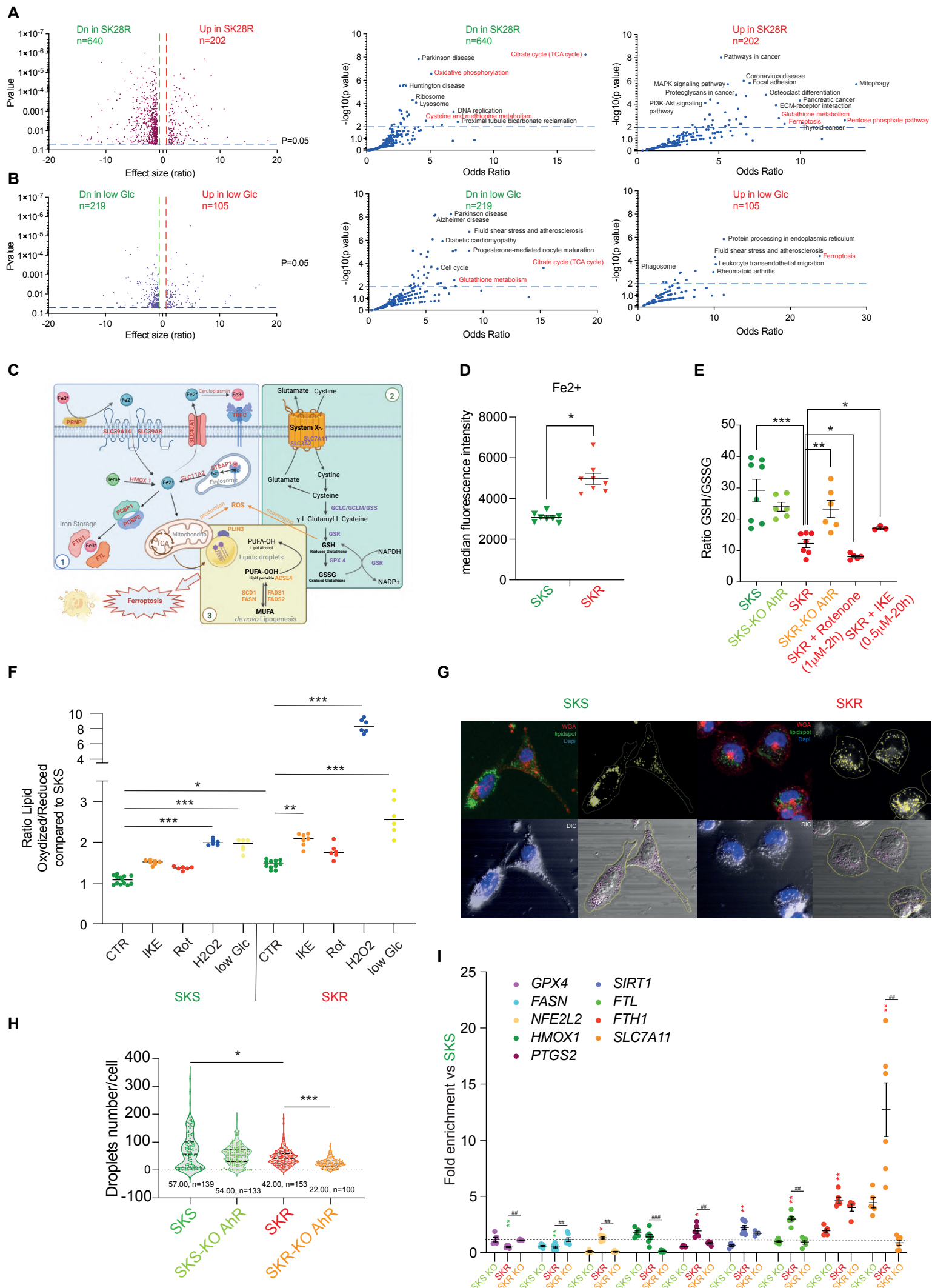


Figure 3

Figure 3. Induction of ferroptosis pathway in BRAFi resistant cells.

A. Volcano plot combining the magnitude of the fold change (ratio of expression) of differentially expressed genes from RNAseq data between SKS (green, $p > 0.05$ $n = 640$) and SKR (red, $p > 0.05$ $n = 202$) and the p-values. Volcano plot (using GraphPad (PRISM10.0[®])) of terms from the KEGG_2021_Human gene set plotted by the corresponding odds ratio (x-position) and $-\log_{10}$ (p-value) (y-position) from the enrichment results in SKS (middle) or in SKR (right).

B. Volcano plot combining the magnitude of the fold change (ratio of expression) of differentially expressed genes from RNAseq data between SK grown in low glucose condition (1mM) and in high glucose condition (10mM) (down-regulated genes in green, $p > 0.05$ $n = 219$) (up-regulated genes in red, $p > 0.05$ $n = 105$) and the p-values. Volcano plot (using GraphPad (PRISM10.0[®])) of terms from the KEGG_2021_Human gene set plotted by the corresponding odds ratio (x-position) and $-\log_{10}$ (p-value) (y-position) from the enrichment results for down-regulated genes in low Glc (middle) or up-regulated genes in low Glc (right).

C. Schematic representation of activation of ferroptosis in cell. The figure shows the regulatory pathways of ferroptosis, which can be roughly divided into three categories. The first one is the regulation mechanism of iron metabolism (1). The second mechanism is regulated by GSH/GPX4 pathway, such as inhibition of system Xc-, glutamine pathway (2). The third category is related pathways around lipid metabolism and lipid peroxidation of PUFA (3). All these regulatory pathways are closely related to cell metabolism and the accumulation of oxidative stress in cells.

D. Measurement of Fe²⁺ level in SKS and SKR after cell labeling with BioTracker™ FerroOrange Live Cell Dye (Merck) (mean±sem; $n = 8$; $p < 0.05$ *).

E. Measurement of ratio reduced Glutathione (GSH)/oxidized Glutathione (GSSG) in SKS, SKS KO, SKR and SKR KO at basal conditions. Treatment of SKR with Rotenone (0.5μM) or IKE (0.5μM) was used as positive control for the accumulation of GSSG (mean±sem; $n = 5-7$; $p < 0.05$).

F. Measurement of reduced and oxidized lipids in SKS and SKR after cell labeling with BODIPY™ (581/591) C11. Treatment with Rotenone (0.5μM), IKE (0.5μM), H₂O₂ (0.8μM) and low glucose medium was used to see the impact on oxidation of lipids in response to treatment (mean±sem; $n = 4-6$; $p < 0.05$ *; $p < 0.01$ **; $p < 0.001$ ***).

G. Confocal microscopic analysis (Confocal Microscope Leica TCS SP8 with AOBS and Resonant Scanner (8kHz), x40) of lipid droplets (LD) in SKS and SKR after labeling with the fluorescent probe LIPIDSPOT-610 (Interchim, B30VJ1) (upper panel) or visualized directly by DIC (Differential Interference Contrast microscopy) (lower panel). Labeling with the fluorescent probe WHEAT GERM AGGLUTININ-CF488 (Interchim, AQK230) and Dapi were used to delimit plasma membrane and nucleus in cells.

H. Quantification of Lipid droplets (LD) after confocal microscopic analysis of lipid droplets (LD) in SKS and SKR cells invalidated or not for AhR after visualization directly by DIC (Differential Interference Contrast microscopy). The graph represents the mean±sem of LD measured in >150 cells. $p < 0.05$ *; $p < 0.001$ ***.

I. Graph representing the variations in expression of genes for different markers of ferroptosis (<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>) in SKS KO AhR, SKR, SKR KO AhR compared to SKS (mean±sem; $n = 4-6$; $p < 0.05$ *.#; $p < 0.01$ **.##; $p < 0.001$ ***.###).

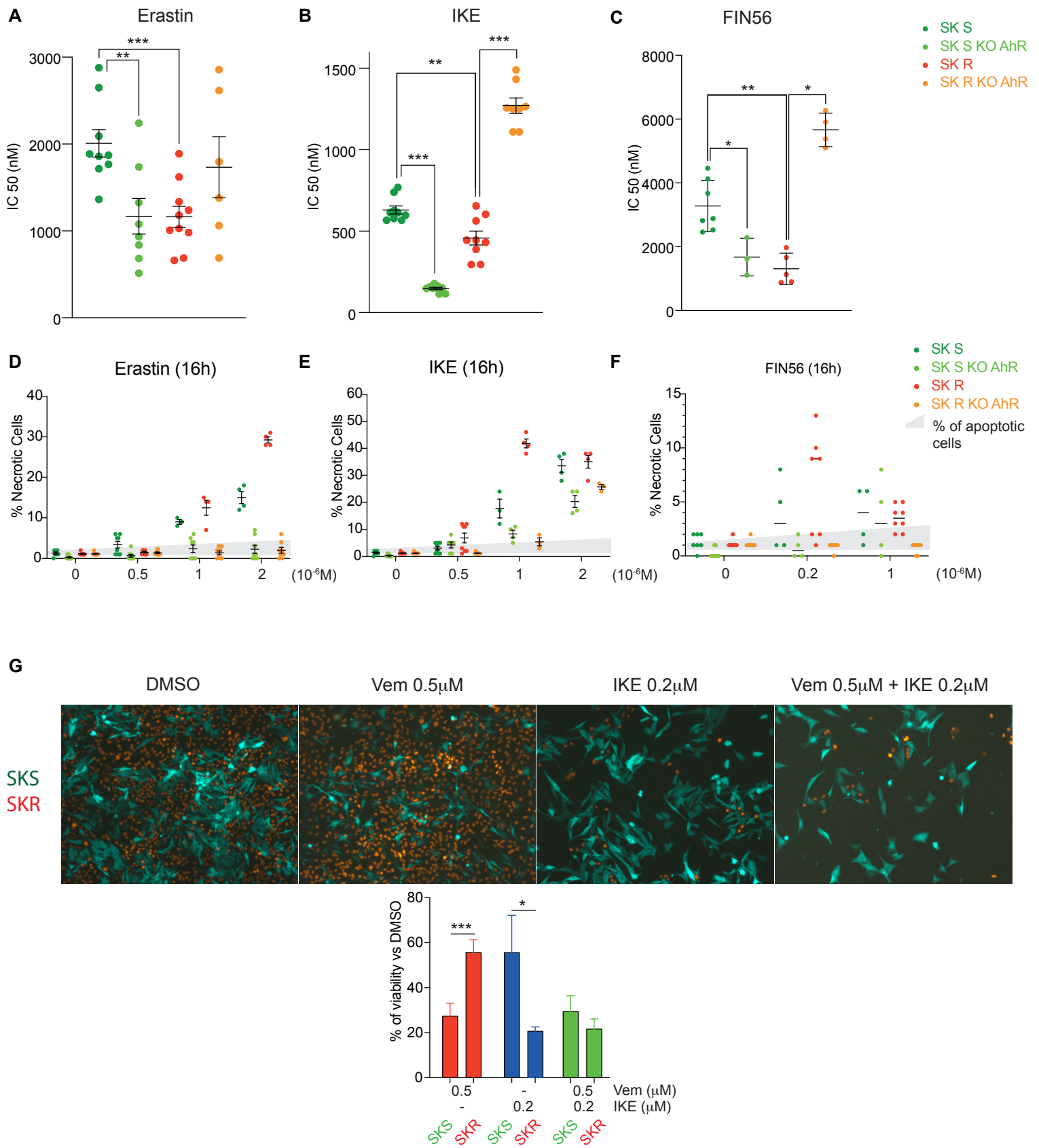


Figure 4

Figure 4. BRAFi resistant cells are more sensitive to ferroptosis inducers.

A-C. Erastin (**A**), IKE (**B**) and FIN56 (**C**) sensitivity was established in SKS KO AhR, SKR, SKR KO AhR, by measuring cell density for four days after treatment (every 2 days), with an increasing concentration of ferroptosis inducers. The IC₅₀ (nM) for each experiment was calculated using GraphPad (PRISM10.0[®]) (mean±sem; n=9; p<0.05 *; p<0.01 **; p<0.001 ***).

D-F. SKS and SKR cells were treated for 16h with increasing concentrations of inducers of ferroptosis, Erastin (**D**), IKE (**E**) and FIN56 (**F**). At the end of the treatment, cells were stained with Hoechst, propidium iodide, and YO-PRO[®]-1 to evaluate the percentage of apoptotic (represented in red) and necrotic (represented in blue) cells relative to the number of Hoechst-positive cells by microscopy (mean±sem; n=4-5).

G. Microscopic analysis (Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss) at 5x magnification) of SKS (GFP, green) and SKR (dTomato, red) after 4 days of treatment (every 2 days) with vehicle (DMSO), Vemurafenib (0.5μM) alone, IKE (0.2μM) alone or with the combination (Vem, IKE). Quantification of residual cells has been performed after counting of cells and analysis by flow cytometry.

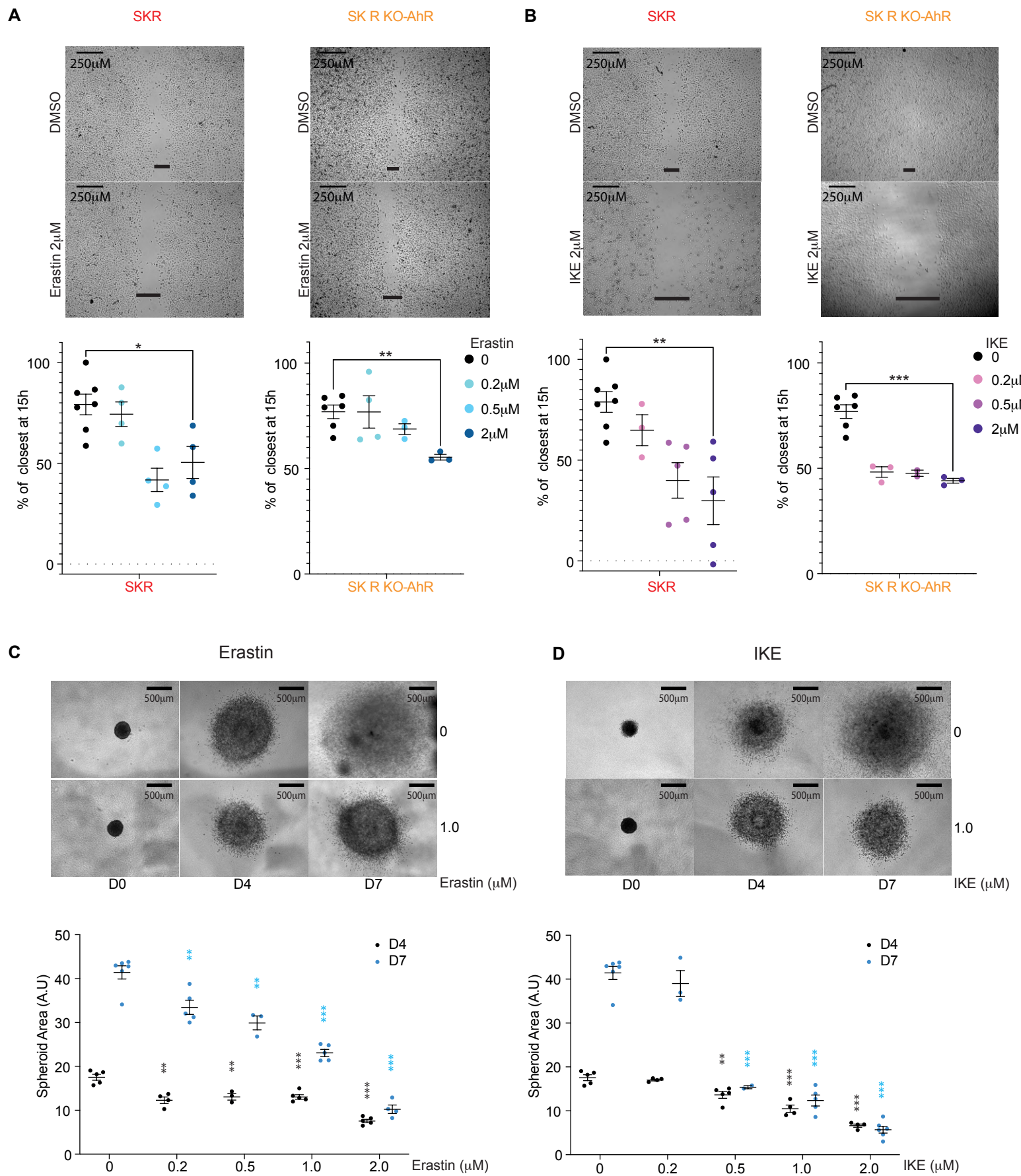
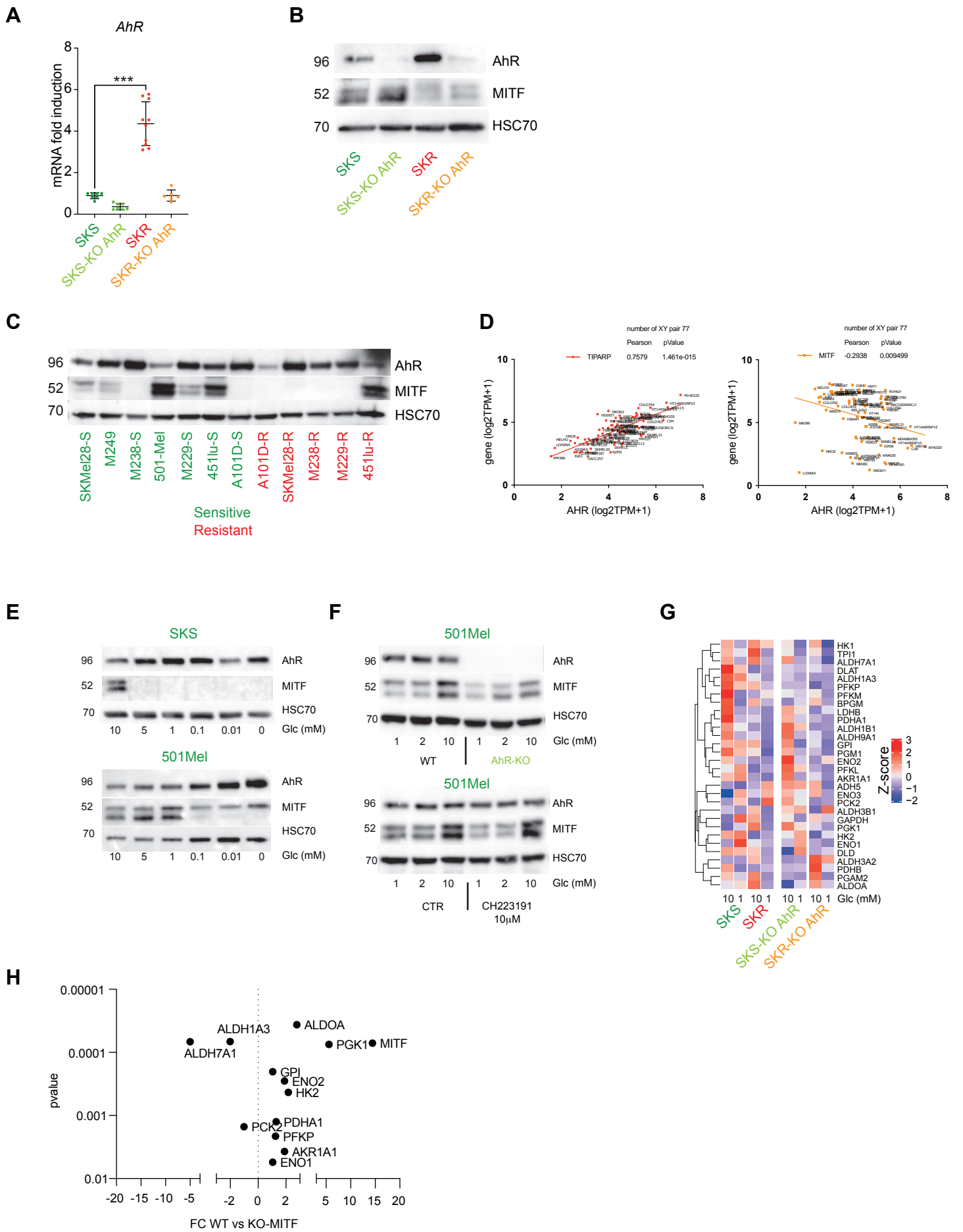


Figure 5

Figure 5. Ferroptosis inducers prevent migration and invasion of BRAFi resistant cells.

