



HAL
open science

Rôle de l'enzyme LOXL2 dans le comportement pro-invasif des cellules de mélanome et le remodelage matriciel du stroma tumoral

Alexandrine Carminati

► **To cite this version:**

Alexandrine Carminati. Rôle de l'enzyme LOXL2 dans le comportement pro-invasif des cellules de mélanome et le remodelage matriciel du stroma tumoral. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2023. Français. NNT : 2023COAZ6043 . tel-04838662

HAL Id: tel-04838662

<https://theses.hal.science/tel-04838662v1>

Submitted on 15 Dec 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.

THÈSE DE DOCTORAT

Rôle de l'enzyme LOXL2 dans le comportement pro-invasif des cellules de mélanome et le remodelage matriciel du stroma tumoral

Alexandrine CARMINATI

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), INSERM

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

d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Sophie TARTARE-DECKERT

Co-dirigée par : Marcel DECKERT

Soutenue le : 14 Décembre 2023

Devant le jury, composé de :

Dr Gilles Pagès, DR INSERM,
Université Côte d'Azur

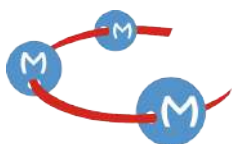
Dr Julie Caramel, CR INSERM,
Université Claude Bernard Lyon 1

Dr Samia Mourah, PU-PH INSERM,
Université Paris-Cité

Dr Emmanuel Donnadieu, DR CNRS,
Université de Paris

Dr Sophie Tartare-Deckert, DR INSERM,
Université Côte d'Azur

Dr Marcel Deckert, DR INSERM,
Université Côte d'Azur



Rôle de l'enzyme LOXL2 dans le comportement pro-invasif des cellules de mélanome et le remodelage matriciel du stroma tumoral

Composition du jury :

Président du jury :

Dr Gilles PAGÈS, Directeur de Recherche INSERM, Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillessement (IRCAN), Université Côte d'Azur, Nice, France.

Rapportrices :

Pr Samia MOURAH, Directrice de Recherche INSERM, Hôpital Saint Louis, Université Paris Cité, Paris, France.

Dr Julie CARMEL, Chargée de Recherche INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

Examineur :

Dr Emmanuel DONNADIEU, Directeur de Recherche CNRS, Institut Cochin, Université de Paris, Paris, France.

Directeurs de thèse :

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

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

RÉSUMÉ

Le mélanome cutané est un cancer de la peau agressif, hétérogène et hautement métastatique. Malgré le succès des nouveaux traitements comme les thérapies ciblant la voie oncogénique BRAFV600, et les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire, de nombreux patients restent en échec thérapeutique en raison de résistances innées ou acquises dues à des mutations génétiques ou des phénomènes non-génétiques de reprogrammation et plasticité phénotypique. Des études récentes ont identifié des sous-populations cellulaires tumorales qui se distinguent selon leur état de différenciation et leur signature transcriptionnelle. En réponse aux signaux du microenvironnement et aux pressions thérapeutiques, les cellules de mélanome peuvent passer d'un état mélanocytaire à des états dédifférenciés associés à une expression accrue de récepteurs tyrosine kinase (RTK), de marqueurs mésenchymateux ou de cellules souches de la crête neurale. Cette transition a été décrite comme un facteur d'adaptation et de résistance aux thérapies ciblées. La progression tumorale est influencée par les propriétés biochimiques et biophysiques du stroma matriciel environnant. Ainsi, une augmentation des dépôts de collagène et de la réticulation des fibres rigidifie la tumeur, promeut la progression maligne et protège des thérapies. Mon travail s'appuie sur des observations originales de l'équipe selon lesquelles les cellules dédifférenciées produisent une matrice extracellulaire (MEC) abondante riche en lysyl oxidase-like 2, LOXL2, une enzyme de réticulation du collagène également connue pour son implication dans la transition épithélio-mésenchymateuse du cancer du sein. Son rôle dans la biologie des mélanomes n'est pas connu. Nous avons émis l'hypothèse que la production de LOXL2 par les cellules de mélanome pourrait influencer leurs propriétés mésenchymateuses ainsi que le remodelage matriciel et la rigidité tumorale observés *in vivo* au cours de la réponse adaptative au traitement.

Nous montrons dans un premier temps que LOXL2 est préférentiellement exprimé par les cellules de mélanome dédifférenciées et que son expression est associée à un mauvais pronostic. LOXL2 est induit par la thérapie ciblée ou l'hypoxie, des facteurs connus pour favoriser la transition vers un état dédifférencié, et est régulé par des facteurs de transcription de la plasticité tumorale comme ZEB1. De façon intéressante, l'induction de LOXL2 par la thérapie ciblée est inversée par les inhibiteurs des voies RTK et AKT. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la contribution spécifique de LOXL2 dans le phénotype tumoral dédifférencié par des approches perte de fonction. Nous révélons que LOXL2 joue un rôle important dans la formation d'adhésions focales et la morphologie des cellules mésenchymateuses et favorise leur migration, invasion et formation de métastases. Sur le plan mécanistique, une analyse protéomique comparative a permis d'identifier l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 2, PAI-2, un membre de la famille des serpinines comme un effecteur potentiel de la migration dépendante de LOXL2. Enfin, mes données indiquent que le ciblage de LOXL2 dans les cellules dédifférenciées et les fibroblastes associés au mélanome réduit leur capacité à contracter une matrice de collagène et à assembler une MEC organisée, ce qui suggère l'implication de LOXL2 dans le dialogue entre cellules de mélanome et matrice tumorale.

L'ensemble de mes résultats établit un lien original entre LOXL2, l'hétérogénéité phénotypique des cellules de mélanome et le remodelage matriciel stromal. Notre étude révèle qu'en plus de son rôle dans le remodelage du collagène, LOXL2 joue un rôle pro-invasif « cell autonomous » intrinsèque à la cellule de mélanome. De plus, mon travail améliore notre compréhension des signaux biomécaniques de la MEC qui affectent la plasticité tumorale et l'adaptation aux thérapies et souligne l'intérêt du ciblage de LOXL2 dans le traitement de la maladie métastatique et résistante.

Mots clef : Mélanome, transition phénotypique, LOXL2, remodelage de la MEC, migration

ABSTRACT

Cutaneous melanoma is an aggressive, heterogeneous and highly metastatic skin cancer. Despite successful therapies targeting the BRAFV600E oncogenic pathway or immune checkpoints, many patients relapse and remain in therapeutic failure. Innate or acquired resistances are due to genetic mutations or non-genetic phenotypic reprogramming and plasticity. Recent studies based on single cell RNA-seq analysis of cutaneous melanoma have identified tumor cell subpopulations that are classified according to their differentiation state and transcriptional signature. Upon microenvironment and therapeutic pressures, melanoma cells can switch from a melanocytic state to dedifferentiated states associated with increased expression of tyrosine kinase receptors (RTK) and mesenchymal or neural crest stem cell-like markers. Such adaptive plasticity was described as a driver of resistance to targeted therapies. Tumor progression is influenced by alterations in the biochemical and biophysical properties of the tumor microenvironment. Increased collagen fiber deposition and crosslinking are indeed known to stiffen tumors, promote malignant progression and confer resistance to treatments. Our study relies on original observations from the team that dedifferentiated cells produce an abundant extracellular matrix (ECM) enriched in the lysyl oxidase-like 2 LOXL2, a collagen crosslinking enzyme also known to drive the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. Its role in melanoma biology remains poorly explored. We hypothesized that LOXL2 production by melanoma cells could influence their mesenchymal properties as well as ECM remodeling and tumor stiffness observed *in vivo* during adaptive response and therapeutic resistance.

We first showed that LOXL2 is preferentially expressed by dedifferentiated melanoma cells and that its expression is associated with poor prognosis in melanoma. LOXL2 is induced by the combination of BRAF and MEK inhibitors or hypoxia, cues known to promote the transition towards a dedifferentiated phenotype, and regulated by the cell plasticity transcription factor ZEB1. Interestingly, LOXL2 induction by the targeted therapy is reversed by inhibition of the RTK and AKT pathways. We then investigated the specific contribution of LOXL2 to the dedifferentiated mesenchymal phenotype using loss-of-function approaches. We revealed that LOXL2 plays a role in focal adhesion formation and mesenchymal cell morphology, and promotes melanoma cell migration, invasion and metastasis. Mechanistically, comparative proteomic analysis identified the plasminogen activator inhibitor 2, PAI-2, a member of the serpin family, as a potential effector of LOXL2-mediated migration. Finally, we showed that targeting LOXL2 in dedifferentiated cells and melanoma-associated fibroblasts impairs their ability to contract a collagen matrix and assemble an organized ECM, suggesting the implication of LOXL2 in the dialogue between melanoma cells and the tumoral matrix.

Taken together, these results establish an original link between LOXL2, melanoma cell phenotypic diversity and stromal matrix remodeling. Our study reveals that, in addition to its conventional role in collagen remodeling, LOXL2 exerts a tumor cell-autonomous pro-invasive action in melanoma. In addition, my work provides a better understanding of the ECM biomechanical signals that affect tumor cell plasticity and adaptation to anti-melanoma therapies, and highlights the value of targeting LOXL2 in the treatment of metastatic and resistant disease.

Keywords : Melanoma, phenotypic transition, LOXL2, ECM remodeling, migration

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : **Pr Samia Mourah** et **Dr Julie Caramel** en tant que rapportrices, **Dr Emmanuel Donnadieu** en tant qu'examinateur, **Dr Gilles Pagès** en tant que président, **Dr Sophie Tartare-Deckert** en tant que directrice de thèse et **Dr Marcel Deckert** en tant que co-directeur de thèse. Dans notre corps de métier, il est pour moi indispensable de discuter afin qu'un foisonnement d'idées apparaisse et nous permette de faire une différence. Je vous remercie de me donner l'opportunité d'échanger avec vous, et de l'aide et l'expertise précieuse que vous me transmettez.

En suivant cette idée d'échange et de discussion scientifique, je tiens à remercier le **Dr Medhi Khaled** et le **Dr Bernard Mari** d'avoir participé à mon comité de suivi individuel. L'aide, les conseils, les discussions et suggestions enrichissantes autour du projet, et les outils que vous m'avez permis de développer ont réellement eu un impact important sur l'avancement du projet.

À l'équipe 11,

Sophie et **Marcel**, je n'étais censée être que de passage dans l'équipe, et me voici 4 ans plus tard, prête et motivée à rester encore quelques mois de plus. Je vous remercie de m'avoir accueillie et surtout de m'avoir permis de rester en thèse avec vous. Cela a été une grande opportunité pour moi, grâce à laquelle j'ai pu acquérir de nombreuses compétences, et grandement évoluer. Pour moi, ces pages de remerciements sont importantes puisqu'elles nous permettent de nous rendre compte de ce pourquoi nous sommes sincèrement reconnaissants, et d'exprimer cette gratitude. Merci de m'avoir permis de prendre en main un projet, et de m'avoir laissé la liberté de lire et tester toutes les hypothèses que j'avais dans la tête. Merci de m'avoir laissé la possibilité d'aller à de nombreux congrès, j'ai pu prendre confiance petit à petit à l'oral, et apprendre à communiquer. Merci de m'avoir mis dans les pattes des petits étudiants casse-pieds (Oui Miratoun on parle de toi), c'était une aventure très enrichissante. Grâce à vous, j'ai réellement appris beaucoup plus que ce que j'aurais appris n'importe où ailleurs.

Christophe, merci infiniment pour toute l'aide que tu m'as apportée tant sur le plan professionnel que personnel. Tu as toujours été d'un soutien sans faille, toujours à fond dans l'action. Je garderai toujours les valeurs et leçons que tu m'as apprises et transmises que ce soit au niveau de l'organisation, de la motivation, de la détermination et de l'investissement. J'ai rarement vu une personne donner autant pour les autres et être aussi humaine, j'aspire sincèrement à suivre tes pas. Merci de m'avoir montré tout le chemin que j'ai parcouru, et tout ce que je pourrais et aimerais être. Et si un jour, je suis celle qui trouve le soleil le plus brillant, ce sera grâce à toi.