A-B. Wound-healing assays were performed using IBIDI® chambers to evaluate the role of inducers of ferroptosis on cell migration in SKR (**A**) and SKR KO (AhR) (**B**) treated with increasing concentrations of Erastin or IKE (0,2, 0,5 and 2 μ M). Images of the wound were acquired at a 5 \times magnification with an Axio Vert.A1 inverted microscope (Carl Zeiss). The histogram shows the mean wound closure determined by measuring the distance between the edges of the wound at time 0 and 15 h (mean \pm sem; n=4-7; p<0.05 *; p<0.01 **; p<0.001 ***). Scale bar 250 μ m.

C-D. Three-dimensional spheroid growth of SKR (**C**) and SKR KO (AhR) (**D**) after treatment every 2 days with the inducers of ferroptosis Erastin or IKE (1 μ M). Images were captured four days and seven days after implantation of the spheroids into collagen gel. Analysis of invasive capacity was measured by comparing the area of the final spheroid compared to the initial one. (mean \pm sem; n=3-7; p<0.05 *; p<0.01 **; p<0.001 ***). Scale bar 500 μ m.



Appendix Figure S1. Changes of expression of MITF and AhR transcription factors during energetic phenotype switch.

A. *AhR* mRNA expression was measured by RT-qPCR in SKMel28 cells. Statistical analysis using unpaired *t*-tests method has been performed to compare the level of *AhR* expression compared to SKS, $p < 0.05$ *; $p < 0.01$ **; $p < 0.001$ ***.

B. AhR protein levels in SKMel28 cells were analyzed by western blotting.

C. AhR and MITF protein levels were analyzed by western blotting in different BRAFi-sensitive (green) or -resistant (red) melanoma cells lines.

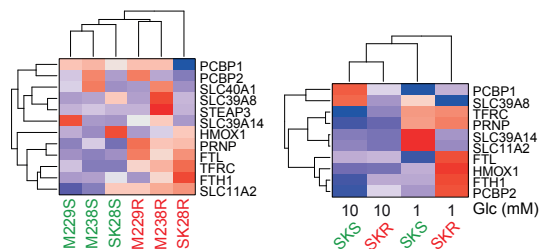
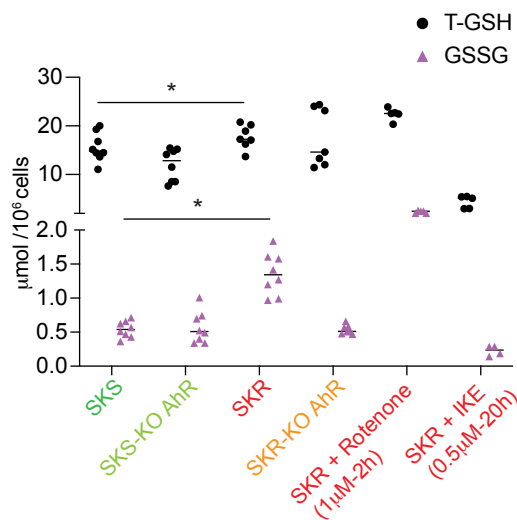
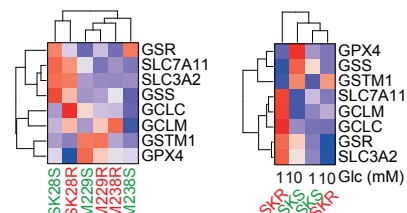
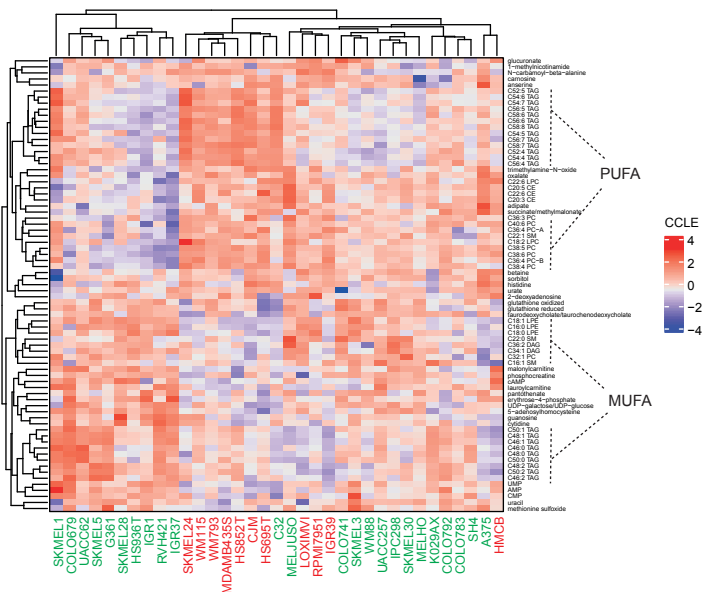
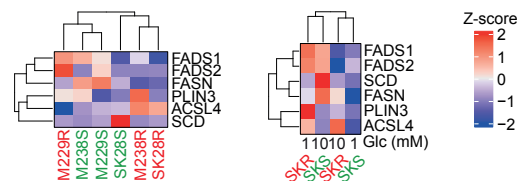
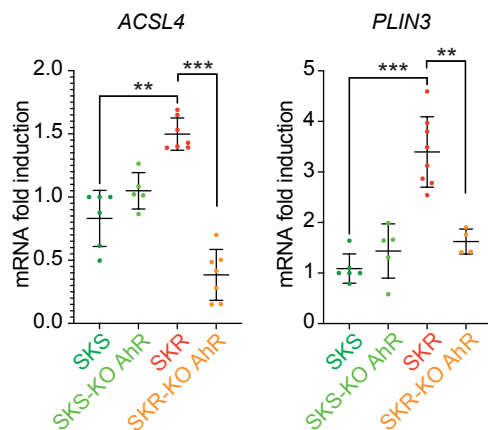
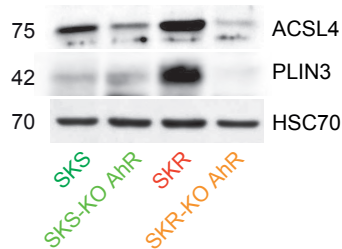
D. Analysis of correlation of mRNA expression between *AhR* with its canonical target *TIPARP* or with *MITF* from expression data in different melanoma cell lines (CCLE) using the Depmap webtool (<https://depmap.org/portal/interactive/>).

E. AhR and MITF protein levels were analyzed by western blotting in SKMel28 and in 501Mel grown in the presence of increasing concentrations of glucose (0 to 10mM).

F. 501Mel cells invalidated or not for AhR (CRISPR-Cas9) or treated with its specific inhibitor (CH223191, 10 μ M) were grown in increasing concentration of glucose (1, 2 and 10mM). AhR and MITF protein levels were analyzed in these cells by western blotting.

G. Expression heatmap (results from RNAseq data) for various glycolytic genes in SKS and SKR, invalidated or not for AhR and grown in low (1mM) or high glucose condition (10mM). Genes and clusters with similar expression profiles across the cohort are placed close to each other in the grid. The scale corresponds to the Z scores.

H. Volcano plot combining the magnitude of the fold change (ratio of expression) for glycolytic genes between wildtype SKMel28 or invalidated for MITF (KO) and the p-values. Data were provided from supplemented tables from Dilshat et al (Dilshat et al. 2021).

A**Iron metabolism****B****C****Glutathione metabolism****D****E****MUFA/PUFA metabolism****F****G**

Appendix Figure S2. Induction of iron, glutathione and lipid metabolism genes expression in BRAFi-resistant melanoma cells.

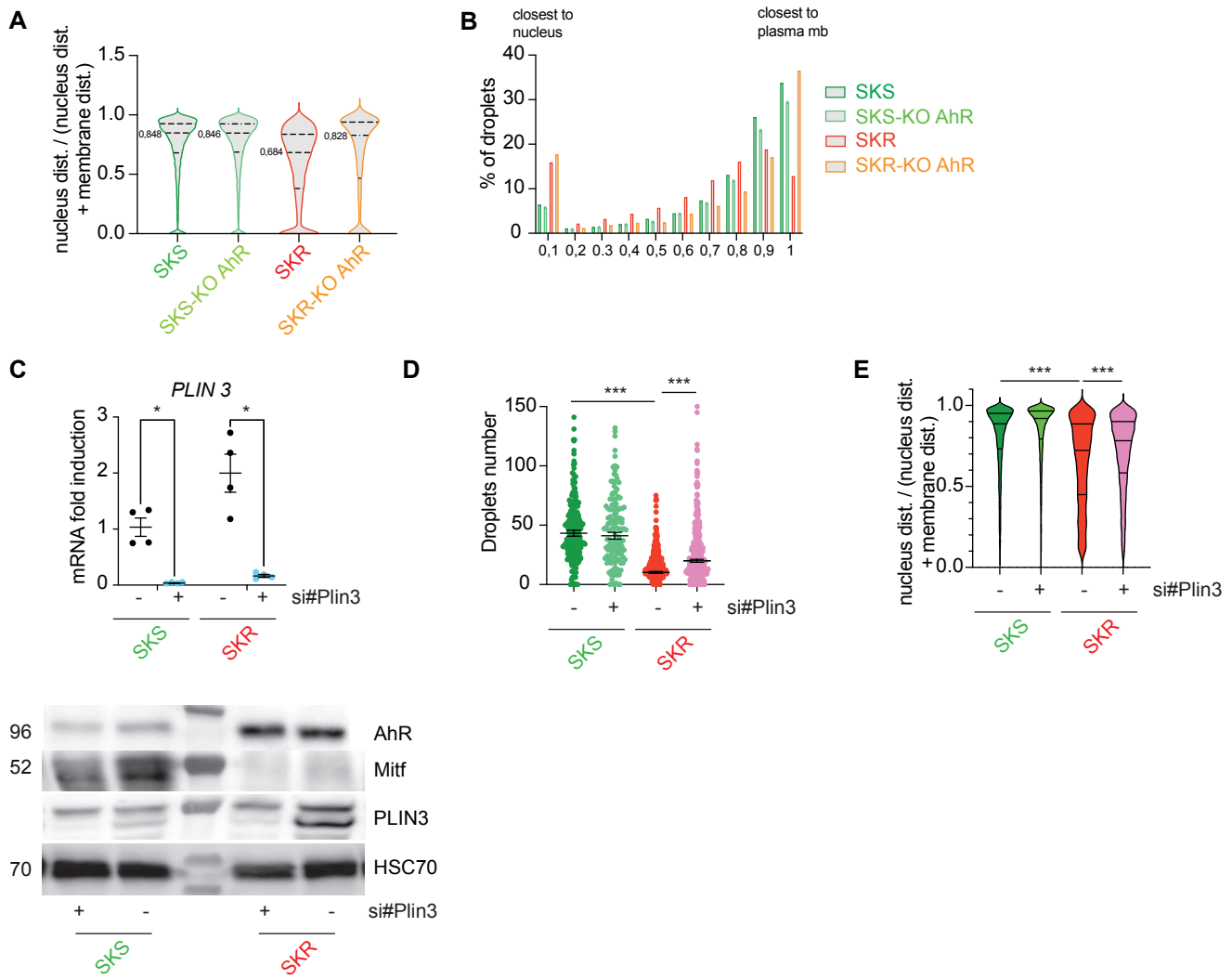
A-C-E. Expression heatmap (results from RNAseq data) for genes involved in iron (**A**), glutathione (**C**) and MUFA/PUFA lipid metabolisms (**E**) in sensitive and resistant melanoma cell lines (SKMel28, M229 and M238) and in SKS and SKR, grown in low (1 mM) or high glucose condition (10 mM). The scale corresponds to the Z scores.

B. Measurement of total Glutathione (T-GSH) and oxidized Glutathione (GSSG) in SKS, SKS KO, SKR and SKR KO at basal conditions. Treatment of SKR with Rotenone or IKE was used as positive control for the accumulation of GSSG or for the reduction of Glutathione (n=5-7; p<0.05).

C. Heatmap representing the level of metabolites with differentially expressed levels between BRAFi-sensitive (green) or resistant (red) melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE).

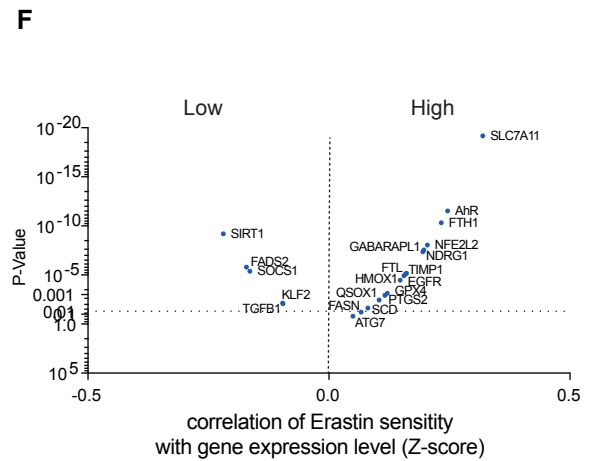
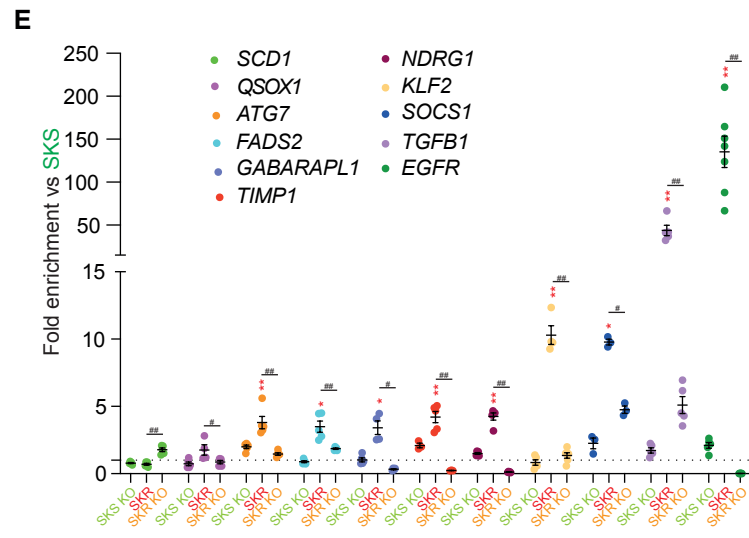
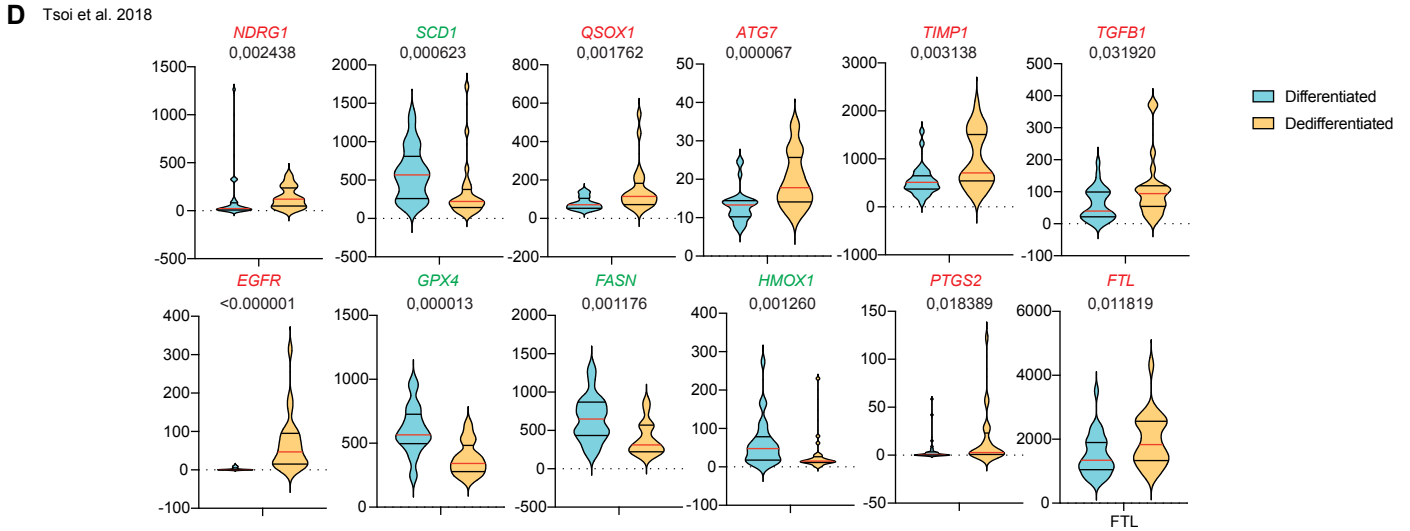
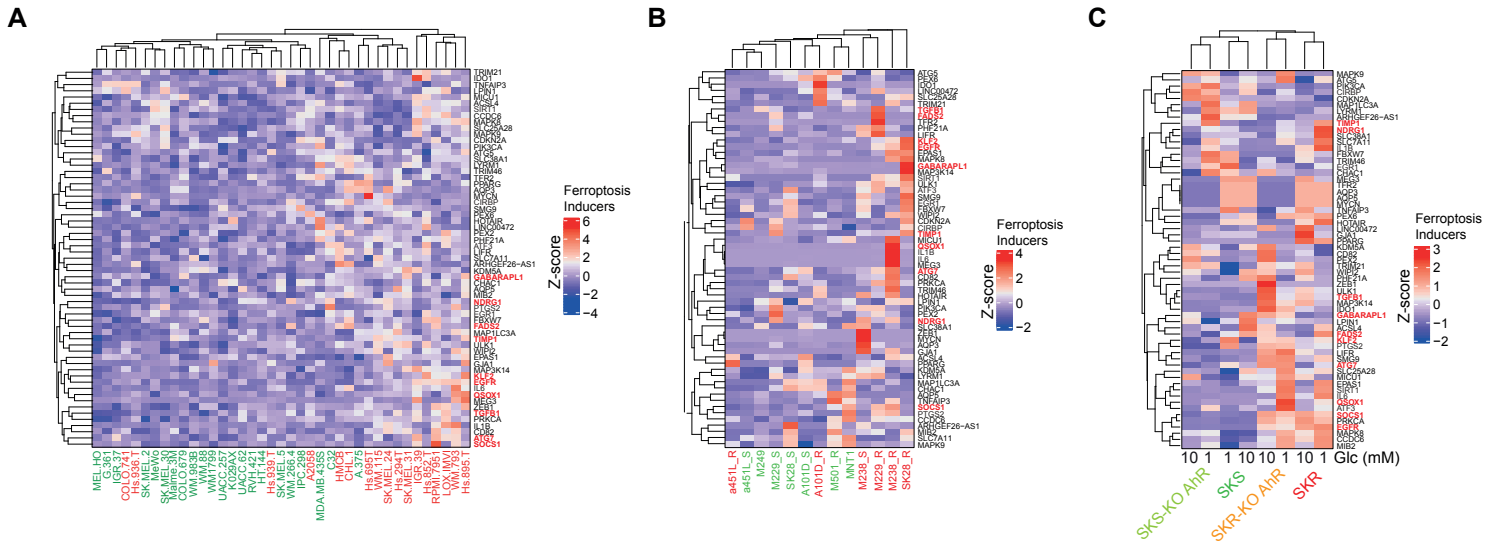
F. *ACSL4* and *PLIN3* mRNA expression was measured by RT-qPCR in SKMel28 cells. Statistical analysis using unpaired *t*-tests method has been performed to compare the level of expression compared to SKS, p<0.01 **; p<0.001 ***.