Virginie, la première chose qui me vient à l'esprit en écrivant mes remerciements, ce sont les deux journées que nous avons passées au Signalife. J'ai été insupportable, inventé un demi-million d'excuses et blagues pour évacuer mon stress de ma présentation orale. Et j'ai précieusement gardé le souvenir du soutien dont tu as fait preuve à ce moment-là, tu as été ma bouée de calme et je t'en remercie.

Mon cher **Mickaël**, je tiens à te remercier pour nos 4 ans de délires que personne ne peut comprendre à part nous. Je pense que tu es responsable d'une grande majorité des fous-rires que j'ai eu dans ce laboratoire, et ça, c'est formi...DABLE. Je ne pourrai pas tous les citer, mais je vais quand même en mettre quelques-uns, parce qu'ils méritent d'être écrits quelque part ! J'espère que malgré mon départ, des fous avec un DOSSIER ILLUSTRATOR n'en profiteront pas pour t'embêter. Parce que t'imagines ? Il avait un dossier illustrator...un dossier ILLUSTRATOR quoi. l'm bluuuuue daboudidaboudaaa. Et la dernière collection onkch onkch onkch onkch tsss. Je continuerai toujours de prier le Créateur de l'Univers, le grand PSMD14.

Je remercie aussi **Fred**, alias Frederikov d'avoir toujours été à mes côtés dans les moments de doutes pour me rappeler à quel point LOXL2 ne sert à rien. Dès que j'avais un peu d'espoir, tu étais toujours là pour les

détruire en mille morceaux. Monsieur Milteni, j'ai été ravie de partager votre bureau ces dernières années, mais JAMAIS ma hotte. Et je finirai par un petit... alooors ça LOX ?

J'entraîne les autres, grâce à toi la grande majorité de nos délirés sont immortalisés ! Merci d'avoir été le calme dans la tornade que je suis et dans laquelle que je suis un sujet déterminé ! Mais c'est ça qui fait mon charme on va dire, et tu pourras ajouter sur la fiche psychologique jusqu'au bout. Mais j'étais obligée de pousser le délire du « c'est à l'envers » Estelle, tu ne m'en voudras pas j'espère mais j'étais obligée de pousser le délire du « c'est à l'envers »

Walaa... qui ? Ah oui **Walusp, Luspe, Luluspe**, ou je dirais même **MON Luspe**. Tu n'imagines pas à quel point j'aime ce surnom. Il est parti de vraiment pas grand-chose, et pourtant, il est entré dans la tête et le cœur de tout le monde, et il est réellement beau ! Tu as été mon premier bébé du labo, et maintenant, tu es devenue (comme dirait Chris) une machine de guerre. Plus sérieusement, sur le plan professionnel, heureusement que tu es revenue dans l'équipe parce que tu es d'une aide incroyable, toi la petite main qui gère tout et nous soulage tellement, je ne sais pas ce qu'on ferait sans toi. Merci infiniment de venir avec moi à l'animalerie. En plus d'être une expérimentatrice du tonnerre, tu fais des miracles. Et oui **Madame Magie**, tu as retrouvé tes mains magiques, et notre souris 307 en est la preuve, tu l'as sauvée !! Au-delà du laboratoire, je vois notre relation se construire de jour en jour, et devenir de plus en plus forte, et crois-moi j'en suis la plus heureuse. Merci d'être à mes côtés et de toutes tes petites attentions que tu as envers moi depuis 2 ans, et pour toutes les prochaines années qui arrivent. Parce que oui, il faut que je vienne te voir au Canada, à Dubaï et surtout en tant que Tata Numéro 1, ne t'inquiète pas, je ne vais pas t'oublier, j'ai déjà choisi ma robe pour le mariage avec **Nico** (j'attends une invitation encore mieux que celle que je t'ai faite).

La **Nouiiiiiiiille**, ou ma très chère **bouVEET**, je te remercie d'avoir été une bouffée d'air frais au moment où j'en avais le plus besoin. Tu as été décrite comme ma sangsue, mais j'ai surtout l'impression qu'on s'est portée l'une l'autre, et qu'on se pousse toujours vers le haut. **Madame Bonheur**, j'aimerais surtout te remercier pour ta bienveillance, ta fierté, ton amour, ton soutien, et ton investissement que tu portes à tes amis, j'ai rarement vu ça dans ma vie. Bye bye, bye bye, bye, elle me dit qu'elle a mal, elle veut que je sois son médicament... Tu vois l'impact que tu as sur nous est tel que même dans mes remerciements de thèse, je finis par chanter ce genre de chanson... J'ai pris tellement de tes tics et de tes expressions : TOUCHE TON NEZ (Je ris, le fait pas si tu ne lis pas ces remerciements à la bonne heure hein !). Je t'aime fort mon chat, merci d'avoir fait en sorte que ta maison soit ma deuxième maison, de m'accueillir comme tu l'as fait chez toi à Nice, chez toi à Lyon, et chez toi dans ton cœur, parce que ce dernier endroit est vraiment l'un des meilleurs où j'ai été de toute ma vie.

Heureux qui comme **Mira** a fait un beau voyage... (J'espère que tu as déjà la chanson en tête). Un magnifique voyage Miratoun qui t'a conduit jusqu'à nous pour notre plus grand bonheur. Tu es officiellement (ou presque) ma première étudiante, la première à qui j'ai appris à manipuler, à réfléchir sur son projet, à prendre son envol, tu es mon premier rapport de stage à corriger, et oral à préparer. Dans 50 ans, après avoir eu X étudiants, je pourrai toujours dire : Mira a été la première. Plus sérieusement, nous passons notre temps à t'embêter parce que tu es **Madame Casse-Pieds** ou **Madame Catastrophe**, et oui tu colles bien à tes titres, mais la vérité, c'est que si tu n'étais pas là, et bien, il faudrait t'inventer. Ma troisième année de thèse aurait été bien vide sans mon « Alex, Alex, Alex, Alex, Alex ». Et sans tes catastrophes, la vie au labo serait beaucoup moins drôle ! Je voulais te remercier de toujours rentrer dans mes délires, et me suivre dans toutes les bêtises que je fais. Tu es celle avec qui je vais courir sous la pluie battante, celle avec qui je danse au milieu du labo. Merci de toujours te préoccuper de moi. Allez... ouhred, zoudge, tlata... Mais quand reverrai-je mon petit village ?

La petite dernière **Melissa**, toi qui m'as détrônée pour le titre de plus jeune thésarde de ce laboratoire... Je suis très heureuse que tu reviennes dans notre équipe, hâte de passer à nouveau des moments avec toi sur ces derniers mois, et surtout de toutes les nano/pico secondes de câlins qu'on fera, ma thésarde préférée. Comme de nombreuses personnes l'ont fait avant moi dans leurs remerciements, tu vas être chargée de prendre soin d'une petite thésarde quand je serai partie. Alors petite Melissouille, c'est à ton tour, prend soin de Bouvet quand je serai partie, elle sera sur sa fin de thèse, donc ton rôle sera de bien la soutenir !

Ana, we are starting to get closer and have more and more conversations the two of us. Thank you for listening to me and caring for me. It's always reassuring to have someone to talk to, don't hesitate to come, my door is always open.

Passons maintenant aux **anciens de l'équipe 11** qui, pour la plupart, ont parcouru des kilomètres pour être avec moi pour ma soutenance, merci infiniment. Tout d'abord **Ilona**, j'ai du mal à croire qu'il s'est passé quasiment 4 ans de thèse pour moi depuis que tu es partie, le temps passe si vite. Tu m'as montré comment suivre tes pas afin d'être aussi précise et rigoureuse que toi. Je te remercie de la confiance que tu portais en moi, ce qui m'a beaucoup rassurée, et du temps que tu as passé avec moi. Tu seras toujours la « maman » des thésardes envers qui j'ai toujours « look up to ». Merci infiniment d'être venue, je suis la plus heureuse que l'on se retrouve tous ensemble. Et crois-moi, je n'attends que de faire un saut à San Francisco pour venir te voir !

Petit **Christopher**, je crois qu'on te le dit souvent, mais ton départ du labo a fait un vide immense. Même si cette phrase a valu un de mes plus beaux rires de ma vie, Marcel avait tort en disant : « Soit-on se débarrasse du -80°, soit on se débarrasse de Christopher », parce qu'on aurait dû te séquestrer dans cette équipe. Ta passion, ta joie, ta bonne humeur, et ton côté enfantin apportaient beaucoup de légèreté à l'équipe. Merci d'être toujours dans les parages, de venir nous voir à la moindre occasion, ça nous réchauffe toujours le cœur. Quand on se retrouvera dans quelques années sur l'île de YAP tous ensemble, on pourra se dire : « La bande de l'équipe 11, after all this time ? ALWAYS ».

Serena, my Love, you have been an incredible soul by my side, and I can't thank you enough for that. I feel so grateful and lucky to be part of your life. Our strong connection and bond are so precious. Thank you for all the love, laugh, hugs, and moments we shared and are still sharing. Whether it was in the lab, or at your place in Nice, in Italy and even in Lyon, we always have the time of our lives and I will always cherish all of our memories. I can't wait to be back in Lyon next April and hang out with you. I would like to write a special thanks to my nephews and nieces **Mir, Teo, Penelope** and **Lulina** that I miss sooooo much. I miss hearing your: "Lulina". One thing my heart and brain agree on is how much I love you.

Ana, thank you for all the discussions we had and all the advice you gave me. I absolutely loved being you "Little One", this nickname is one of the cutest. I really appreciate the support and confidence you gave me.

Margaux, Margalette, Dr Marg-en-ciel, merci infiniment d'avoir été ma première fan lors de mes concerts déjantés en salle de culture. Si un jour, je fais carrière dans la chanson humoristique de culture, crois-moi, je dirais au monde entier que tu as été aux premières loges. Merci d'avoir apporté tant de couleurs au labo (non ce n'est absolument pas une allusion à tes tenues colorées voyons), et de toutes les discussions que nous avons eues **Madame Bavarde**. Merci d'avoir été là pour moi au labo, de m'avoir montré de nombreuses techniques, et surtout de m'avoir toujours posé un demi-million de questions avant tous mes oraux. Je n'ai pas pris le temps de venir te voir en Italie, mais ne t'inquiète pas, l'Allemagne me voilà ! Mais je serais encore plus heureuse de venir te voir si tu me dis que c'est pour venir élever des chèvres avec toi. Madame la bergère, mais t'es où ? Pas là... mais t'es où ? En réalité, ici, tu es toujours là par message, et ici pour ma soutenance, alors merci beaucoup.

Lauren, ta force de caractère m'a toujours impressionnée et m'a beaucoup appris. Merci pour tous les midis que nous avons passés à refaire le monde avec Marie, ils ont beaucoup compté pour moi. Et surtout, je voulais te remercier infiniment d'avoir pris ma défense lorsque c'était nécessaire, le monde a besoin de personnes comme toi.

Pierric, merci infiniment pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble au labo et en dehors. Je garderai toujours en mémoire tous les délires que nous avons eus, tous nos karaokés et remix en culture, toutes nos bombes d'azote liquide, tous nos avions en papier, tout notre vocabulaire Gortex, tous nos jeux comme le jeu de la fenêtre ou le lancer de pots pipi, toutes nos constructions et tout notre bricolage de roulette à WB ou de pots à pipette. Merci de m'avoir soutenue et de m'avoir accompagnée pendant 4 ans, à

passer autant de temps au labo avec moi, et ainsi à partager chacun des aspects de ma vie pendant toute cette période. Et merci de m'avoir fait vivre des moments grandioses à observer la voie lactée, à randonner en montagne, à découvrir de nouveaux endroits réels, et imaginaires dans les livres, et jeux vidéo. Je n'oublierai jamais cette multitude de souvenirs que nous avons créés ensemble.