G. ACSL4 and PLIN3 protein levels in SKMel28 cells were analyzed by western blotting.



Appendix Figure S3. Lipid droplets distribution in SKS and SKR.

- A.** Lipid droplets sub-cellular distribution in SKS and SKR cells. The ratio between the distance to the nucleus with the sum of the distance to the nucleus + the distance to the plasma membrane has been calculated for each LD (number of cells >150, number of LD/cell 50-100).
- B.** The ratio between the distance to the nucleus with the sum of the distance to the nucleus + the distance to the plasma membrane has been calculated for each LD (number of cells >150).
- C.** *PLIN3* mRNA expression and protein level were measured by RT-qPCR and western blotting in SKMe128 cells 48h after transfection or not with specific siRNA.
- D.** Quantification of Lipid droplets (LD) after confocal microscopic analysis of lipid droplets (LD) in SKS and SKR 48h after transfection or not with *PLIN3* siRNA.
- E.** Lipid droplets sub-cellular distribution in SKMe128 cells 48h after transfection or not with *PLIN3* siRNA.



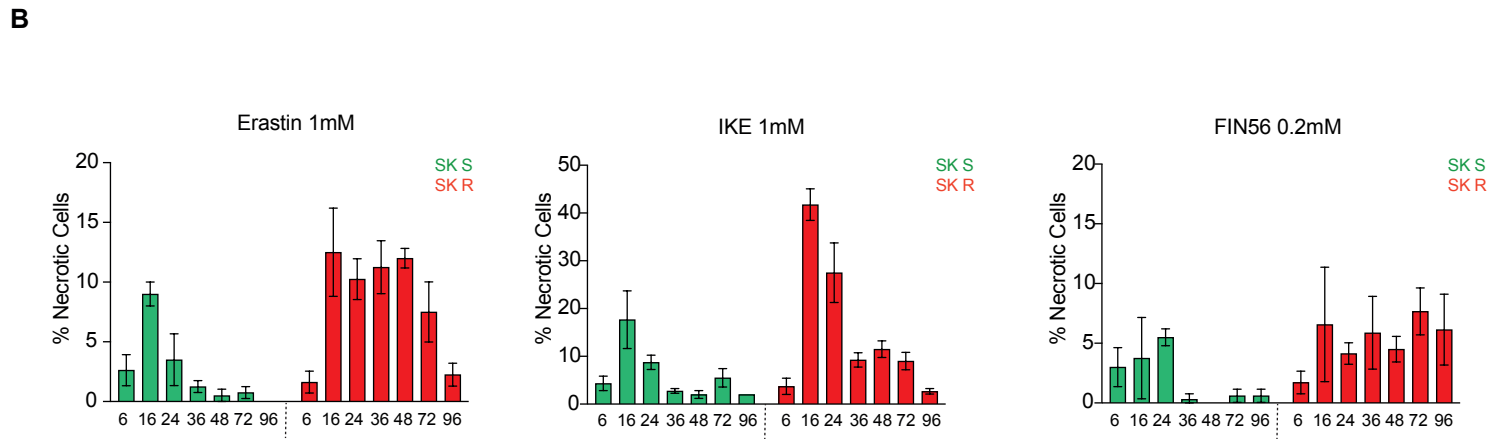
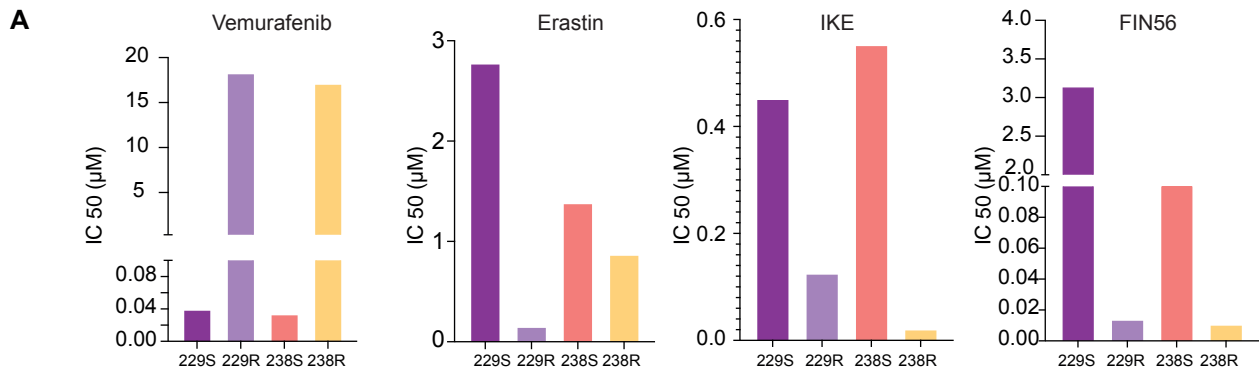
Appendix Figure S4. Analysis of expression of ferroptosis inducers in BRAFi sensitive and resistant melanoma cell lines.

A-C. Expression heatmap for the different drivers of ferroptosis (<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>) in BRAFi sensitive (green) or resistant (red) melanoma cells using RNA seq data (**A**) from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (Barretina et al. 2012) (**B**) from different BRAFi-sensitive or resistant melanoma cell lines and (**C**) from SKS and SKR, invalidated or not for AhR and grown in low (1 mM) or high glucose condition (10 mM).

D. Graph representing the variations in expression of genes for different drivers of ferroptosis (<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>) in differentiated vs dedifferentiated melanoma cell lines from the Graeber data sets (Tsoi et al. 2018).

E. Graph representing the variations in expression of genes for different drivers of ferroptosis (<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>) in SKS KO AhR, SKR, SKR KO AhR compared to SKS (mean±sem; n=4-6; p<0.05 *.#; p<0.01 **.#; p<0.001 ***.###).

F. Volcano plots showed a significant correlation ($p < 0.001$) between Erastin sensitivity with expression of ferroptosis markers and drivers' genes.



Appendix Figure S5. Measure of ferroptosis inducers.

A. Vemurafenib, Erastin, IKE and FIN56 sensitivity was established in M299S, M229R, M238S and M238R melanoma cell lines by measuring cell density for four days after treatment (every 2 days), with an increasing concentration of ferroptosis inducers. The IC₅₀ (nM) for each experiment was calculated using GraphPad (PRISM10.0®).

B. SKS and SKR cells were treated with increasing concentrations of inducers of ferroptosis, Erastin, IKE and FIN56. At different times after treatment, cells were stained with Hoechst, propidium iodide, and YO-PRO®-1 to evaluate the percentage of necrotic cells relative to the number of Hoechst-positive cells by microscopy.

Bibliography

- Alicea, Gretchen M., Vito W. Rebecca, Aaron R. Goldman, Mitchell E. Fane, Stephen M. Douglass, Reeti Behera, Marie R. Webster, et al. 2020. « Changes in Aged Fibroblast Lipid Metabolism Induce Age-Dependent Melanoma Cell Resistance to Targeted Therapy via the Fatty Acid Transporter FATP2 ». *Cancer Discovery* 10 (9): 1282-95. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0329>.
- Baenke, Franziska, Barbara Chaneton, Matthew Smith, Niels Van Den Broek, Kate Hogan, Haoran Tang, Amaya Viros, et al. 2016. « Resistance to BRAF Inhibitors Induces Glutamine Dependency in Melanoma Cells ». *Molecular Oncology* 10 (1): 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.08.003>.
- Barretina, Jordi, Giordano Caponigro, Nicolas Stransky, Kavitha Venkatesan, Adam A. Margolin, Sungjoon Kim, Christopher J. Wilson, et al. 2012. « The Cancer Cell Line Encyclopedia Enables Predictive Modelling of Anticancer Drug Sensitivity ». *Nature* 483 (7391): 603-7. <https://doi.org/10.1038/nature11003>.
- Bollag, Gideon, Peter Hirth, James Tsai, Jiazhong Zhang, Prabha N. Ibrahim, Hanna Cho, Wayne Spevak, et al. 2010. « Clinical Efficacy of a RAF Inhibitor Needs Broad Target Blockade in BRAF -Mutant Melanoma ». *Nature* 467 (7315): 596-99. <https://doi.org/10.1038/nature09454>.
- Boroughs, Lindsey K., et Ralph J. DeBerardinis. 2015. « Metabolic Pathways Promoting Cancer Cell Survival and Growth ». *Nature Cell Biology* 17 (4): 351-59. <https://doi.org/10.1038/ncb3124>.
- Capparelli, Claudia, Timothy J. Purwin, McKenna Glasheen, Signe Caksa, Manoela Tiago, Nicole Wilski, Danielle Pomante, et al. 2022. « Targeting SOX10-Deficient Cells to Reduce the Dormant-Invasive Phenotype State in Melanoma ». *Nature Communications* 13 (1): 1381. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28801-y>.
- Carreira, Suzanne, Jane Goodall, Laurence Denat, Mercedes Rodriguez, Paolo Nuciforo, Keith S. Hoek, Alessandro Testori, Lionel Larue, et Colin R. Goding. 2006. « Mitf Regulation of Distal Controls Melanoma Proliferation and Invasiveness ». *Genes & Development* 20 (24): 3426-39. <https://doi.org/10.1101/gad.406406>.
- Cesi, Giulia, Geoffroy Walbreck, Andreas Zimmer, Stephanie Kreis, et Claude Haan. 2017. « ROS production induced by BRAF inhibitor treatment rewires metabolic processes affecting cell growth of melanoma cells ». *Molecular Cancer* 16 (1): 102. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0667-y>.
- Cheli, Y., S. Giuliano, N. Fenouille, M. Allegra, V. Hofman, P. Hofman, P. Bahadoran, et al. 2012. « Hypoxia and MITF Control Metastatic Behaviour in Mouse and Human Melanoma Cells ». *Oncogene* 31 (19): 2461-70. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.425>.
- Chen, Xin, Chunhua Yu, Rui Kang, et Daolin Tang. 2020. « Iron Metabolism in Ferroptosis ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 0. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.590226>.
- Corre, Sébastien, Nina Tardif, Nicolas Mouchet, Héloïse M. Leclair, Lise Boussemart, Arthur Gautron, Laura Bachelot, et al. 2018. « Sustained activation of the Aryl hydrocarbon Receptor transcription factor promotes resistance to BRAF-inhibitors in melanoma ». *Nature Communications* 9 (novembre). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06951-2>.
- Cucci, Marie Angèle, Margherita Grattarola, Chiara Monge, Antonella Roetto, Giuseppina Barrera, Emilia Caputo, Chiara Dianzani, et Stefania Pizzimenti. 2023. « Nrf2 as a Therapeutic Target in the Resistance to Targeted Therapies in Melanoma ». *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 12 (6): 1313. <https://doi.org/10.3390/antiox12061313>.
- Cui, Jian-Xin, Xian-Hui Xu, Tao He, Jia-Jia Liu, Tian-Yu Xie, Wen Tian, et Jun-Yan Liu. 2023. « L-Kynurenine Induces NK Cell Loss in Gastric Cancer Microenvironment via Promoting Ferroptosis ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 42 (1): 52. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02629-w>.
- Dietrich, Cornelia. 2016. « Antioxidant Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor ». *Stem Cells International* 2016 (octobre): e7943495. <https://doi.org/10.1155/2016/7943495>.
- Dilshat, Ramile, Valerie Fock, Colin Kenny, Ilse Gerritsen, Romain Maurice Jacques Lasseur, Jana Travnickova, Ossia M. Eichhoff, et al. 2021. « MITF Reprograms the Extracellular Matrix and Focal Adhesion in Melanoma ». *eLife* 10 (janvier): e63093. <https://doi.org/10.7554/eLife.63093>.
- Doll, Sebastian, Bettina Proneth, Yulia Y. Tyurina, Elena Panzilius, Sho Kobayashi, Irina Ingold, Martin Irmeler, et al. 2017. « ACSL4 Dictates Ferroptosis Sensitivity by Shaping Cellular Lipid Composition ». *Nature Chemical Biology* 13 (1): 91-98. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2239>.
- Dummer, Reinhard, Paolo A Ascierto, Helen J Gogas, Ana Arance, Mario Mandala, Gabriella Liskay, Claus Garbe, et al. 2018. « Encorafenib plus Binimetinib versus Vemurafenib or Encorafenib in Patients with BRAF-Mutant Melanoma (COLUMBUS): A Multicentre, Open-Label, Randomised Phase 3 Trial ». *The Lancet Oncology* 19 (5): 603-15. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30142-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30142-6).
- Eleftheriadis, Theodoros, Georgios Pissas, Spyridon Golfopoulos, Vassilios Liakopoulos, et Ioannis Stefanidis. 2021. « Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Ischemia-Reperfusion Injury of Renal Tubular Epithelial Cells ». *Molecular Medicine Reports* 23 (6): 472. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12111>.