À l'équipe sans module fixe, **l'équipe 14** et en particulier à **Thomas** qui fait un peu (beaucoup) partie de notre équipe, merci d'être toujours présent pour nous. Merci à toi **Amy** de toutes tes expressions plus géniales les unes que les autres, j'ai passé des moments incroyables à en rire avec toi et essayer de les refaire. Je vais remercier dans ce paragraphe **Alexandra** même si ce n'est pas forcément le meilleur spot, mais je tiens à ce que vous sachiez **Toto**, **Nalexandra** et **Océane**, que nos soirées à 4 au tout début ont sincèrement été une bouffée d'air frais pour moi, et m'ont fait beaucoup de bien. Je suis la plus heureuse d'avoir trouvé l'Alexandra de mon Alexandrine. On se concerte pour le post-doc parce que j'ai hâte de notre future colloq, ou de tous les voyages qu'on fera pour débarquer chez l'une chez l'autre.

Au module 2,

Céline, ma chère petite Master 1 envers qui je dois le respect pour nos quelques jours d'écart... merci pour tous les moments que nous avons passés ensemble. Nos 5 mois de stage ensemble ont beaucoup compté, on s'est beaucoup soutenu à ce moment-là, toujours à être là l'une pour l'autre et on a continué de le faire pendant notre thèse (et le confinement !!). Mes petites pauses à débarquer dans votre labo ou dans votre salle de culture ont toujours été des petits moments rafraichissants dans nos journées. Je retiendrai toujours la voix d'ange que tu as, et garderai en mémoire tous les moments musicaux que nous avons eus et en particulier ta composition au piano. Merci pour tous ces précieux souvenirs. Et avec **Fred**, je suis toujours aussi ravie d'avoir suivie l'avancement en direct voyons ! Mon petit anorak, je te remercie de tous les délires qu'on a eu avec le cultivateur de soja, c'était grandiose. **Imène** le jour où nous avons appris l'une pour l'autre restera sans doute l'un des plus grands rebondissements de ma vie, et la charge émotionnelle qui s'est créée était folle. Merci infiniment pour le demi-milliard de discussions que nous avons eues, tu sais à quel point c'est important d'avoir quelqu'un qui nous comprend. Je repense aux chansons, aux livres, aux séries qu'on s'est envoyés, aux cadeaux, à nos carnets de « faits positifs de la journée », et me dis qu'entre nous tout a toujours eu énormément de sens et de signification alors merci pour tout ça.

Plus généralement, j'aimerais remercier toute **l'équipe 1** de m'avoir accueillie de nombreuses fois quand je venais voir les filles (et l'Evos), il est vrai que j'ai passé pas mal de temps chez vous, même à prendre le petit dej' parfois. Et je rajouterai quand même une dédicace spéciale au **Monstre** ou Yann pour qu'il y ait une trace écrite de ce qu'on subit !

Passons à nos voisins de **l'équipe 12**, je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de l'équipe 12 avec qui nous avons partagé de nombreuses heures en culture, vous avez toujours amené une bonne humeur incroyable, et avez toujours fait de la culture un moment agréable. Enfin, sauf **Thomas**, bien évidemment que je ne remercie absolument pas tant c'était dur de le croiser tous les jours. Allez, soyons sérieux pour une fois, je te remercie sincèrement pour tous les délires et toutes les discussions scientifiques ou sur des sujets un peu plus personnels. C'est toujours important de trouver des personnes qui sont passées par les mêmes épreuves que nous, et qui peuvent nous comprendre à ce point. Cher compagnon d'arme, n'oublie pas de faire du sport, à ce qu'il paraît ça aide à retrouver une vie normale. **Émilie**, la jolie découverte de ces derniers mois, je suis très heureuse de rester quelques mois de plus dans le centre pour que l'on puisse passer un peu plus de temps ensemble sinon ça aurait été triste de faire une si belle rencontre pour si peu de temps. Merci infiniment de ton authenticité, tu es une personne incroyable. Et surtout merci pour les gâteaux à la noix de coco bien coulant.

Je tiens à remercier de nombreuses autres personnes du centre, je pense que chaque personne qu'on croise tous les jours pendant des années finit par nous marquer d'une façon ou d'une autre, j'aimerais alors citer quelques personnes à qui je pense en écrivant ces quelques lignes (enfin plutôt un roman visiblement). Tout d'abord dans le **module 1**, je te remercie **Patrick** de m'avoir accueillie dans son équipe pour mon stage de M1, c'est un stage qui a énormément compté pour moi. **Polo**, on t'a bien embêté avec la développeuse, mais

tu as toujours été d'une patience incroyable et a toujours été prêt à nous apporter ton aide dès qu'on en avait besoin. **Coco**, je crois que tout le monde dans mon équipe m'a déjà entendue dire, « c'est coco mon encadrante » dès que je te croise dans les couloirs. **Sandrine**, je tiens à te remercier de toute la bienveillance qui émane de toi. **Els**, merci de toujours me garder une petite place dans le bus et de toutes les discussions qu'on a eues ensemble, et n'oublie pas de faire attention aux méduses ! Merci **Véro** de ton aide à l'animalerie, et de toujours nous donner des souris adorables pour les validations de compétences pour les gens stressés comme moi ! **Adrien**, mon cher président, je te remercie de la gentillesse, l'attention, la bienveillance dont tu fais preuve. Je suis la plus heureuse d'avoir mon laissez-passer Adrien : « ça va, c'est Alex ». Merci de nous avoir apporté des gâteaux, de toujours proposer de nous ramener, de partager avec moi le stress de la soutenance, et tout simplement des moments qu'on a pu passer chez Océane, au resto ou à la plage. Et surtout merci de prendre soin d'Océane comme tu le fais, ça compte énormément pour moi.

Au module 3, merci à toi **Nath** de ton aide à l'hypoxie premièrement, mais aussi de ces petites discussions qu'on peut avoir quand j'accompagne Marie prendre son café, j'entends toujours ton : « Saluuut les filles » dès que tu nous croises ensemble. J'aimerais beaucoup revenir dans plusieurs années et voir si ta plante a envahi tout le C3M ! Merci à **Fred** de ta bienveillance et bien sûr de ta machine à M&M's. **Ying Bo** thank you for all the help you gave me in the hypoxic chambers, it's always a real pleasure to bump into you in the corridors and have a chat. **Amine** et **Michel**, nos compagnons de fête de la Science, ce fut deux journées réellement mémorables alors merci beaucoup. En parlant de ça, **Juan**, j'espère que tu prendras bien soin de Tonio le petit vers, merci pour tous les délires qu'on a eus ensemble. **Greg**, merci beaucoup pour ton aide pour les manips de métastases au poumon, le roi de l'IV ça restera toujours toi.

Au module 4, merci à **Raph**, **Ines** et **Brice** pour tous les moments passés ensemble. Merci à toi **Marion** pour cette relation qui s'est créée petit à petit, ça m'a fait très plaisir d'avoir partagé le Cancéropôle avec toi, d'avoir pu être là pour ta soutenance et la fêter ensuite comme il se devait. Tu as fait beaucoup de chemin pour arriver là où tu en es à présent, je te remercie de m'avoir laissé t'accompagner tout du long. **Marina**, merci pour toutes nos discussions philosophiques et psychologiques, on a réellement refait le monde un milliard de fois ensemble, on a vécu de nombreux moments incroyables à courir sous la pluie jusqu'au premier café. Notre séjour à Paris avait vraiment été une bouffée d'air frais pour moi, merci beaucoup **mon Baboune**.

Pour finir concernant le centre, je tiens à remercier chaleureusement **Émilie** et **Nadia**, vous avez toujours été incroyablement attentionnées avec notamment le thé et les gâteaux merveilleusement bons. Vous êtes d'une aide plus que précieuse sur le plan professionnel, et d'une gentillesse incroyable sur le plan humain. Merci aussi à **Jean** dont le départ a laissé un grand vide, tant ta bonne humeur était communicative, et merci à **Julien**. Je remercie aussi **Domdom** de ton aide et surtout de tes blagues permanentes, **Philippe** pour tout ce que tu fais pour le centre, et nous avoir organisé une super fête de la Science chaque année. Toute la team **Animalerie** pour leur aide précieuse. Et enfin merci **Marie**, moi qui aie la malédiction des commandes, je te remercie de la patience dont tu as fait preuve, et de toute l'aide que tu m'as toujours apportée.

À l'équipe du CAL, merci de m'avoir accueillie de nombreuses fois chez vous. **Manon**, merci pour l'année que nous avons passée durant nos stages, j'aurais aimé être dans le même centre que toi plus longtemps, je suis toujours la plus heureuse de te croiser aux Cancéropôle, JEDN, SignalLife et autres. **Maëva**, tu es un véritable soleil. Je te remercie de tous les kilos en plus que j'ai pris à cause de toi et que je n'ai toujours pas perdus. Ça été un bonheur de passer tes 5 mois de stage à tes côtés, j'ai hâte de venir te voir à la Réunion. **Jess**, tu as été sincèrement une belle découverte cette année, tu es une personne en or, et je sais pertinemment que tu vas brillamment réussir. Et si je peux te demander un petit truc, c'est de prendre soin de **Fred** pour moi s'il te plaît, cela compte énormément pour moi.

À mes proches, ces quelques lignes ne retransmettront pas toute la gratitude et la reconnaissance que j'éprouve pour vous, mais je n'ai aucun doute sur le fait que vous savez exactement l'importance que vous avez pour moi. Chacun d'entre vous représente un lien bien particulier, qui m'a accompagné pendant un certain nombre d'années, et qui je l'espère durera aussi longtemps que possible.

À la question, « Qu'est-ce que la thèse m'a apporté ? », je répondrai automatiquement : **Marie**. Tu as été LA rencontre de ma thèse. Nous sommes les deux inséparables du labo, merci d'avoir fait de moi ta Padawan, j'ai tellement appris avec toi professionnellement et personnellement. Je tiens à te remercier merci pour tous les moments magiques que nous collectons ensemble, c'est le plus important pour moi, que ce soit à la boîte, à l'expo Friends, à surtout à tous les futurs concerts et voyages que l'on va faire ensemble. Nous avons une VIE entière à vivre encore ensemble.

Fred, tu es une personne de confiance, exceptionnellement humaine et bienveillante. Tu m'as fait découvrir le monde de la science, et m'a appris tout ce que tu pouvais en 5 mois, il reste très peu de tuteurs aussi impliqués et présents que toi. J'aurais aimé passer plus de temps avec toi, parce que je sais pertinemment à quel point notre duo aurait été incroyable avec tous les délires qu'on a pu avoir et à quel point j'aurais été heureuse. Mais j'ai de la chance que tu sois toujours à mes côtés. Tu sais que je te suis éternellement reconnaissante de tout ce que tu as fait pour moi. Merci de ton soutien sans faille, de toujours être là, tu comptes infiniment pour moi.

Laëtitia, ma grande sœur de cœur, un lien unique qui s'est créé dans la plus particulière des périodes. Je te remercie infiniment d'être venue à mes côtés au moment où j'en avais le plus besoin, et surtout d'y être restée depuis maintenant 7 ans. Tu es un véritable exemple de courage, détermination, et force, je te remercie et remercie l'Univers de nous avoir mises sur la même route Le **Dr Manone** et toi m'avaient sans doute vue dans les pires états imaginables, et maintenant vous allez assister à ma soutenance de thèse, j'espère vous rendre fiers, merci de votre soutien et de votre présence.

Sis, Léa, et Laura, je ne pensais pas en m'inscrivant sur kik en 2016 qu'on en serait là autant d'années après. Vous avez été ma bouffée d'air frais pour m'éloigner de mon quotidien, et m'avez permis de savoir que quoi qu'il puisse se passer dans cette vie, j'aurais toujours des personnes sur qui compter. Merci pour la multitude de souvenirs que nous avons toutes les 4, j'ai hâte que l'on soit de nouveau réunies, je vous aime fort.