- Falletta, Paola, Colin R. Goding, et Yurena Vivas-García. 2022. « Connecting Metabolic Rewiring With Phenotype Switching in Melanoma ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: 930250. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.930250>.
- Falletta, Paola, Luis Sanchez-Del-Campo, Jagat Chauhan, Maïke Effern, Amy Kenyon, Christopher J. Kershaw, Robert Siddaway, et al. 2017. « Translation Reprogramming Is an Evolutionarily Conserved Driver of Phenotypic Plasticity and Therapeutic Resistance in Melanoma ». *Genes & Development* 31 (1): 18-33. <https://doi.org/10.1101/gad.290940.116>.
- Ferguson, Jennifer, Michael Smith, Isabel Zudaire, Claudia Wellbrock, et Imanol Arozarena. 2017. « Glucose Availability Controls ATF4-Mediated MITF Suppression to Drive Melanoma Cell Growth ». *Oncotarget* 8 (20): 32946-59. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16514>.
- Ferraz, Leticia Silva, Renata Torres da Costa, Cláudia Alves da Costa, César Augusto João Ribeiro, Denise Costa Arruda, Silvyia Stuchi Maria-Engler, et Tiago Rodrigues. 2020. « Targeting Mitochondria in Melanoma: Interplay between MAPK Signaling Pathway and Mitochondrial Dynamics ». *Biochemical Pharmacology* 178 (août): 114104. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114104>.
- Gagliardi, Mara, Diego Cotella, Claudio Santoro, Davide Corà, Nickolai A. Barlev, Mauro Piacentini, et Marco Corazzari. 2019. « Aldo-Keto Reductases Protect Metastatic Melanoma from ER Stress-Independent Ferroptosis ». *Cell Death & Disease* 10 (12): 902. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2143-7>.
- Ghaffarian-Bahraman, Ali, Mohammad-Reza Arabnezhad, Majid Keshavarzi, Dorna Davani-Davari, Akram Jamshidzadeh, et Afshin Mohammadi-Bardbori. 2022. « Influence of Cellular Redox Environment on Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Induced Melanogenesis ». *Toxicology in Vitro* 79 (mars): 105282. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105282>.
- Goding, Colin R., et Heinz Arnheiter. 2019. « MITF—the first 25 years ». *Genes & Development* 33 (15-16): 983-1007. <https://doi.org/10.1101/gad.324657.119>.
- Gonçalves, Ana Cristina, Elena Richiardone, Joana Jorge, Bárbara Polónia, Cristina P. R. Xavier, Iris Chiara Salaroglio, Chiara Riganti, M. Helena Vasconcelos, Cyril Corbet, et Ana Bela Sarmento-Ribeiro. 2021. « Impact of Cancer Metabolism on Therapy Resistance – Clinical Implications ». *Drug Resistance Updates* 59 (décembre): 100797. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2021.100797>.
- Granados, Karol, Juliane Poelchen, Daniel Novak, et Jochen Utikal. 2020. « Cellular Reprogramming-A Model for Melanoma Cellular Plasticity ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): E8274. <https://doi.org/10.3390/ijms21218274>.
- Han, Shuxian, Jianjun Chen, Jiajia Hua, Xiaojuan Hu, Shuhui Jian, Guoxiao Zheng, Jing Wang, et al. 2020. « MITF Protects against Oxidative Damage-Induced Retinal Degeneration by Regulating the NRF2 Pathway in the Retinal Pigment Epithelium ». *Redox Biology* 34 (juillet): 101537. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101537>.
- Haq, Rizwan, Jonathan Shoag, Pedro Andreu-Perez, Satoru Yokoyama, Hannah Edelman, Glenn C. Rowe, Dennie T. Frederick, et al. 2013. « Oncogenic BRAF Regulates Oxidative Metabolism via PGC1 α and MITF ». *Cancer Cell* 23 (3): 302-15. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.003>.
- Hauschild, Axel, Jean-Jacques Grob, Lev V Demidov, Thomas Jouary, Ralf Gutzmer, Michael Millward, Piotr Rutkowski, et al. 2012. « Dabrafenib in BRAF-Mutated Metastatic Melanoma: A Multicentre, Open-Label, Phase 3 Randomised Controlled Trial ». *The Lancet* 380 (9839): 358-65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60868-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60868-X).
- Hoek, Keith S., Ossia M. Eichhoff, Natalie C. Schlegel, Udo Döbbeling, Nikita Kobert, Leo Schaerer, Silvio Hemmi, et Reinhard Dummer. 2008. « In Vivo Switching of Human Melanoma Cells between Proliferative and Invasive States ». *Cancer Research* 68 (3): 650-56. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2491>.
- Ke, Kun, Li Li, Chao Lu, Qicong Zhu, Yuanyu Wang, Yiping Mou, Huiju Wang, et Weiwei Jin. 2022. « The Crosstalk Effect between Ferrous and Other Ions Metabolism in Ferroptosis for Therapy of Cancer ». *Frontiers in Oncology* 12: 916082. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.916082>.
- Khamari, Raeeka, Anne Trinh, Pierre Elliott Gabert, Paola Corazao-Rozas, Samuel Riveros-Cruz, Stephane Balayssac, Myriam Malet-Martino, et al. 2018. « Glucose Metabolism and NRF2 Coordinate the Antioxidant Response in Melanoma Resistant to MAPK Inhibitors ». *Cell Death & Disease* 9 (3): 325. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0340-4>.
- Koelblinger, Peter, Olaf Thuerigen, et Reinhard Dummer. 2018. « Development of encorafenib for BRAF-mutated advanced melanoma ». *Current Opinion in Oncology* 30 (2): 125-33. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000426>.
- Kroemer, Guido, et Jacques Pouyssegur. 2008. « Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel ». *Cancer Cell* 13 (6): 472-82. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.005>.
- Kwon, Ok-Seon, Eun-Ji Kwon, Hyeon-Joon Kong, Jeong-Yoon Choi, Yun-Jeong Kim, Eun-Woo Lee, Wankyu Kim, Haeseung Lee, et Hyuk-Jin Cha. 2020. « Systematic Identification of a Nuclear Receptor-Enriched Predictive Signature for Erastin-Induced Ferroptosis ». *bioRxiv*, avril, 2020.04.13.038430.

- <https://doi.org/10.1101/2020.04.13.038430>.
- Larkin, J. 2014. « Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma ». *N. Engl. J. Med.* 371: 1867-76.
- Leiter, Ulrike, Ulrike Keim, et Claus Garbe. 2020. « Epidemiology of Skin Cancer: Update 2019 ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1268: 123-39. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46227-7_6.
- Liu, Xiao, Zheng Li, Ming Li, Jingxiu Chai, Shan He, Jinfeng Wu, et Jinhua Xu. 2020. « Icariside II Overcomes BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma by Inducing ROS Production and Inhibiting MITF ». *Oncology Reports* 44 (1): 360-70. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7582>.
- Liu, Ye, Xilan Zhang, Guoying Wang, et Xinchang Cui. 2021. « Triple Combination Therapy With PD-1/PD-L1, BRAF, and MEK Inhibitor for Stage III-IV Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Frontiers in Oncology* 11: 693655. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.693655>.
- Louphrasitthiphol, Pakavarin, Ioanna Ledaki, Jagat Chauhan, Paola Falletta, Robert Siddaway, Francesca M. Buffa, David R. Mole, Tomoyoshi Soga, et Colin R. Goding. 2019. « MITF controls the TCA cycle to modulate the melanoma hypoxia response ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 32 (6): 792-808. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12802>.
- Meyskens, Frank L., Susan E McNulty, Julie A Buckmeier, Nilou B Tohidian, Thomas J Spillane, Ravi S Kahlon, et Rachel I Gonzalez. 2001. « Aberrant Redox Regulation in Human Metastatic Melanoma Cells Compared to Normal Melanocytes ». *Free Radical Biology and Medicine* 31 (6): 799-808. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00650-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00650-5).
- Miao, Weimin, Liangao Hu, P. James Scrivens, et Gerald Batist. 2005. « Transcriptional Regulation of NF-E2 P45-Related Factor (NRF2) Expression by the Aryl Hydrocarbon Receptor-Xenobiotic Response Element Signaling Pathway: Direct Cross-Talk between Phase I and II Drug-Metabolizing Enzymes ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (21): 20340-48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412081200>.
- Müller, Judith, Oscar Krijgsman, Jennifer Tsoi, Lidia Robert, Willy Hugo, Chunying Song, Xiangju Kong, et al. 2014. « Low MITF/AXL Ratio Predicts Early Resistance to Multiple Targeted Drugs in Melanoma ». *Nature Communications* 5 (décembre): 5712. <https://doi.org/10.1038/ncomms6712>.
- Najt, Charles P., Mahima Devarajan, et Douglas G. Mashek. 2022. « Perilipins at a Glance ». *Journal of Cell Science* 135 (5): jcs259501. <https://doi.org/10.1242/jcs.259501>.
- Olzmann, James A, et Pedro Carvalho. 2019. « Dynamics and Functions of Lipid Droplets ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (3): 137-55. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>.
- Paris, Anaïs, Nina Tardif, Francesca M. Baietti, Cyrille Berra, Héloïse M. Leclair, Eleonora Leucci, Marie-Dominique Galibert, et Sébastien Corre. 2022. « The AhR-SRC Axis as a Therapeutic Vulnerability in BRAFi-Resistant Melanoma ». *EMBO Molecular Medicine*, octobre, e15677. <https://doi.org/10.15252/emmm.202215677>.
- Petan, Toni. 2023. « Lipid Droplets in Cancer ». *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 185: 53-86. https://doi.org/10.1007/112_2020_51.
- Rahman, Irfan, Aruna Kode, et Saibal K. Biswas. 2006. « Assay for Quantitative Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Levels Using Enzymatic Recycling Method ». *Nature Protocols* 1 (6): 3159-65. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>.
- Rambow, Florian, Aljosja Rogiers, Oskar Marin-Bejar, Sara Aibar, Julia Femel, Michael Dewaele, Panagiotis Karras, et al. 2018. « Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma ». *Cell* 174 (4): 843-855.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.025>.
- Robert, Caroline, Bogusława Karaszewska, Jacob Schachter, Piotr Rutkowski, Andrzej Mackiewicz, Daniil Stroiakovski, Michael Lichinitser, et al. 2014. « Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib ». Research-article. Massachusetts Medical Society. World. 31 décembre 2014. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412690>.
- Shao, Hanshuang, Diana Teramae, et Alan Wells. 2023. « Axl Contributes to Efficient Migration and Invasion of Melanoma Cells ». *PLoS One* 18 (3): e0283749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283749>.
- Shirley, Matt. 2018. « Encorafenib and Binimetinib: First Global Approvals ». *Drugs* 78 (12): 1277-84. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0963-x>.
- Talebi, Ali, Vincent de Laat, Xander Spotbeen, Jonas Dehairs, Florian Rambow, Aljosja Rogiers, Frank Vanderhoydonc, et al. 2023. « Pharmacological induction of membrane lipid poly-unsaturation sensitizes melanoma to ROS inducers and overcomes acquired resistance to targeted therapy ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 42 (1): 92. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02664-7>.
- Talty, Ronan, et Marcus Bosenberg. 2021. « The Role of Ferroptosis in Melanoma ». *Pigment Cell & Melanoma Research* n/a (n/a). <https://doi.org/10.1111/pcmr.13009>.
- Tang, Fengjie, Shiyang Li, Daisong Liu, Jian Chen, et Chaofei Han. 2020. « Sorafenib Sensitizes Melanoma Cells to Vemurafenib through Ferroptosis ». *Translational Cancer Research* 9 (3): 1584-93. <https://doi.org/10.21037/tcr.2020.01.62>.
- Tsoi, Jennifer, Lidia Robert, Kim Paraiso, Carlos Galvan, Katherine M. Sheu, Johnson Lay, Deborah J. L. Wong,

- et al. 2018. « Multi-Stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress ». *Cancer Cell* 33 (5): 890-904.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.017>.
- Turner, Jacqueline A., Emily L. Paton, Robert Van Gulick, Davide Stefanoni, Francesca Cendali, Julie Reisz, Richard P. Tobin, et al. 2022. « BRAF Modulates Lipid Use and Accumulation ». *Cancers* 14 (9): 2110. <https://doi.org/10.3390/cancers14092110>.
- Vergani, Elisabetta, Lorenza Di Guardo, Matteo Dugo, Sara Rigoletto, Gabrina Tragni, Roberta Ruggeri, Federica Perrone, et al. 2016. « Overcoming Melanoma Resistance to Vemurafenib by Targeting CCL2-Induced miR-34a, miR-100 and miR-125b ». *Oncotarget* 7 (4): 4428-41. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6599>.
- Viswanathan, Vasanthi S., Matthew J. Ryan, Harshil D. Dhruv, Shubhroz Gill, Ossia M. Eichhoff, Brinton Seashore-Ludlow, Samuel D. Kaffenberger, et al. 2017. « Dependency of a Therapy-Resistant State of Cancer Cells on a Lipid Peroxidase Pathway ». *Nature* 547 (7664): 453-57. <https://doi.org/10.1038/nature23007>.
- Vivas-García, Yurena, Paola Falletta, Jana Liebing, Pakavarin Louphrasitthiphol, Yongmei Feng, Jagat Chauhan, David A. Scott, et al. 2020. « Lineage-Restricted Regulation of SCD and Fatty Acid Saturation by MITF Controls Melanoma Phenotypic Plasticity ». *Molecular Cell* 77 (1): 120-137.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.014>.
- Wang, Hao, Hengxiang Zhang, Yuhua Chen, Huina Wang, Yangzi Tian, Xiuli Yi, Qiong Shi, et al. 2022. « Targeting Wnt/ β -Catenin Signaling Exacerbates Ferroptosis and Increases the Efficacy of Melanoma Immunotherapy via the Regulation of MITF ». *Cells* 11 (22): 3580. <https://doi.org/10.3390/cells11223580>.
- Wang, Meng, Shanshan Li, Youlin Wang, Hui Cheng, Jingjing Su, et Qinglin Li. 2020. « Gambogenic Acid Induces Ferroptosis in Melanoma Cells Undergoing Epithelial-to-Mesenchymal Transition ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 401 (août): 115110. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115110>.
- Wang, Sijia, Xiuli Yi, Zhenjie Wu, Sen Guo, Wei Dai, Huina Wang, Qiong Shi, Kang Zeng, Weinan Guo, et Chunying Li. 2021. « CAMKK2 Defines Ferroptosis Sensitivity of Melanoma Cells by Regulating AMPK-Nrf2 Pathway ». *The Journal of Investigative Dermatology*, juillet, S0022-202X(21)01416-0. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.05.025>.
- Ward, Patrick S., et Craig B. Thompson. 2012. « Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate ». *Cancer Cell* 21 (3): 297-308. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014>.
- Westermann, Benedikt. 2012. « Bioenergetic Role of Mitochondrial Fusion and Fission ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 17th European Bioenergetics Conference, 1817 (10): 1833-38. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.033>.
- Zanotelli, Matthew R., Zachary E. Goldblatt, Joseph P. Miller, Francois Bordeleau, Jiahe Li, Jacob A. Vanderburgh, Marsha C. Lampi, Michael R. King, et Cynthia A. Reinhart-King. 2018. « Regulation of ATP utilization during metastatic cell migration by collagen architecture ». *Molecular Biology of the Cell* 29 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0041>.
- Zhou, Nan, et Jinku Bao. 2020. « FerrDb: a manually curated resource for regulators and markers of ferroptosis and ferroptosis-disease associations ». *Database* 2020 (janvier): baaa021. <https://doi.org/10.1093/database/baaa021>.

Table EV1 List of RTqPCR primers

Gene	Direction	Sequence	Direction	Sequence	Figure
ALDH1A3	Forward	TCTCGACAAAGCCCTGAAGT	Reverse	TATTCGGCCAAAGCGTATTC	Figure 1H
ALDH1B1	Forward	TGTATTTGGCCCTCCCTCATC	Reverse	GCTCCAGGGTGACTCTCTTG	Figure 1H
ENO1	Forward	TCCCAACATCTCGAGAATAA	Reverse	ATGCCGATGACCACCTTATC	Figure 1H
ENO2	Forward	GGTCCAAGTTCACAGCCAAT	Reverse	CAGTTGCAGGCCCTTTCTTC	Figure 1H
GLS1	Forward	CTGCAGAGGCTCATGTTGAA	Reverse	ATCCATGGGAGTGTATTCCA	Figure 1H
GPI	Forward	CATCATTGCCTCCAAGACCT	Reverse	AGACAGGGCAACAAGTGCT	Figure 1H
IDH1	Forward	TTGTCCAAGATGGCAAGACAG	Reverse	GCTTTGCTCTGTGGGTAAC	Figure 1H
MDH1	Forward	GGAACCATCTCCTGACTCA	Reverse	GCTGCACAGCTGTGACAAAT	Figure 1H
MDH2	Forward	GGTTTCCATCAGTGGCCTAA	Reverse	TTCAGAGGCCACAGTGTCTG	Figure 1H
PCK2	Forward	CTGACAGAGCAGGTCAACCA	Reverse	CCCAGATGAGGGTGCTATGT	Figure 1H
PGC1a	Forward	TCTGACGTGACCATGTTGTT	Reverse	CATTCCAGGGACTCCACACT	Figure 1H
PKM	Forward	AGTACCATGGGAGACCATC	Reverse	GCCTTATCCAGCGTGATTTT	Figure 1H
PKM2	Forward	GCCGTTCCCTCCAGATCA	Reverse	GTCCCGGCTTCACTATGG	Figure 1H
SLC16A1	Forward	TCCAGCTCTGACCATGATTG	Reverse	GCCCCAAGAATTAGAAAGC	Figure 1H
SLC2A1	Forward	TCACTGTGCTCTGGTTCTG	Reverse	CCTCGGGTGTCTTGTCACTT	Figure 1H
SLC2A2	Forward	GGTTCATGGTGGCTGAGTTT	Reverse	TCCGCAATGTACTGGAAACA	Figure 1H
GPX4	Forward	TCAGCAAGATCTGCGTGAAC	Reverse	GGGGCAGTCCCTTCTCTATC	Figure 3I
FASN	Forward	CTAGGTTTATGCCTCCTCTT	Reverse	GATGGCTTACATAGTGACTTCC	Figure 3I
FTH1	Forward	CTGGAGCTCTACGCCTCCTA	Reverse	TGGTTCTGCAGCTTTCATCAG	Figure 3I
FTL	Forward	AGGCCCTTTGGATCTTCAT	Reverse	CAGGTGGTCACCCATCTTCT	Figure 3I
HMOX1	Forward	TCCGATGGTCTTACACTC	Reverse	TAAGGAAGCCAGCCAAGAGA	Figure 3I
NFE2L2	Forward	GCAGCGAAAGAGATGAGC	Reverse	GTTGGCAGATCCACTGGTTT	Figure 3I
PTGS2	Forward	TACTGGAAGCCAAGCACTTT	Reverse	GGACAGCCCTTCCAGTTATT	Figure 3I
SLC7A11	Forward	TTTTTGATCCACATTCCAA	Reverse	GAACCTCCCCAGAGGGAAC	Figure 3I
SIRT1	Forward	TGTACGACGAAGACGACGAC	Reverse	TTCATCACCAGCAAGAGGTT	Figure 3I
AhR	Forward	ACCAGCCTCAGGATGTGAAC	Reverse	TCATTATGCTGTACAAGTCACTGTTT	Appendix Figure S1
ACSL4	Forward	GAAGGAGTGAGGAACCATTAC	Reverse	CCTCCTGCACAACGTCAATA	Appendix Figure S2
PLIN3	Forward	CCTCACCCTATCAGTCAAGTGA	Reverse	CCCGGCCATATTCCTGATATT	Appendix Figure S2
TIMP1	Forward	TCCAGATAGCCCTGAATCCT	Reverse	TGCTGGGTGGTAACTTTTATT	Appendix Figure S4
ATG7	Forward	GGGATCCTGGACTCTTAAACT	Reverse	CCGATACTCGTTACGCTTCTTC	Appendix Figure S4
EGFR	Forward	TTCCCTCCAGTGCCTGAA	Reverse	GGTTCAGAGGCTGATTGTGGAT	Appendix Figure S4
FADS2	Forward	CATGACATGATGCTCCATAAGA	Reverse	GATCCCGTAGAAAGGGATGTAG	Appendix Figure S4
GABARAPL1	Forward	GAGCTGTTGGATTGGCTTTG	Reverse	CCTCCTGACCCATCTATGAAAC	Appendix Figure S4
KLF2	Forward	AGCTGAGAGGTTGTTGGTAATC	Reverse	GAAGTGAGGCCAGGCTATTT	Appendix Figure S4
NDRG1	Forward	CCACTTCCCCTTCTCTTT	Reverse	GGTGCTGCTGCTACTATTA	Appendix Figure S4
QSOX1	Forward	GTGCTGCTCCTGTCTTGATAC	Reverse	GGGACACCCCTCACAGAATATC	Appendix Figure S4
SCD1	Forward	CCTAGAAGCTGAGAACTGGTGA	Reverse	ACATCATCAGCAAGCCAGGT	Appendix Figure S4
SOCS1	Forward	CTTCTGTAGGATGGTAGCACAC	Reverse	AGGAAGAGGAGGAAGGTTCT	Appendix Figure S4
TGFB1	Forward	CCTGCTGTCTGCACATTC	Reverse	TGCCAAGGTGCTCAATAAA	Appendix Figure S4
HPRT	Forward	GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA	Reverse	GGTCTTTCACAGCAAGCT	Housekeeping gene