Je tiens particulièrement à remercier mes plus vieilles amies **Amanda** et **Laurène**, nous nous sommes rencontrées en 1999/2000 et vous êtes devenues ma famille. 24 ans plus tard, nous sommes toujours là à partager les plus grands moments de nos vies, merci infiniment. **Olivia**, ma copine d'Espagnol, je suis heureuse de laisser mon pot de thèse entre tes mains, tout ce que tu fais avec Back To Cookies est impressionnant, et je te remercie de nous régaler. **Lola**, je suis la plus heureuse d'avoir pu garder cette amitié si importante depuis le lycée, et maintenant que cette thèse est finie, je fonce en Norvège pour te voir. **Mathilda**, nous nous sommes toujours soutenues à la fac et pendant nos thèses respectives, ce n'était pas un long fleuve tranquille, mais on l'a fait, je suis tellement fière de toi.

Claire, tu as toujours été mon évidence. Depuis la première minute de notre rencontre, c'est vers toi que j'ai voulu aller, et c'est avec toi que je vais continuer d'avancer dans la vie. Je te remercie infiniment des 9 dernières années que l'on vient de passer, de tous les moments précieux qu'on a connus ensemble, et surtout de savoir que tu seras toujours à mes côtés. Merci d'être la meilleure amie que j'ai toujours voulue, de toujours te préoccuper de moi, et de me rendre si heureuse. Tu es la raison qui fait que mon monde tourne rond. Même lorsqu'on est coincées à Vitrolles...

Merci à ma famille, **Mamie, Maman, Tatie**, et **les garçons** d'être mon noyau sur qui je peux toujours compter, il n'y a rien de plus important. **Maman**, merci d'avoir toujours été là pour moi, de toujours avoir pris soin de moi, de m'avoir toujours donné confiance et d'avoir toujours fait en sorte que je me sente protégée. Il y a peu de personnes qui ont eu autant de chance que moi d'avoir une maman pareille. Tu voulais une fille Capricorne aux yeux verts et tu l'as eue, et toi, tu es exactement la maman dont j'aurais pu rêver.

ABRÉVIATIONS

A

ADN : Acide désoxyribonucléique
AFM : Microscopie à force atomique
AMM : Autorisation de mise sur le marché
 α -MSH : α -Melanocyte Stimulating Hormone
AP1 : Activator Protein 1
ARN : Acide ribonucléique
 α -SMA : α -smooth muscle actin
ATF4 : Activating transcription factor 4
ATP : Adenosine triphosphate
AXL : AXL tyrosine kinase receptor

B

BAP1 : BRCA1 associated protein 1
BAPN : β -aminopropionitrile
Breg : Lymphocyte B régulateur
BCL2 : B-cell lymphoma 2
BRAF : B-Raf proto-oncogène
BRAFi : Inhibiteur de BRAF

C

CAF : Cancer associated fibroblast
CAM-DR : Cell adhesion mediated drug resistance
CAV1 : cavéoline 1
CCL : Chemokine C-C motif ligand
CDK : Cyclin dependant kinase
C-MYC : Myc proto-oncogène
COL1A1 : Collagène de type 1 α 1 chaîne
CRAF : C-Raf proto-oncogène
CSD : Chronically Sun Damaged
CSM : Cellule souche mésenchymateuse
CTLA-4 : Cytotoxique T lymphocyte-associated antigen 4
CXCL1 : C-X-C motif chemokine ligand 1

D

DC : Cellule dendritique (Dendritic cell)
DDR : Récepteur à domaine discoidine (discoidin domain receptor)

DPEN : Diphényléthylènediamine

DUB : Déubiquitinase

E

EDNRB : Endothelin receptor type B

EGF : Epidermal growth factor

EGFR : Epidermal growth factor receptor

EM-DR : Environment-mediated drug resistance

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

F

FAK : Focal adhesion kinase

FAP α : Fibroblast activated protein α

FGF : Fibroblast growth factor

FGFR : Fibroblast growth factor receptor

FLNA : Filamine A

FN1 : Fibronectine 1

FOXO : Forkhead box O

FRA1 : Fos-related antigen 1

FRC : Fibroblast reticular cell

FSCN1 : Fascin actin-bundling protein 1

FSP1 : Fibroblast specific protein 1

G

GAG : Glycosaminoglycane

GAP : GTPases-activating proteins

GDI : GDP dissociation inhibitor

GDP : Guanosine diphosphate

GEF : Guanine nucleotide exchange factors

GFP : Green fluorescent protein

GNA11 : G protein subunit α 11

GPCR : G protein-coupled receptor

GPR77 : G protein-coupled receptor 77

GTP : Guanosine triphosphate

H

HA : Hyaluronic acid

HGF : Hepatocyte growth factor

HIF1 : Hypoxia inductible factor 1

I

IARC : International Agency for Research on Cancer
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
IFN- γ : interféron-gamma
IGF : Insulin growth factor
IGFR : Insulin growth factor receptor
IKK : Inhibitor of nuclear factor κ B Kinase
IL : Interleukine
INCA : Institut national du cancer

J

JAK : Janus kinase
JNK : Jun N-terminal kinase
JUN : Jun proto-oncogène

K

C-KIT : c-KIT proto-oncogène
KRAS : KRas proto-oncogène

L

LAIR : Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor
LIF : Leukemia inhibitory factor
LncANR : Long ARN non codant
LOX : Lysyl oxydase
LOXL : Lysyl oxydase like

M

MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MCL1 : Myeloid cell leukemia 1
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1
MC1R : Melanocortin 1 receptor
MDM2 : Murine double minute 2
MDSC : Myeloid derived suppressor cell
MEC : Matrice extracellulaire
MEK : MAP/ERK Kinase
MEKi : inhibiteur de MAP/ERK Kinase
MET : MET proto-oncogène
miR / miARN : Micro-ARN
MITF : Microphthalmia-associated transcription factor

MLANA : Melan-A
MLC-2 : Myosin light chain
MM-DR : Matrix mediated drug resistance
MMP : Metalloprotéases
MRD : Minimal residual disease
MRTF : Myocardin related transcription factor
MSC : Mesenchymal stem cell
M-TOR : Mechanistic Target Of Rapamycin kinase