Table 2 List of Antibodies

Protein	Companies	Ref	dilution
AhR (A-3)	Santa Cruz Biotechnology	sc-133088	1/1000
MITF (C-5)	Merck	MAB3747	1/1000
ACSL4/FACL4	Novus Biologicals	NBP2-16401	1/1000
PLIN3/TIP47	Novus Biologicals	NB110-40764R	1/1000
HSC70 (B-6)	Santa Cruz Biotechnology	sc-7298	1/3000

Table 3 Sequences fo siNA

siAh#1	IDT DNA	hs.i.AH.13.1	Sens 5'-3'	AUCUCCAUGAUGAUAGUUGAAUGTT
siAh#2	IDT DNA	hs.i.AH.13.2	Sens 5'-3'	AAGAAUUGUUUUAGGAUACUGAA
siMITF#1	IDT DNA	hs.i.MITF.13.1	Sens 5'-3'	GUUUCAUGAUGGUAUCUAUAGUCAA
siMITF#2	IDT DNA	hs.i.MITF.13.2	Sens 5'-3'	AAUCACAACCUGAUUGAACGAAGAA
siPLIN3	IDT DNA	hs.i.PLIN3.13.1	Sens 5'-3'	CUUCUUUGUUUACACCGAUGUCCT
Scambled Negative Contol DsiNA, 5 nmol	IDT DNA	51-01-19-09		

Discussion

1. Résumé du contexte

Les résultats des multiples études cherchant à déterminer les mécanismes par lesquels les tumeurs de mélanomes mutées *BRAF* V600 finissent systématiquement par résister aux thérapies ciblées semblent converger vers le rôle primordial de l'hétérogénéité phénotypique des cellules tumorales et de la reprogrammation transcriptionnelle, plutôt que vers la simple acquisition d'une mutation de résistance. Les rôles joués par certains facteurs de transcription clés dans ces phénomènes de changements adaptatifs du phénotype sont largement étudiés. Mon projet de thèse s'inscrit dans cette logique, ainsi que dans la continuité des précédents travaux de l'équipe, ayant permis d'impliquer le facteur de transcription AhR dans le basculement des cellules de mélanome vers un état invasif et résistant aux BRAFi. Par ailleurs, un nombre croissant de preuves suggère que la reprogrammation du métabolisme énergétique est un aspect crucial de ces changements phénotypiques au cours de l'acquisition de la résistance. Dans le but d'étudier le lien entre AhR et ces changements métaboliques, j'ai pu utiliser les couples de lignées cellulaires sensibles et résistantes de mélanome, invalidées ou non pour le gène *AhR* par CRISPR-Cas9, préalablement mis en place par notre laboratoire comme modèle d'étude.

2. Reprogrammation métabolique des cellules résistantes

Nos analyses métaboliques sur ces modèles cellulaires montrent, tout d'abord, la corrélation entre sensibilité aux BRAFi et glycolyse aérobie d'un côté, ainsi qu'entre résistance aux BRAFi et phosphorylation oxydative de l'autre, en accord avec ce qui est décrit dans la littérature. Nos résultats confirment également le rôle du facteur de transcription MITF comme senseur des conditions métaboliques et pilote du métabolisme énergétique dans les cellules sensibles. Parallèlement, nous avons montré que, malgré leur dépendance accrue à l'égard de la phosphorylation oxydative, les SKR ont une masse et une différence de potentiel mitochondriale paradoxalement inférieures à celles des SKS. De surcroît, la comparaison des données de séquençages ARN réalisés sur les SKS et les SKR montre, de façon significative, une forte diminution de l'expression des gènes en lien avec le cycle TCA et la phosphorylation oxydative. Cela pourrait être expliqué par le phénomène de mitophagie, une forme sélective d'autophagie visant à dégrader uniquement les mitochondries inefficentes. La mitophagie tend donc à réduire la masse totale des mitochondries par cellule, afin d'optimiser la production d'ATP²¹⁶. En outre, l'analyse de ces mêmes données de séquençages ARN révèle que la signature associée à la mitophagie est la plus fortement surexprimée dans les SKR. Cependant, cette voie vise également à limiter la production de ROS d'origine mitochondriale. Or nos résultats montrent

que les SKR produisent davantage de ROS que les SKS, à la fois dans le cytoplasme et dans les mitochondries. Il se pourrait donc que la diminution de la masse et du potentiel de membrane mitochondriaux dans les SKR soit en réalité le reflet d'une dysfonction de ces organites, qui favoriserait par la même occasion la production de ROS. Dans un tel scénario, l'induction de la mitophagie pourrait alors constituer un mécanisme d'adaptation des cellules résistantes, éliminant constamment les mitochondries les plus endommagées afin de limiter le stress oxydant qu'elles génèrent, tout en maintenant une production d'énergie suffisante. En ce sens, la mesure de l'activité mitochondriale par la technologie Seahorse révèle une capacité de respiration maximale et une réserve respiratoire significativement réduites dans les SKR, en comparaison des SKS (données non montrées). Cela suggère donc qu'à l'état basal, les mitochondries dans les SKR fonctionnent déjà à leur plein potentiel pour maintenir une production satisfaisante d'ATP, ne laissant que très peu de marge d'adaptation pour compenser un éventuel stress énergétique. Les images de microscopie confocale, même si elles ne montrent pas une nette diminution de la quantité de mitochondries, semblent révéler un réseau mitochondrial davantage fusionné et confluent dans les SKR, ce qui est cohérent avec un besoin d'optimisation de la phosphorylation oxydative. L'analyse plus poussée de ces images par des algorithmes bio-informatiques est en cours, afin de quantifier plus précisément la masse et le degré de fusion du réseau mitochondrial. Ce modèle de dysfonction mitochondriale permet d'interpréter sous un autre jour la sensibilité accrue des cellules résistantes à la roténone et au FCCP. En effet, ces molécules induisent respectivement l'inhibition et le découplage de la chaîne respiratoire, mais elles favorisent par la même occasion une forte production de ROS au sein des mitochondries. Leur effet cytotoxique est donc d'autant plus important que la cellule présente à la fois une fonction mitochondriale limitée, et une production basale de ROS importante. Pour étayer de façon plus approfondie cette hypothèse, il pourrait être intéressant de mesurer l'expression des gènes pilotant la mitophagie par RTqPCR et Western-Blot, comme ATG5, Parkin, PINK1, ou encore BNIP3, ainsi que d'évaluer par la technologie Seahorse, l'efficacité d'extrait de mitochondries isolées de nos modèles cellulaires. Parallèlement, il serait également nécessaire de mesurer la sensibilité des SKS et des SKR à des doses croissantes de ROS, afin d'évaluer leur vulnérabilité au stress oxydant. Il serait ainsi possible d'estimer plus précisément à quel point l'effet de la roténone et du FCCP est médié à la fois par le blocage de la chaîne respiratoire et par l'induction d'un stress oxydant mitochondrial.

3. Résistance aux BRAFi et sensibilité à la ferroptose

Au-delà de leur dépendance accrue à l'égard de la respiration mitochondriale, nos résultats montrent que les SKR sont également plus sensibles à la ferroptose, une forme de mort cellulaire programmée médiée par la peroxydation des acides gras membranaires. En effet, les SKR exhibent une sensibilité significativement plus importante que les SKS aux inducteurs chimiques de la ferroptose éraستine, IKE

et FIN56, telle qu'observée par des expériences d'IC50 et par comptage de la mortalité non-apoptotique. De surcroît, la mesure directe de la peroxydation lipidique par cytométrie en flux avec le marqueur fluorescent C11-BODIPY™, montre que les SKR accumulent davantage de lipides peroxydés que les SKS à l'état basal, et de façon encore plus spectaculaire après induction d'un stress oxydant par exposition au peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Les SKR luttent donc moins efficacement que les SKS contre l'accumulation de peroxydes lipidiques lorsqu'elles subissent un stress oxydant. Étonnamment, la proportion de lipides peroxydés n'augmente que faiblement après traitement par l'IKE ou la roténone, de puissants inducteurs de la ferroptose et du stress oxydant d'origine mitochondriale respectivement. De plus, cette augmentation n'est que faiblement plus importante dans les SKR, ce qui n'est pas cohérent avec leur sensibilité accrue observée dans les expériences précédentes. Il pourrait s'agir d'un problème expérimental, lié par exemple au temps d'incubation des molécules ou de leur concentration, insuffisantes pour déclencher un effet significatif.

Il semblerait malgré tout que les mécanismes mobilisés au cours de la résistance, bien que réduisant la mortalité induite par les inhibiteurs de la voie MAPK, exposent par la même occasion les cellules à des vulnérabilités nouvelles. Tout d'abord, la diminution significative dans les SKR de l'expression de *GPX4*, le principal moyen de défense des cellules contre la ferroptose, pourrait constituer le premier mécanisme sous-jacent de cette vulnérabilité.

Par ailleurs, la plus forte production de ROS observée dans les SKR pourrait constituer une seconde explication à ce phénomène. En effet, les ROS sont capables de provoquer des réactions de peroxydation lipidique, et donc d'initier la ferroptose, ou *a minima* d'installer un climat favorable à son déclenchement. L'expression nettement plus importante dans les SKR du transporteur de cystine *SLC7A11*, indispensable pour la synthèse du glutathion et donc pour la lutte contre le stress oxydant, pourrait correspondre à un mécanisme d'adaptation des cellules résistantes à cette production accrue de ROS. La diminution de la proportion de glutathion sous forme réduite dans les SKR, par rapport à sa forme oxydée, suggère une activité oxydante accrue dans ces cellules, ce qui renforce donc cette hypothèse. La diminution de ce ratio suggère également que l'élimination des peroxydes lipidiques est moins efficace dans les SKR, étant donné que l'activité de l'enzyme *GPX4* est dépendante de la présence de glutathion réduit. En supposant que cette plus grande abondance de ROS dans les SKR provient de la phosphorylation oxydative, il est ainsi possible d'établir un lien direct entre la reprogrammation du métabolisme énergétique des cellules résistantes et leur plus grande susceptibilité à cette forme de mort cellulaire.

Néanmoins, il est tout à fait envisageable que d'autres mécanismes, sans rapport direct avec le métabolisme énergétique, soient également en œuvre. En effet, les ROS analysés dans notre étude

sont l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), d'origine mitochondriale, et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), issu de la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ ainsi que de multiples autres sources. Or, l'espèce réactive à l'origine de la peroxydation lipidique est le radical hydroxyle (HO^{\bullet}), qui n'est pas produit directement par la phosphorylation oxydative. En revanche, il peut être produit à partir d' $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 par la réaction de Fenton ou de Haber-Weiss, nécessitant toutes deux la présence de fer labile Fe^{2+} . La peroxydation lipidique médiée par les enzymes lipoxygénases (LOX), bien que n'impliquant pas les ROS, nécessite, elle aussi, la présence de fer labile pour catalyser la réaction. La présence de fer labile est donc indispensable à l'initiation de la ferroptose, qu'elle soit enzymatique ou non-enzymatique. Elle favorise aussi grandement l'étape de propagation à travers les membranes phospholipidiques, toujours par l'intermédiaire de la chimie de Fenton. Il est donc hautement probable que certaines voies en lien avec le métabolisme du fer soient également impliquées dans la susceptibilité à la ferroptose des SKR. En faveur de cette hypothèse, nous avons mesuré, par cytométrie en flux, une concentration de fer labile plus élevée dans les SKR avec le marqueur fluorescent FerroOrange. Également en ce sens, nos résultats montrent que les gènes codant pour les chaînes lourdes et légères de la ferritine sont davantage exprimés dans les SKR, suggérant que le stock intracellulaire de fer est plus grand dans ces cellules. Cependant, au sein de la ferritine le fer est piégé sous une forme non-ionique, insoluble, et donc non réactive. Ces résultats ne permettent donc pas d'expliquer directement cette concentration accrue en ions ferreux Fe^{2+} . Il se pourrait, par exemple, que l'absorption du fer labile soit plus élevée, comme le suggère la plus forte expression dans les SKR du transporteur d'ions ferreux *DMT1*, ou du récepteur de la transferrine *TFRC* d'après nos données de séquençage ARN. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de cette voie d'absorption, afin de comparer son impact sur la sensibilité aux inducteurs de ferroptose entre les SKS et les SKR. Par ailleurs, la libération du fer piégé au sein de la ferritine est médiée par une voie appelée ferritinophagie, dont l'acteur principal est la protéine NCOA4. Cette dernière agit comme un pont entre la ferritine et le compartiment lysosomal, au sein duquel la ferritine sera dégradée. L'étude de cette voie pourrait donc apporter des éléments de compréhension supplémentaires concernant la susceptibilité accrue des cellules résistantes à la ferroptose.

Outre le métabolisme du fer, il est également souhaitable d'étudier de façon plus approfondie le métabolisme des lipides sur nos différents modèles. En effet, les réactions de peroxydation touchent de façon privilégiée les acides gras insaturés, c'est-à-dire comprenant une double-liaison carbone-carbone au sein de leur chaîne aliphatique. Plus le nombre de double-liaisons est important, plus l'acide gras subira de réactions de peroxydations, et donc plus il contribuera à la mort de la cellule. La susceptibilité des cellules à la ferroptose est donc directement corrélée au degré d'insaturation des acides gras qui la composent. L'étude de données métabolomiques issues du CCLE avec l'outil Depmap

a permis d'observer un net enrichissement en acides gras polyinsaturés dans les lignées résistantes aux thérapies ciblées. Parallèlement, l'expression mesurée par RTqPCR de *FADS2* et *ACSL4*, deux gènes contribuant à l'enrichissement en acides gras polyinsaturés dans les membranes lipidiques, est plus élevée dans les SKR, confortant ainsi l'observation précédente. L'étude de la composition en acides gras polyinsaturés de nos différentes lignées sensibles et résistantes, par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, permettrait donc de vérifier si cette tendance se confirme. Les gouttelettes lipidiques sont des structures cytoplasmiques dynamiques contribuant principalement au stockage de nombreux lipides, à la régulation de leur métabolisme, et à leur protection contre les agressions chimiques comme la peroxydation. Leur implication dans la régulation de la ferroptose est donc tout à fait possible. Plusieurs approches microscopiques nous ont permis d'observer un nombre moyen de gouttelettes lipidiques par cellule légèrement plus important dans les SKS, ce qui pourrait expliquer en partie leur moindre sensibilité aux inducteurs de ferroptose. Une fois de plus, l'analyse de la composition en acides gras insaturés de ces gouttelettes lipidiques pourrait améliorer notre compréhension de leur implication dans la régulation de la ferroptose. Néanmoins, la signification de leur différence de répartition au sein du cytoplasme des SKS et des SKR, telle que nous l'avons observée, reste encore à déterminer.

Enfin, plusieurs de nos résultats suggèrent que l'inhibition de la glycolyse par la privation en glucose induit une sensibilisation de nos cellules à la ferroptose. Notamment, les SKS et les SKR présentent une nette augmentation de la proportion de lipides peroxydés après culture dans un milieu appauvri en glucose. De plus, nos données de séquençage ARN montrent une surexpression des gènes du métabolisme du fer et du glutathion, ainsi que des gènes *FADS1*, *FADS2* et *ACSL4* impliqués dans l'enrichissement des membranes en acides gras polyinsaturés, après culture des cellules dans un milieu appauvri en glucose. Comme cela vient d'être abordé, ces voies contribuent en théorie à sensibiliser les cellules à la ferroptose. La privation de glucose, et l'inhibition de la glycolyse de façon plus générale, pourraient donc sensibiliser les cellules à cette mort cellulaire. La mesure de l'IC50 de nos molécules dans du milieu pauvre en glucose, ou en combinaison avec un inhibiteur de la glycolyse comme le 2-DG seraient donc des expériences intéressantes pour explorer plus avant cette hypothèse.

4. Implication du facteur de transcription AhR

Dans le but de poursuivre les précédents travaux de l'équipe, nous avons évalué l'implication du facteur de transcription AhR par le biais de différentes méthodes tout au long de ce projet. En effet, certains groupes de recherche montrent déjà des résultats en faveur de l'implication de AhR dans la reprogrammation du métabolisme énergétique dans les cellules résistantes de mélanome. Par exemple, l'inhibition et l'activation de AhR diminue et stimule respectivement la fonction

mitochondriale de lignées humaines de leucémie aigüe myéloïde¹³⁵. De plus, une étude menée sur une lignée d'hépatome humain montre que AhR peut se transloquer dans les mitochondries et y réguler la phosphorylation oxydative de façon non-transcriptionnelle en se liant au complexe ATP-synthase¹³⁷. Cependant, nos résultats suggèrent qu'AhR n'a qu'un impact limité sur le métabolisme énergétique dans nos modèles, car son expression n'est pas affectée par la privation de glucose, et sa répression par CRISPR-cas9, ARN interférence, ou inhibition chimique, n'ont permis ni de restaurer un profil métabolique semblable à celui des cellules sensibles, ni à prévenir l'augmentation de la résistance induite par la privation de glucose. Cela montre donc qu'AhR n'est pas suffisant pour réguler ces phénomènes à lui seul.

En revanche, l'outil d'analyse CellMiner révèle une forte corrélation positive entre l'expression de AhR et la sensibilité à l'éraстine, un inducteur chimique de la ferroptose, dans diverses lignées cellulaires. Nos expériences de mesure d'IC50 et du rapport apoptose/nécrose avec les inducteurs chimiques de ferroptose (éraстine, IKE et FIN56) montrent une nette diminution de la sensibilité des SKR KO *AhR* par rapport à leurs homologues sauvages, confirmant ainsi les données de CellMiner. Il serait donc intéressant de déterminer par quels mécanismes AhR favorise cette sensibilité dans les cellules résistantes. En premier lieu, la forte diminution de la production mitochondriale d'anion superoxyde mesurée par cytométrie en flux dans les SKR KO *AhR* suggère que ce dernier est impliqué dans l'induction du stress oxydant des cellules résistantes. L'augmentation du rapport glutathion réduit/oxydé dans cette même lignée en comparaison de la lignée sauvage va dans le sens de cette hypothèse. Ces résultats sont également cohérents avec certaines données de la littérature, montrant que l'activation de AhR par son ligand TCDD induit un stress oxydant mitochondrial sur une lignée humaine de cardiomyocytes¹³⁶, ou encore *in vivo* sur un modèle murin^{217,218}. Ces différents résultats pourraient donc signifier qu'AhR contribue à maintenir un climat favorable au déclenchement de la ferroptose dans les cellules résistantes en favorisant la production de ROS d'origine mitochondriale. En faveur de cette hypothèse, les SKR KO *AhR* exhibent une forte baisse d'expression de *SLC7A11* en comparaison des SKR sauvages, ce qui pourrait donc signifier une moindre dépendance de ces cellules vis-à-vis du métabolisme du glutathion. Par ailleurs, le KO de *AhR* dans les SKR permet de restaurer l'expression de *GPX4* et *FASN*, des gènes contribuant à la lutte contre la ferroptose. On observe également sur cette même lignée une baisse significative de l'expression de plusieurs gènes drivers de la ferroptose notamment *ACSL4*, *HMOX1* et *SIRT1*, ainsi que des gènes *PTGS2* et *NRF2*, considérés comme des marqueurs de la ferroptose. Il se pourrait donc que le rôle joué par AhR dans la promotion de la ferroptose ne se limite pas uniquement à l'induction d'un stress oxydant, mais s'étende également au contrôle de l'expression de gènes impliqués dans diverses voies de régulation de cette forme de mort cellulaire. Néanmoins, pour renforcer cette hypothèse, il serait nécessaire de

reproduire ces différentes expériences sur la lignée SKR KO *AhR* après induction d'une expression ectopique du facteur de transcription activé de façon constitutive, afin de déterminer si le phénotype des cellules sauvages peut ou non être restauré.

Enfin, l'étude des gouttelettes lipidiques révèle que les SKR KO *AhR* exhibent un nombre moyen par cellule significativement plus faible que les SKR sauvages. Les gouttelettes lipidiques ayant un rôle protecteur vis-à-vis de la ferroptose, ce résultat n'est pas cohérent avec le rôle pro-ferroptotique supposé de AhR. En revanche, il se pourrait qu'AhR participe à la formation des gouttelette lipidiques en favorisant l'absorption et la β -oxydation des lipides dans les cellules résistantes, comme cela a déjà été montré sur des cellules bronchiques humaines et murines traitée par un ligand de AhR²¹⁹ (FICZ). De plus, la forte surexpression de *PLIN3* dans les SKR, un gène connu pour son implication dans la régulation des gouttelettes lipidiques, est perdue après le KO de AhR. La déplétion de *PLIN3* par ARN interférence dans les SKR tend à réduire la localisation périnucléaire des gouttelettes lipidiques. Il est donc possible que, par l'intermédiaire de *PLIN3*, AhR participe à la localisation périnucléaire des gouttelettes lipidiques dans les cellules résistantes, ce qui pourrait alors favoriser la β -oxydation, ainsi que la peroxydation des acides gras qu'elles contiennent. Des expériences complémentaires sont bien entendu indispensables pour confirmer une telle hypothèse.

5. Activation de AhR dans les cellules résistantes

L'implication de AhR dans l'initiation et la progression de nombreux cancers est aujourd'hui bien établie, mais les mécanismes sous-jacents demeurent incertains. L'absence d'altérations récurrentes sur le gène dans les cellules résistantes suggère que l'augmentation de son activité pourrait être attribuée à sa liaison avec un ligand endogène, produit de façon autocrine ou paracrine et au contact duquel AhR se retrouverait activé. La principale voie de production de ligands endogènes de AhR est celle de la biosynthèse de la kynurénine à partir du tryptophane, impliquant les enzymes TDO (tryptophane 2,3-dioxygénase) et IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase)²²⁰. De manière intéressante, la suractivation de IDO est de mauvais pronostic dans plusieurs cancers, notamment le mélanome. En outre, l'axe IDO/Kynurénine/AhR joue un rôle majeur dans la réponse aux immunothérapies anti-PD1 du mélanome en favorisant l'échappement immunitaire²²¹. Il serait donc pertinent de déterminer les liens qui peuvent exister entre la reprogrammation du métabolisme énergétique, la voie de synthèse de la kynurénine, et l'activation de AhR, au cours de l'acquisition de la résistance aux thérapies ciblées. Il pourrait également être envisageable que les dérégulations enzymatiques induites par la reprogrammation du catabolisme glucidique ou lipidique entraînent l'accumulation de certains intermédiaires métaboliques capable de lier et d'activer AhR. L'analyse métabolomique du produit

d'immunoprécipitation de AhR par spectrométrie de masse constituerait ainsi une première stratégie pour explorer plus avant cette hypothèse.

6. Régulation de la balance AhR-MITF

D'après nos résultats, il ne semble pas y avoir de relation de causalité directe entre les niveaux d'expression/activité de MITF et de AhR. En effet, la répression de AhR par CRISPR-Cas9 et par inhibition chimique avec le CH223191 n'ont pas permis de restaurer l'expression de *MITF* dans les SKR, ni à prévenir la perte d'expression de *MITF* induite par la privation de glucose dans les SKS. Cette observation suggère que d'autres acteurs sont impliqués dans leur régulation respective, comme par exemple les facteurs de transcription ATF4 et NRF2, qui ont été montrés comme réprimant l'expression de *MITF* dans des conditions de stress métabolique et oxydant respectivement^{125,179}. De plus, les résultats de certains travaux montrent que l'activation de AhR induit l'expression de *ATF4* dans des lignées de carcinome broncho-pulmonaire²²² et celle de *NRF2* dans des lignées d'hépatome²²³. L'invalidation isolée ou combinée de ces gènes par CRISPR-Cas9 et ARN interférence sur nos lignées SKS et SKR permettrait d'étudier leurs régulations mutuelles, ainsi que d'élucider leur influence sur les profils métaboliques et sur la résistance aux thérapies ciblées. Ceci est d'autant plus crucial que AhR, ATF4 et NRF2 partagent des gènes cibles communs impliqués dans la détoxification et la réponse au stress²²⁴. Il pourrait également être intéressant de se pencher sur le rôle joué par les ARN non-codants dans la résistance et la reprogrammation métabolique des cellules de mélanome. Les récents progrès en biologie moléculaire ont révélé que ces derniers, notamment les microARN, jouent des rôles clés dans la régulation de l'expression des gènes et la pathogenèse des maladies. Depuis peu, notre laboratoire s'intéresse aux ARN circulaires (circARN), une catégorie particulière d'ARN non-codants formés par rétro-épissage. Plus particulièrement, certains membres de l'équipe étudient leur capacité à séquestrer des microARN, et ainsi à moduler l'expression de leurs gènes cibles. Dans cet objectif, un outil de prédiction in silico des réseaux d'interactions microARN/circARN/ARNm a été développé au sein de l'équipe, et pourrait être utilisé pour identifier des microARN et des circARN potentiellement importants pour le contrôle de l'expression de AhR et de MITF. Une autre façon de lier les deux projets et de valoriser cet outil serait de l'utiliser pour identifier les réseaux d'interactions microARN/circARN/ARNm impliqués, de façon plus générale, dans la régulation de la glycolyse aérobie dans les cellules sensibles, ou de la phosphorylation oxydative dans les cellules résistantes, ce qui étendrait le spectre des cibles thérapeutiques potentielles.

7. La ferroptose comme cible thérapeutique

La résistance aux thérapies ciblées s'avère être un problème clinique majeur dans le combat contre le mélanome, imposant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Mon projet de thèse se concentre sur les changements du métabolisme énergétique opérés dans les cellules résistantes aux BRAFi et la possibilité de les exploiter comme une nouvelle cible thérapeutique. Les résultats de mes travaux révèlent que des modifications du métabolisme énergétique, ainsi que des changements dans l'équilibre oxydo-réducteur, pilotés respectivement par la perte du facteur de transcription MITF et l'activation du facteur de transcription AhR, aboutissent à une vulnérabilité accrue à la ferroptose dans notre lignée humaine de mélanome résistant. Il s'agit d'une forme de mort cellulaire programmée, médiée par la peroxydation des lipides membranaires, qui peut donc théoriquement être exploitée comme un talon d'Achilles pour détruire efficacement les cellules de mélanome résistantes aux BRAFi. Afin de prouver cela *in vitro*, nous avons exposé un mélange de cellules sensibles et résistantes (SKS et SKR) à un traitement combiné par BRAFi (vemurafenib) et inducteur chimique de la ferroptose (IKE). Les résultats montrent, de façon claire, que la combinaison des deux molécules est plus efficace pour supprimer l'ensemble des populations cellulaires, que l'une ou l'autre de ces molécules en monothérapie. De plus, les résultats de cicatrisation cellulaire et de croissance de sphéroïdes *in vitro* suggèrent que les inducteurs de ferroptose, outre leur capacité à induire la mort cellulaire, sont également capables d'inhiber la migration et l'invasion des cellules résistantes. Cela signifie que l'utilisation clinique de ces molécules de façon précoce pourrait ralentir la progression de la maladie en réduisant l'agressivité de la tumeur et le risque de métastase. Néanmoins, des expériences complémentaires, comme l'analyse individuelle en temps réel des vitesses et des distances de migration cellulaires, ou l'utilisation de kits commerciaux dédiés à la mesure de l'invasion, sont indispensables afin de confirmer que ces effets ne sont pas uniquement dus à l'inhibition de la prolifération.

Une limite importante de cette étude est l'utilisation d'un modèle cellulaire résistant uniquement aux BRAFi en monothérapie, et non à la combinaison BRAFi/MEKi désormais utilisée en pratique courante. Une autre limite majeure est l'absence d'utilisation de modèle animal, beaucoup plus proche de la réalité biologique que nous souhaitons étudier. Afin de pallier ces deux limites, nous allons très prochainement démarrer des études *in vivo* utilisant un modèle PDX de mélanome résistant aux BRAFi/MEKi. Ce modèle a déjà été utilisé auparavant par l'équipe pour mesurer l'efficacité du dasatinib, un inhibiteur de la kinase Src¹³⁴. Cette nouvelle étude, qui sera réalisée en collaboration avec la plateforme TRACE au VIB Institute à Louvain en Belgique, visera à tester l'efficacité de l'IKE, un inducteur chimique de la ferroptose spécifiquement développé pour une utilisation *in vivo*, en

combinaison avec un BRAFi, à réduire la croissance tumorale et améliorer la survie des souris traitées. Cette expérience sera également l'occasion d'évaluer la toxicité globale et les principaux effets indésirables d'une telle stratégie thérapeutique. Divers travaux récents ont déjà étudié l'efficacité des différents inducteurs chimiques de la ferroptose²²⁵, notamment les inhibiteurs de GPX4 (ML162, ML210, RSL3, FIN56) et les inhibiteurs du transporteur de cystine Xc- (érasatine, IKE), sur des modèles pré-cliniques de mélanome. Par ailleurs, d'autres études explorent la modulation de certaines voies métaboliques dans le mélanome pour activer la ferroptose. Talebi et al ont par exemple montré que l'accumulation d'acides gras polyinsaturés, combinée à une augmentation de la production de ROS, induites respectivement par un inhibiteur de FASN et le trioxyde d'arsenic, atténuent la prolifération de mélanomes résistants aux thérapies ciblées et favorise indirectement la ferroptose²²⁶. De façon similaire, le ciblage du métabolisme lipidique par la privation en lipides, ou l'inhibition de ACAT2 et SOAT, a réduit la croissance des cellules de mélanome résistantes aux thérapies ciblées, augmenté leur sensibilité aux BRAFi et induit une augmentation de la ferroptose²²⁷. D'autres travaux ont étudié l'intérêt de promouvoir un métabolisme oxydatif au détriment du métabolisme glucidique pour favoriser l'accumulation de ROS²²⁸. Inversement, certains chercheurs choisissent d'inhiber la phosphorylation oxydative afin de resensibiliser les cellules résistantes aux BRAFi²²⁹. En revanche, peu de travaux ont utilisé des modèles animaux pour évaluer l'efficacité des inducteurs chimiques de la ferroptose sur les tumeurs de mélanome résistantes aux BRAFi/MEKi, ou leur capacité à prévenir l'émergence d'une résistance au cours de la thérapie ciblée conventionnelle. En outre, aucun essai clinique n'a à ce jour été réalisé pour étudier leur intérêt dans le traitement du mélanome. La réalisation préalable de telles études sur des modèles animaux semble donc importante, afin de poser les jalons pour de futurs essais cliniques, qui mèneront peut-être un jour vers l'utilisation des inducteurs de la ferroptose en pratique courante.

Dans une telle perspective, il serait pertinent de réfléchir aux meilleures façons d'intégrer les inducteurs de ferroptose aux stratégies thérapeutiques déjà existantes. Le scénario le plus probable, dans un premier temps, est la réalisation d'essais cliniques chez des patients en impasse thérapeutique après plusieurs lignes de traitements successives par BRAFi/MEKi, si la tumeur est mutée *BRAF* V600, et/ou par inhibiteurs de checkpoints immunitaires. La molécule serait alors évaluée en monothérapie, ou préférentiellement en combinaison avec un BRAFi, par rapport à un traitement placebo. Si de tels essais montrent à la fois une amélioration satisfaisante de la survie globale et une toxicité tolérable, alors des essais en 2^{ème} ligne de traitement pourraient ensuite voir le jour. L'objectif final, dans un scénario idéal, serait que les inducteurs de la ferroptose soient utilisés en combinaison avec les thérapies conventionnelles actuelles dès la 1^{ère} ligne de traitement, afin de cibler de façon synergique à la fois les cellules sensibles et les cellules prédisposées à développer une résistance à ces dernières.

Néanmoins, il est crucial de noter que plusieurs mécanismes de résistance à ces inducteurs ont déjà été mis en évidence dans le contexte du mélanome. Ces connaissances devront être prises en compte lors de la conception des futurs essais cliniques.

8. Conclusion

Les résultats de mon projet de thèse doctorale convergent vers une corrélation entre la résistance des cellules de mélanome aux inhibiteurs de la voie MAPK et leur vulnérabilité face à la mort par ferroptose. Ces observations, combinées à une quantité croissante de données dans la littérature, nous amènent à envisager l'utilisation des inducteurs chimiques de la ferroptose comme pourvoyeurs d'une nouvelle forme de léthalité synthétique, pouvant être exploitée de façon clinique pour améliorer la survie des patients atteints d'un mélanome muté *BRAF* V600. Dans les années à venir, la recherche consacrée à la ferroptose en rapport avec le cancer poursuivra sans doute son expansion, et nous orientera probablement vers la découverte de nouveaux régulateurs potentiels de ce processus. Finalement, la ferroptose s'affirme progressivement comme un domaine d'investigation de premier plan dans la lutte contre le mélanome.

Bibliographie :

1. Larue, L., Kumasaka, M. & Goding, C. R. β -Catenin in the Melanocyte Lineage. *Pigment Cell Res.* **16**, 312–317 (2003).
2. Mort, R. L., Jackson, I. J. & Patton, E. E. The melanocyte lineage in development and disease. *Development* **142**, 620–632 (2015).
3. Quevedo, W. C., Fitzpatrick, T. B., Pathak, M. A. & Jimbow, K. Role of light in human skin color variation. *Am. J. Phys. Anthropol.* **43**, 393–408 (1975).
4. Lin, J. Y. & Fisher, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **445**, 843–850 (2007).
5. Thody, A. J. *et al.* Pheomelanin as well as Eumelanin Is Present in Human Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 340–344 (1991).
6. Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A. & Tyimińska, A. Skin melanocytes: biology and development. *Adv. Dermatol. Allergol.* **1**, 30–41 (2013).
7. Cadet, J. & Douki, T. Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochem. Photobiol. Sci.* **17**, 1816–1841 (2018).
8. Cui, R. *et al.* Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation. *Cell* **128**, 853–864 (2007).
9. Goding, C. R. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.* **14**, 1712–1728 (2000).
10. Nasti, T. H. & Timares, L. MC 1R, Eumelanin and Pheomelanin: Their Role in Determining the Susceptibility to Skin Cancer. *Photochem. Photobiol.* **91**, 188–200 (2015).
11. Bastian, B. C. The Molecular Pathology of Melanoma: An Integrated Taxonomy of Melanocytic Neoplasia. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **9**, 239–271 (2014).
12. Chang, A. E., Karnell, L. H. & Menck, H. R. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: A summary of 84,836 cases from the past decade. *Cancer* **83**, 1664–1678 (1998).
13. Corrie, P., Hategan, M., Fife, K. & Parkinson, C. Management of melanoma. *Br. Med. Bull.* **111**, 149–162 (2014).
14. Memon, A. *et al.* Changing epidemiology and age-specific incidence of cutaneous malignant melanoma in England: An analysis of the national cancer registration data by age, gender and anatomical site, 1981–2018. *Lancet Reg. Health - Eur.* **2**, 100024 (2021).
15. Yang, C. Q. *et al.* Integrating additional factors into the TNM staging for cutaneous melanoma by machine learning. *PLOS ONE* **16**, e0257949 (2021).
16. Berwick, M. *et al.* Melanoma Epidemiology and Prevention. in *Melanoma* (eds. Kaufman, H. L. & Mehnert, J. M.) vol. 167 17–49 (Springer International Publishing, 2016).
17. Akbani, R. *et al.* Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* **161**, 1681–1696 (2015).

18. Fitzpatrick, T. B. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. *Arch. Dermatol.* **124**, 869 (1988).
19. Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C. R. & Alaibac, M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *Vivo Athens Greece* **28**, 1005–1011 (2014).
20. Potrony, M. *et al.* Update in genetic susceptibility in melanoma. *Ann. Transl. Med.* **3**, 210 (2015).
21. Clark, W. H., Elder, D. E. & Van Horn, M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum. Pathol.* **17**, 443–450 (1986).
22. Garbe, C. *et al.* European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics: Update 2022. *Eur. J. Cancer* **170**, 236–255 (2022).
23. Ostrowski, S. M. & Fisher, D. E. Biology of Melanoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **35**, 29–56 (2021).
24. Shitara, D. *et al.* Nevus-Associated Melanomas. *Am. J. Clin. Pathol.* **142**, 485–491 (2014).
25. Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**, 3279–3290 (2007).
26. Roh, M. R., Eliades, P., Gupta, S. & Tsao, H. Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**, 661–672 (2015).
27. Zalaudek, I. *et al.* Frequency of Dermoscopic Nevus Subtypes by Age and Body Site: A Cross-sectional Study. *Arch. Dermatol.* **147**, 663 (2011).
28. Loras, A., Gil-Barrachina, M., Marqués-Torrejón, M. Á., Perez-Pastor, G. & Martínez-Cadenas, C. UV-Induced Somatic Mutations Driving Clonal Evolution in Healthy Skin, Nevus, and Cutaneous Melanoma. *Life* **12**, 1339 (2022).
29. Pollock, P. M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* **33**, 19–20 (2003).
30. Shain, A. H. *et al.* The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1926–1936 (2015).
31. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954 (2002).
32. Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720–724 (2005).
33. Shain, A. H. & Bastian, B. C. From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 345–358 (2016).
34. Chalmers, Z. R. *et al.* Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* **9**, 34 (2017).
35. Zaidi, M. R., Day, C.-P. & Merlino, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2381–2391 (2008).
36. Balch, C. M. *et al.* Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6199–6206 (2009).

37. Zeng, H. *et al.* Bi-allelic Loss of CDKN2A Initiates Melanoma Invasion via BRN2 Activation. *Cancer Cell* **34**, 56-68.e9 (2018).
38. Li, F. Z., Dhillon, A. S., Anderson, R. L., McArthur, G. & Ferrao, P. T. Phenotype Switching in Melanoma: Implications for Progression and Therapy. *Front. Oncol.* **5**, (2015).
39. Pearlman, R. L., Montes De Oca, M. K., Pal, H. C. & Afaq, F. Potential therapeutic targets of epithelial–mesenchymal transition in melanoma. *Cancer Lett.* **391**, 125–140 (2017).
40. Dutton-Regester, K. *et al.* Melanomas of unknown primary have a mutation profile consistent with cutaneous sun-exposed melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **26**, 852–860 (2013).
41. Gartner, J. J. *et al.* Comparative exome sequencing of metastatic lesions provides insights into the mutational progression of melanoma. *BMC Genomics* **13**, 505 (2012).
42. Sanborn, J. Z. *et al.* Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 10995–11000 (2015).
43. Garbe, C. *et al.* European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 2: Treatment - Update 2022. *Eur. J. Cancer* **170**, 256–284 (2022).
44. Jenkins, R. W. & Fisher, D. E. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. *J. Invest. Dermatol.* **141**, 23–31 (2021).
45. Crosby, T., Fish, R., Coles, B. & Mason, M. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2000) doi:10.1002/14651858.CD001215.
46. Middleton, M. R. *et al.* Randomized Phase III Study of Temozolomide Versus Dacarbazine in the Treatment of Patients With Advanced Metastatic Malignant Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **18**, 158–158 (2000).
47. Luke, J. J. & Schwartz, G. K. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin. Dermatol.* **31**, 290–297 (2013).
48. Avril, M. F. *et al.* Fotemustine Compared With Dacarbazine in Patients With Disseminated Malignant Melanoma: A Phase III Study. *J. Clin. Oncol.* **22**, 1118–1125 (2004).
49. Buchbinder, E. I. & Desai, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am. J. Clin. Oncol.* **39**, 98–106 (2016).
50. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
51. Topalian, S. L. *et al.* Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454 (2012).
52. Larkin, J. *et al.* Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **373**, 23–34 (2015).
53. Larkin, J. *et al.* Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **381**, 1535–1546 (2019).
54. Société française de dermatologie. Patients atteints de mélanome de stade III inopérable ou de stade IV. (2017).

55. HAS. ZELBORAF, Synthèse d'avis de la commission de la transparence : https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2013-09/synthese_zelboraf_pdf_130121.pdf. (2012).
56. HAS. TAFINLAR, Synthèse d'avis de la commission de la transparence : https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2015-03/tafinlar_22102014_synthese_ct13242.pdf. (2014).
57. Larkin, J. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* **371**, 1867–1876 (2014).
58. Su, F. *et al.* RAS Mutations in Cutaneous Squamous-Cell Carcinomas in Patients Treated with BRAF Inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **366**, 207–215 (2012).
59. Poulikakos, P. I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K. M. & Rosen, N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* **464**, 427–430 (2010).
60. Heidorn, S. J. *et al.* Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF. *Cell* **140**, 209–221 (2010).
61. Flaherty, K. T. *et al.* Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **367**, 107–114 (2012).
62. Long, G. V. *et al.* Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1877–1888 (2014).
63. Long, G. V. *et al.* Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet* **386**, 444–451 (2015).
64. Robert, C. *et al.* Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *N. Engl. J. Med.* **372**, 30–39 (2015).
65. Smalley, K. S. M. & Sondak, V. K. Inhibition of BRAF and MEK in BRAF-mutant melanoma. *The Lancet* **386**, 410–412 (2015).
66. HAS. TAFINLAR-MEKINIST, Synthèse d'avis de la commission de la transparence : https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2019-10/tafinlar_mekinist_synthese_ct17406.pdf. (2019).
67. HAS. COTELLIC + ZELBORAF, Synthèse d'avis de la commission de la transparence : https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2016-05/cotellic_synthese_ct14929.pdf. (2016).
68. Czarnecka, A. M., Bartnik, E., Fiedorowicz, M. & Rutkowski, P. Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4576 (2020).
69. Corrie, P. *et al.* Comparative efficacy and safety of targeted therapies for BRAF-mutant unresectable or metastatic melanoma: Results from a systematic literature review and a network meta-analysis. *Cancer Treat. Rev.* **110**, 102463 (2022).
70. McKenna, S. & García-Gutiérrez, L. Resistance to Targeted Therapy and RASSF1A Loss in Melanoma: What Are We Missing? *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5115 (2021).
71. Ascierto, P. A. *et al.* 5-Year Outcomes with Cobimetinib plus Vemurafenib in BRAF V600 Mutation-Positive Advanced Melanoma: Extended Follow-up of the coBRIM Study. *Clin. Cancer Res.* **27**, 5225–5235 (2021).

72. Robert, C. *et al.* Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **381**, 626–636 (2019).
73. Spagnolo, F. *et al.* BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *OncoTargets Ther.* **157** (2015) doi:10.2147/OTT.S39096.
74. Tangella, L. P., Clark, M. E. & Gray, E. S. Resistance mechanisms to targeted therapy in BRAF-mutant melanoma - A mini review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1865**, 129736 (2021).
75. Savoia, P., Zavattaro, E. & Cremona, O. Clinical Implications of Acquired BRAF Inhibitors Resistance in Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9730 (2020).
76. Nathanson, K. L. *et al.* Tumor Genetic Analyses of Patients with Metastatic Melanoma Treated with the BRAF Inhibitor Dabrafenib (GSK2118436). *Clin. Cancer Res.* **19**, 4868–4878 (2013).
77. Van Allen, E. M. *et al.* The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* **4**, 94–109 (2014).
78. Shi, H. *et al.* Acquired Resistance and Clonal Evolution in Melanoma during BRAF Inhibitor Therapy. *Cancer Discov.* **4**, 80–93 (2014).
79. Tian, Y. & Guo, W. A Review of the Molecular Pathways Involved in Resistance to BRAF Inhibitors in Patients with Advanced-Stage Melanoma. *Med. Sci. Monit.* **26**, (2020).
80. Johnson, D. B. *et al.* Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *Eur. J. Cancer* **51**, 2792–2799 (2015).
81. Hugo, W. *et al.* Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell* **162**, 1271–1285 (2015).
82. Rizos, H. *et al.* BRAF Inhibitor Resistance Mechanisms in Metastatic Melanoma: Spectrum and Clinical Impact. *Clin. Cancer Res.* **20**, 1965–1977 (2014).
83. Moriceau, G. *et al.* Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. *Cancer Cell* **27**, 240–256 (2015).
84. Long, G. V. *et al.* Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nat. Commun.* **5**, 1–9 (2014).
85. Corcoran, R. B. *et al.* BRAF Gene Amplification Can Promote Acquired Resistance to MEK Inhibitors in Cancer Cells Harboring the BRAF V600E Mutation. *Sci. Signal.* **3**, (2010).
86. Poulidakos, P. I. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* **480**, 387–390 (2011).
87. Hoogstraat, M. *et al.* Detailed imaging and genetic analysis reveal a secondary BRAFL505H resistance mutation and extensive inpatient heterogeneity in metastatic BRAF mutant melanoma patients treated with vemurafenib. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**, 318–323 (2014).
88. Mendoza, M. C., Er, E. E. & Blenis, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 320–328 (2011).
89. Haugh, A. M., Salama, A. K. S. & Johnson, D. B. Advanced Melanoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **35**, 111–128 (2021).

90. Rambow, F. *et al.* Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* **174**, 843–855.e19 (2018).
91. Lin, L. & Bivona, T. G. The Hippo effector YAP regulates the response of cancer cells to MAPK pathway inhibitors. *Mol. Cell. Oncol.* **3**, e1021441 (2016).
92. Kim, M. H. *et al.* Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP / TAZ activation. *EMBO J.* **35**, 462–478 (2016).
93. Misek, S. A. *et al.* Rho-mediated signaling promotes BRAF inhibitor resistance in de-differentiated melanoma cells. *Oncogene* **39**, 1466–1483 (2020).
94. Delmas, A. *et al.* The c-Jun/RHOB/AKT pathway confers resistance of BRAF -mutant melanoma cells to MAPK inhibitors. *Oncotarget* **6**, 15250–15264 (2015).
95. Orgaz, J. L. *et al.* Myosin II Reactivation and Cytoskeletal Remodeling as a Hallmark and a Vulnerability in Melanoma Therapy Resistance. *Cancer Cell* **37**, 85–103.e9 (2020).
96. Lu, H. *et al.* PAK signalling drives acquired drug resistance to MAPK inhibitors in BRAF-mutant melanomas. *Nature* **550**, 133–136 (2017).
97. Ascierto, P. A., Flaherty, K. & Goff, S. Emerging Strategies in Systemic Therapy for the Treatment of Melanoma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 751–758 (2018)
doi:10.1200/EDBK_199047.
98. Girotti, M. R. *et al.* Inhibiting EGF Receptor or SRC Family Kinase Signaling Overcomes BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Cancer Discov.* **3**, 158–167 (2013).
99. Abel, E. V. *et al.* Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J. Clin. Invest.* **123**, 2155–2168 (2013).
100. Villanueva, J. *et al.* Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by co-targeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* **18**, 683–695 (2010).
101. Paraiso, K. H. T. *et al.* Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *Br. J. Cancer* **102**, 1724–1730 (2010).
102. Nazarian, R. *et al.* Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* **468**, 973–977 (2010).
103. Müller, J. *et al.* Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat. Commun.* **5**, 5712 (2014).
104. Uebel, A. *et al.* Resistance to BRAF Inhibitors: EZH2 and Its Downstream Targets as Potential Therapeutic Options in Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 1963 (2023).
105. Strub, T. *et al.* SIRT6 haploinsufficiency induces BRAFV600E melanoma cell resistance to MAPK inhibitors via IGF signalling. *Nat. Commun.* **9**, 3440 (2018).
106. Hanly, A. *et al.* Drugging the Epigenome: Overcoming Resistance to Targeted and Immunotherapies in Melanoma. *JID Innov.* **2**, 100090 (2022).
107. Gambi, G. *et al.* The LncRNA LENOX Interacts with RAP2C to Regulate Metabolism and Promote Resistance to MAPK Inhibition in Melanoma. *Cancer Res.* **82**, 4555–4570 (2022).

108. Rubanov, A., Berico, P. & Hernando, E. Epigenetic Mechanisms Underlying Melanoma Resistance to Immune and Targeted Therapies. *Cancers* **14**, 5858 (2022).
109. Straussman, R. *et al.* Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* **487**, 500–504 (2012).
110. Grimm, J. *et al.* BRAF inhibition causes resilience of melanoma cell lines by inducing the secretion of FGF1. *Oncogenesis* **7**, 71 (2018).
111. Miskolczi, Z. *et al.* Collagen abundance controls melanoma phenotypes through lineage-specific microenvironment sensing. *Oncogene* **37**, 3166–3182 (2018).
112. Hirata, E. *et al.* Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin β 1/FAK Signaling. *Cancer Cell* **27**, 574–588 (2015).
113. Tsoi, J. *et al.* Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* **33**, 890-904.e5 (2018).
114. Bittner, M. *et al.* Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* **406**, 536–540 (2000).
115. Verfaillie, A. *et al.* Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat. Commun.* **6**, 6683 (2015).
116. Tirosh, I. *et al.* Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* **352**, 189–196 (2016).
117. Tang, Y., Durand, S., Dalle, S. & Caramel, J. EMT-Inducing Transcription Factors, Drivers of Melanoma Phenotype Switching, and Resistance to Treatment. *Cancers* **12**, 2154 (2020).
118. Arozarena, I. & Wellbrock, C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 377–391 (2019).
119. Hoek, K. S. *et al.* *In vivo* Switching of Human Melanoma Cells between Proliferative and Invasive States. *Cancer Res.* **68**, 650–656 (2008).
120. Steingrímsson, E., Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. Melanocytes and the Microphthalmia Transcription Factor Network. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 365–411 (2004).
121. Hartman, M. L. & Czyz, M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 1249–1260 (2015).
122. Goding, C. R. & Arnheiter, H. MITF—the first 25 years. *Genes Dev.* **33**, 983–1007 (2019).
123. Widmer, D. S. *et al.* Hypoxia Contributes to Melanoma Heterogeneity by Triggering HIF1 α -Dependent Phenotype Switching. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 2436–2443 (2013).
124. Huang, F., Santinon, F., Flores González, R. E. & Del Rincón, S. V. Melanoma Plasticity: Promoter of Metastasis and Resistance to Therapy. *Front. Oncol.* **11**, 756001 (2021).
125. Falletta, P. *et al.* Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes Dev.* **31**, 18–33 (2017).
126. Ferguson, J., Smith, M., Zudaire, I., Wellbrock, C. & Arozarena, I. Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. *Oncotarget* **8**, 32946–32959 (2017).

127. Goodall, J. *et al.* Brn-2 Represses Microphthalmia-Associated Transcription Factor Expression and Marks a Distinct Subpopulation of Microphthalmia-Associated Transcription Factor–Negative Melanoma Cells. *Cancer Res.* **68**, 7788–7794 (2008).
128. Rambow, F., Marine, J.-C. & Goding, C. R. Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev.* **33**, 1295–1318 (2019).
129. Girard, C. A. *et al.* A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma. *Cancer Res.* **80**, 1927–1941 (2020).
130. Smith, M. P. *et al.* Inhibiting Drivers of Non-mutational Drug Tolerance Is a Salvage Strategy for Targeted Melanoma Therapy. *Cancer Cell* **29**, 270–284 (2016).
131. Marin-Bejar, O. *et al.* Evolutionary predictability of genetic versus nongenetic resistance to anticancer drugs in melanoma. *Cancer Cell* **39**, 1135-1149.e8 (2021).
132. Corre, S. *et al.* Sustained activation of the Aryl hydrocarbon Receptor transcription factor promotes resistance to BRAF-inhibitors in melanoma. *Nat. Commun.* **9**, 4775 (2018).
133. Gautron, A. *et al.* CRISPR screens identify tumor-promoting genes conferring melanoma cell plasticity and resistance. *EMBO Mol. Med.* **13**, e13466 (2021).
134. Paris, A. *et al.* The AHR-SRC axis as a therapeutic vulnerability in BRAFⁱ-resistant melanoma. *EMBO Mol. Med.* **14**, e15677 (2022).
135. Jia, Y. *et al.* AHR signaling pathway reshapes the metabolism of AML/MDS cells and potentially leads to cytarabine resistance. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **53**, 492–500 (2021).
136. Zhou, B. *et al.* Mitochondrial activity and oxidative stress functions are influenced by the activation of AhR-induced CYP1A1 overexpression in cardiomyocytes. *Mol. Med. Rep.* **16**, 174–180 (2017).
137. Tappenden, D. M. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor interacts with ATP5 α 1, a subunit of the ATP synthase complex, and modulates mitochondrial function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **254**, 299–310 (2011).
138. Judge, A. & Dodd, M. S. Metabolism. *Essays Biochem.* **64**, 607–647 (2020).
139. DeBerardinis, R. J. & Chandel, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* **2**, e1600200 (2016).
140. Scott, D. A. *et al.* Comparative Metabolic Flux Profiling of Melanoma Cell Lines. *J. Biol. Chem.* **286**, 42626–42634 (2011).
141. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270 (1956).
142. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257 (2000).
143. Avagliano, A. *et al.* Metabolic Plasticity of Melanoma Cells and Their Crosstalk With Tumor Microenvironment. *Front. Oncol.* **10**, 722 (2020).
144. Webb, B. A., Chimenti, M., Jacobson, M. P. & Barber, D. L. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 671–677 (2011).

145. Su, J., Chen, X. & Kanekura, T. A CD147-targeting siRNA inhibits the proliferation, invasiveness, and VEGF production of human malignant melanoma cells by down-regulating glycolysis. *Cancer Lett.* **273**, 140–147 (2009).
146. Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Harris, A. L. & Sivridis, E. Comparison of Metabolic Pathways between Cancer Cells and Stromal Cells in Colorectal Carcinomas: a Metabolic Survival Role for Tumor-Associated Stroma. *Cancer Res.* **66**, 632–637 (2006).
147. Peppicelli, S., Bianchini, F., Torre, E. & Calorini, L. Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* **31**, 423–433 (2014).
148. Boussadia, Z. *et al.* Acidic microenvironment plays a key role in human melanoma progression through a sustained exosome mediated transfer of clinically relevant metastatic molecules. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 245 (2018).
149. Matsuo, T. & Sadzuka, Y. Extracellular acidification by lactic acid suppresses glucose deprivation-induced cell death and autophagy in B16 melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **496**, 1357–1361 (2018).
150. Ruocco, M. R. *et al.* Metabolic flexibility in melanoma: A potential therapeutic target. *Semin. Cancer Biol.* **59**, 187–207 (2019).
151. Falletta, P., Goding, C. R. & Vivas-García, Y. Connecting Metabolic Rewiring With Phenotype Switching in Melanoma. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 930250 (2022).
152. Israelsen, W. J. & Vander Heiden, M. G. Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **43**, 43–51 (2015).
153. Lunt, S. Y. & Vander Heiden, M. G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 441–464 (2011).
154. Hanover, J. A., Chen, W. & Bond, M. R. O-GlcNAc in cancer: An Oncometabolism-fueled vicious cycle. *J. Bioenerg. Biomembr.* **50**, 155–173 (2018).
155. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
156. Ratnikov, B. I., Scott, D. A., Osterman, A. L., Smith, J. W. & Ronai, Z. A. Metabolic rewiring in melanoma. *Oncogene* **36**, 147–157 (2017).
157. Ratnikov, B. *et al.* Glutamate and asparagine cataplerosis underlie glutamine addiction in melanoma. *Oncotarget* **6**, 7379–7389 (2015).
158. Fan, J. *et al.* Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Mol. Syst. Biol.* **9**, 712 (2013).
159. McGivan, J., D. The transport of glutamine into mammalian cells. *Front. Biosci.* **12**, 874 (2007).
160. Wang, Q. *et al.* Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth: Targeting Glutamine Transport to Suppress Melanoma Cell Growth. *Int. J. Cancer* **135**, 1060–1071 (2014).
161. Kuphal, S., Winklmeier, A., Warnecke, C. & Bosserhoff, A.-K. Constitutive HIF-1 activity in malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* **46**, 1159–1169 (2010).

162. Malekan, M., Ebrahimzadeh, M. A. & Sheida, F. The role of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and its signaling in melanoma. *Biomed. Pharmacother.* **141**, 111873 (2021).
163. Aprelikova, O. *et al.* Melanoma Antigen-11 Inhibits the Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase 2 and Activates Hypoxic Response. *Cancer Res.* **69**, 616–624 (2009).
164. Kumar, S. M. *et al.* Mutant V600E BRAF Increases Hypoxia Inducible Factor-1 α Expression in Melanoma. *Cancer Res.* **67**, 3177–3184 (2007).
165. Hudson, C. C. *et al.* Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Expression and Function by the Mammalian Target of Rapamycin. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7004–7014 (2002).
166. Land, S. C. & Tee, A. R. Hypoxia-inducible Factor 1 α Is Regulated by the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) via an mTOR Signaling Motif. *J. Biol. Chem.* **282**, 20534–20543 (2007).
167. Spinella, F. *et al.* Endothelin-1 Inhibits Prolyl Hydroxylase Domain 2 to Activate Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Melanoma Cells. *PLoS ONE* **5**, e11241 (2010).
168. Spinella, F. *et al.* Endothelin-1 and Endothelin-3 Promote Invasive Behavior via Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Human Melanoma Cells. *Cancer Res.* **67**, 1725–1734 (2007).
169. Buscà, R. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 α is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *J. Cell Biol.* **170**, 49–59 (2005).
170. Louphrasitthiphol, P. *et al.* MITF controls the TCA cycle to modulate the melanoma hypoxia response. *Pigment Cell Melanoma Res.* **32**, 792–808 (2019).
171. Haq, R. *et al.* Oncogenic BRAF Regulates Oxidative Metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* **23**, 302–315 (2013).
172. Li, X. *et al.* Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis. *Mol. Cell* **61**, 705–719 (2016).
173. Yang, W. *et al.* ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1295–1304 (2012).
174. Wiese, E. K. & Hitosugi, T. Tyrosine Kinase Signaling in Cancer Metabolism: PKM2 Paradox in the Warburg Effect. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, 79 (2018).
175. Dong, Y., Tu, R., Liu, H. & Qing, G. Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 124 (2020).
176. Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L. & Dang, C. V. MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov.* **5**, 1024–1039 (2015).
177. Huang, H., Weng, H., Zhou, H. & Qu, L. Attacking c-Myc: Targeted and Combined Therapies for Cancer. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 6543–6554 (2014).
178. Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* **23**, 27–47 (2016).
179. Ferguson, J., Smith, M., Zudaire, I., Wellbrock, C. & Arozarena, I. Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. *Oncotarget* **8**, 32946–32959 (2017).

180. Gonçalves, A. C. *et al.* Impact of cancer metabolism on therapy resistance – Clinical implications. *Drug Resist. Updat.* **59**, 100797 (2021).
181. Aloia, A. *et al.* A Fatty Acid Oxidation-dependent Metabolic Shift Regulates the Adaptation of BRAF-mutated Melanoma to MAPK Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **25**, 6852–6867 (2019).
182. Pascual, G. *et al.* Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* **541**, 41–45 (2017).
183. Zhang, M. *et al.* Adipocyte-Derived Lipids Mediate Melanoma Progression via FATP Proteins. *Cancer Discov.* **8**, 1006–1025 (2018).
184. Roesch, A. *et al.* Overcoming Intrinsic Multidrug Resistance in Melanoma by Blocking the Mitochondrial Respiratory Chain of Slow-Cycling JARID1Bhigh Cells. *Cancer Cell* **23**, 811–825 (2013).
185. Shen, S. *et al.* Melanoma Persister Cells Are Tolerant to BRAF/MEK Inhibitors via ACOX1-Mediated Fatty Acid Oxidation. *Cell Rep.* **33**, 108421 (2020).
186. Zhang, G. *et al.* Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *J. Clin. Invest.* **126**, 1834–1856 (2016).
187. Gopal, Y. N. V. *et al.* Inhibition of mTORC1/2 Overcomes Resistance to MAPK Pathway Inhibitors Mediated by PGC1 α and Oxidative Phosphorylation in Melanoma. *Cancer Res.* **74**, 7037–7047 (2014).
188. Shackelford, D. B. & Shaw, R. J. The LKB1–AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 563–575 (2009).
189. Cantó, C. & Auwerx, J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 98–105 (2009).
190. Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 12017–12022 (2007).
191. Ferraz, L. S. *et al.* Targeting mitochondria in melanoma: Interplay between MAPK signaling pathway and mitochondrial dynamics. *Biochem. Pharmacol.* **178**, 114104 (2020).
192. Gomes, L. C., Benedetto, G. D. & Scorrano, L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* **13**, 589–598 (2011).
193. Yoon, Y.-S. *et al.* Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: Involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. *J. Cell. Physiol.* **209**, 468–480 (2006).
194. Martinez, R. *et al.* Proteomic Changes in the Monolayer and Spheroid Melanoma Cell Models of Acquired Resistance to BRAF and MEK1/2 Inhibitors. *ACS Omega* **7**, 3293–3311 (2022).
195. Vashisht Gopal, Y. N. *et al.* A Novel Mitochondrial Inhibitor Blocks MAPK Pathway and Overcomes MAPK Inhibitor Resistance in Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **25**, 6429–6442 (2019).
196. Figarola, J. L., Singhal, J., Singhal, S., Kusari, J. & Riggs, A. Bioenergetic modulation with the mitochondria uncouplers SR4 and niclosamide prevents proliferation and growth of treatment-naïve and vemurafenib-resistant melanomas. *Oncotarget* **9**, 36945–36965 (2018).

197. Corazao-Rozas, P. *et al.* Mitochondrial oxidative stress is the achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* **4**, 1986–1998 (2013).
198. Khamari, R. *et al.* Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors. *Cell Death Dis.* **9**, 325 (2018).
199. Yuan, L. *et al.* BRAF Mutant Melanoma Adjusts to BRAF/MEK Inhibitors via Dependence on Increased Antioxidant SOD2 and Increased Reactive Oxygen Species Levels. *Cancers* **12**, 1661 (2020).
200. Xian, D., Lai, R., Song, J., Xiong, X. & Zhong, J. Emerging Perspective: Role of Increased ROS and Redox Imbalance in Skin Carcinogenesis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 1–11 (2019).
201. Porporato, P. E. *et al.* A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Rep.* **8**, 754–766 (2014).
202. Schaafhausen, M. K. *et al.* Tumor angiogenesis is caused by single melanoma cells in a reactive oxygen species and NF- κ B dependent manner. *J. Cell Sci.* jcs.125021 (2013) doi:10.1242/jcs.125021.
203. Dey, S. *et al.* ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *J. Clin. Invest.* **125**, 2592–2608 (2015).
204. Park, S. J., Kim, Y. T. & Jeon, Y. J. Antioxidant dieckol downregulates the Rac1/ROS signaling pathway and inhibits Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin-homologous protein 2 (WAVE2)-mediated invasive migration of B16 mouse melanoma cells. *Mol. Cells* **33**, 363–369 (2012).
205. Ueyama, T., Geiszt, M. & Leto, T. L. Involvement of Rac1 in Activation of Multicomponent Nox1- and Nox3-Based NADPH Oxidases. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2160–2174 (2006).
206. Weinberg, F., Ramnath, N. & Nagrath, D. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. *Cancers* **11**, 1191 (2019).
207. Dolma, S., Lessnick, S. L., Hahn, W. C. & Stockwell, B. R. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* **3**, 285–296 (2003).
208. Talty, R. & Bosenberg, M. The role of ferroptosis in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **35**, 18–25 (2022).
209. Yang, W. S. & Stockwell, B. R. Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death in Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells. *Chem. Biol.* **15**, 234–245 (2008).
210. Viswanathan, V. S. *et al.* Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* **547**, 453–457 (2017).
211. Hangauer, M. J. *et al.* Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* **551**, 247–250 (2017).
212. Robert, C. Mélanome métastatique, immunothérapie et survie à long terme : où en sommes-nous ? *Bull. Académie Natl. Médecine* **207**, 749–755 (2023).
213. Paris, A., Tardif, N., Galibert, M.-D. & Corre, S. AhR and Cancer: From Gene Profiling to Targeted Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 752 (2021).

214. Leclair, H. M., Tardif, N., Paris, A., Galibert, M.-D. & Corre, S. Role of Flavonoids in the Prevention of AhR-Dependent Resistance During Treatment with BRAF Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5025 (2020).
215. Lee, J., You, J. H., Kim, M.-S. & Roh, J.-L. Epigenetic reprogramming of epithelial-mesenchymal transition promotes ferroptosis of head and neck cancer. *Redox Biol.* **37**, 101697 (2020).
216. Dual Role of Mitophagy in Cancer Drug Resistance. *Anticancer Res.* **38**, (2018).
217. Senft, A. P. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen production is dependent on the aromatic hydrocarbon receptor. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1268–1278 (2002).
218. Shen, D., Dalton, T. P., Nebert, D. W. & Shertzer, H. G. Glutathione Redox State Regulates Mitochondrial Reactive Oxygen Production. *J. Biol. Chem.* **280**, 25305–25312 (2005).
219. Wang, H.-C. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor promotes lipid droplet biogenesis and metabolic shift in respiratory Club cells. *Hum. Cell* **34**, 785–799 (2021).
220. Opitz, C. A. *et al.* An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **478**, 197–203 (2011).
221. Labadie, B. W., Bao, R. & Luke, J. J. Reimagining IDO Pathway Inhibition in Cancer Immunotherapy via Downstream Focus on the Tryptophan–Kynurenine–Aryl Hydrocarbon Axis. *Clin. Cancer Res.* **25**, 1462–1471 (2019).
222. Nothdurft, S. *et al.* Functional screening identifies aryl hydrocarbon receptor as suppressor of lung cancer metastasis. *Oncogenesis* **9**, 102 (2020).
223. Miao, W., Hu, L., Scrivens, P. J. & Batist, G. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* **280**, 20340–20348 (2005).
224. Zgheib, E. *et al.* Investigation of Nrf2, AhR and ATF4 Activation in Toxicogenomic Databases. *Front. Genet.* **9**, 429 (2018).
225. Dong, L. *et al.* Harnessing the Potential of Non-Apoptotic Cell Death Processes in the Treatment of Drug-Resistant Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 10376 (2023).
226. Talebi, A. *et al.* Pharmacological induction of membrane lipid poly-unsaturation sensitizes melanoma to ROS inducers and overcomes acquired resistance to targeted therapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **42**, 92 (2023).
227. Vergani, E. *et al.* Targeting of the Lipid Metabolism Impairs Resistance to BRAF Kinase Inhibitor in Melanoma. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 927118 (2022).
228. Varghese, E. *et al.* Targeting Glucose Metabolism to Overcome Resistance to Anticancer Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancers* **12**, 2252 (2020).
229. Ashton, T. M., McKenna, W. G., Kunz-Schughart, L. A. & Higgins, G. S. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **24**, 2482–2490 (2018).

Annexe : travaux et communications Scientifiques

- Article (3^{ème} auteur) :
 - A Paris, N Tardif, F M Baietti, C Berra, H Leclair, E Leucci, MD Galibert, S Corre
 - **Titre** : The AhR-SRC axis as a therapeutic vulnerability in BRAFi-resistant melanoma, EMBO molecular medicine, 2022
- Flash-talks :
 - 25^{ème} conférence internationale des cellules pigmentées (IPCC 2023)
 - Ferroptosis as a therapeutic opportunity to counteract BRAFi-resistance in melanoma
 - Journée Signalisation & Cancer, organisée par la structure fédérative de recherche BIOSIT à Rennes
 - 2022 : Roles of energy metabolism and ferroptosis in resistance of melanomas to BRAF inhibitors
 - Récompense de la meilleure présentation
 - 2021 : Role of the transcription factor AhR in the resistance of cutaneous melanoma to BRAFi, a metabolic approach
- Poster :
 - Journée scientifique de l'école doctorale Bretagne (2020)
 - Role of energy metabolism in the resistance of metastatic melanoma to BRAF inhibitors
 - Récompense du meilleur poster

La ferroptose, une opportunité thérapeutique pour contrer la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome

Mots clés : cancer, mélanome, thérapies, résistance, ferroptose, métabolisme, AhR

Résumé : Près de la moitié des mélanomes cutanés diagnostiqués comportent une altération activatrice sur le codon V600 du gène codant pour la protéine kinase BRAF. Cela a permis l'avènement des inhibiteurs ciblant spécifiquement la forme mutée de la protéine, révolutionnant ainsi le traitement de cette maladie. L'efficacité de ces thérapies ciblées demeure néanmoins limitée par l'émergence rapide de mécanismes de résistance. Cette réalité clinique souligne le besoin urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour surmonter la résistance et améliorer la survie des patients. Dans cette étude, nous montrons que l'activité mitochondriale, l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'augmentation de la peroxydation des lipides

conduisent à une plus grande vulnérabilité vis-à-vis de la mort par ferroptose des cellules de mélanome résistantes aux inhibiteurs de BRAF. Ainsi, nous avons pu montrer que la ferroptose constituait une opportunité thérapeutique pour cibler les cellules résistantes, qui présentent une sensibilité accrue aux inducteurs chimiques de cette forme de mort cellulaire. En outre, nos résultats suggèrent fortement que le facteur de transcription *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AhR), dont nous avons déjà montré l'implication dans l'acquisition de la résistance aux thérapies ciblées, joue également un rôle dans l'émergence de cette vulnérabilité à la ferroptose.

Ferroptosis as a therapeutic opportunity to counteract BRAFi-resistance in melanoma

Keywords : cancer, melanoma, therapies, resistance, ferroptosis, metabolism, AhR

Abstract : Nearly half of all diagnosed cutaneous melanomas carry an activating alteration at codon V600 of the gene encoding the BRAF protein kinase. This has led to the era of inhibitors specifically targeting the mutated form of the protein, thereby revolutionizing the treatment of this disease. However, the efficacy of these targeted therapies remains limited by the rapid emergence of resistance mechanisms. This clinical reality underlines the urgent need to develop new therapeutic strategies to overcome resistance and improve patient survival. In this study, we show that

mitochondrial activity, accumulation of reactive oxygen species (ROS) and increased lipid peroxidation lead to greater vulnerability to the death by ferroptosis in BRAF inhibitor-resistant melanoma cells. Thus, we have shown that ferroptosis represents a therapeutic opportunity to target resistant cells, which show increased sensitivity to chemical inducers of this form of cell death. Furthermore, our results strongly suggest that the transcription factor Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR), which we have already shown to be involved in the acquisition of resistance to targeted therapies, also plays a role in the emergence of this vulnerability.