N

N-cadhérine : Cadhérine neurale
NCSCCL : Neural crest stem cell like
NET : Neutrophil extracellular trap
NF1 : Neurofibromin 1
NF- κ B : Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cell
NGFR : Neural growth factor receptor
NK : Natural killer
NRAS : NRas proto-oncogène

P

Pa : Pascal
PAI-2 : Plasminogen activator inhibitor-2
PD-1/2 : Programmed cell death 1/2
PDGF : Platelet derived growth factor
PDGFR : Platelet derived growth factor receptor
PD-L1/2 : Programmed death ligand 1/2
PDX : Patient derived xenograft
PECAM : Platelet endothelial cell adhesion molecule
PEG : Polyéthylène glycol
PG : Protéoglycanes
PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PTEN : Phosphatase and tensin homologue
PTX3 : Long pentraxin 3

R

RAF : Raf proto-oncogène
Rb : Rétinoblastome
RGP : Radial growth phase
ROCK : Rho associated protein kinase
RTK : récepteur tyrosine kinase
ROS : Reactive oxygen species
RTK : Récepteur à tyrosine kinase

RXRG : Retinoid X receptor gamma

S

ScRNA-seq : Single cell RNA sequencing

SDF-1 : Stromal cell derived factor 1

SFM-DR : Soluble factor mediated drug resistance

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

ShARN : Petit ARN en épingle à cheveux

SiARN : Petit ARN interférent

SMAD : Small mothers against decapentaplegic

SOX10 : SRY-Box t10

SPARC : Secreted protein acidic rich in cysteine

SRC : SRC proto-oncogène

STAT : Signal transducer and activator of transcriptor

T

TAM : Tumor associated macrophage

TAN : Tumor associated neutrophil

TAZ : Transcription coactivator with PDZ-binding motif

T β RII : Récepteur de type 2 du TGF β

TCGA : The cancer genome atlas

TCR : T cell receptor

TEAD : TEA domain transcription factor

TFAP2 : Transcription Factor AP-2 Alpha

TFM : Microscopie à force de traction

TGF β : Transforming growth factor β

TH1 : Lymphocyte T helper (=auxiliaires) 1

TLR : Toll-like receptor

TN-C : Tenascine C

TNF α : Tumor necrosis factor α

Treg : Lymphocyte T régulateur

TSP : Thrombospondine

TWIST : Twist family BHLH transcription factor

TYRP1 : Tyrosinase related protein 1

U

UV : Ultra-violet

V

VCAM-1 : Vascular adhesion molecule 1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor

VGP : vertical growth phase

W

WNT5A : Wingless related integration site family member 5A

Y

YAP : Yes associated protein

Z

ZEB : Zincfinger E-box-binding homeobox

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	2
ABSTRACT	3
REMERCIEMENTS	4
ABRÉVIATIONS	10
TABLE DES MATIÈRES	16
TABLE DES ILLUSTRATIONS	19
INTRODUCTION	20
CHAPITRE I : LE MELANOME CUTANE	20
I. EPIDEMIOLOGIE :	20
II. FACTEURS DE RISQUES :	21
A. <i>Facteurs extrinsèques</i>	21
B. <i>Facteurs intrinsèques</i>	21
III. L'ORIGINE DU MELANOME CUTANE :	22
A. <i>Généralités sur la peau</i>	22
B. <i>La transformation du mélanocyte</i>	23
C. <i>Mutations initiatrices et voies de signalisation impactées</i>	25
1. La voie des MAPK	25
BRAF :	26
NRAS :	27
NF1 :	27
Triple négatif :	27
2. La voie PI3K/AKT :	27
3. La voie NFkB :	29
4. La voie YAP/TAZ :	30
5. La voie du TGF-β :	30
IV. HETEROGENEITE DU MELANOME :	31
A. <i>Plasticité phénotypique</i> :	32
B. <i>Marqueurs de plasticité</i>	33
C. <i>Induction de la plasticité</i>	36
CHAPITRE II : LE TRAITEMENT DU MELANOME CUTANE	38
I. PRISE EN CHARGE CLINIQUE	38
A. <i>Les thérapies ciblées</i>	39
Les inhibiteurs de BRAF :	39
La combothérapie : inhibiteurs de BRAFV600 et inhibiteurs de MEK :	40
B. <i>Les immunothérapies</i>	41
Les anti-CTLA-4 :	42
Les anti-PD-L1 :	43
C. <i>Combinaison entre les thérapies ciblées et les immunothérapies</i>	43
II. LES MECANISMES DE RESISTANCE THERAPEUTIQUE	44
A. <i>La résistance intrinsèque</i>	44
1. La résistance innée aux thérapies ciblées	44
2. La résistance acquise aux thérapies ciblées	45
Mécanismes de résistance génétique :	46
Mécanismes de résistance non génétique :	46
3. La résistance aux immunothérapies	48

4.	Résistance croisée entre thérapies ciblées et immunothérapies.....	50
B.	<i>La résistance extrinsèque</i>	50
1.	La résistance conférée par les facteurs solubles (SFM-DR).....	51
2.	La résistance conférée par l'adhérence (CAM-DR)	52
	Adhérence cellulaire	52
	Adhérence à la matrice extracellulaire	52

CHAPITRE III : LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL..... 54

I.	LES COMPOSANTS CELLULAIRES DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	55
A.	<i>Les cellules immunitaires</i>	55
1.	Les cellules de la lignée lymphoïde	55
	Les lymphocytes T	55
	Les lymphocytes B.....	55
	Les cellules « Natural Killer ».....	55
2.	Les cellules de la lignée myéloïde	56
	Les macrophages associés à la tumeur (TAM)	56
	Les cellules myéloïdes suppressives.....	56
	Les cellules dendritiques	56
	Les neutrophiles.....	56
B.	<i>Les cellules originaires du mésenchyme</i>	57
1.	Les cellules endothéliales.....	57
2.	Les péricytes.....	57
3.	Les cellules souches mésenchymateuses.....	57
4.	Les fibroblastes associés au cancer	57
	a) Définition et origine des fibroblastes.....	58
	b) Hétérogénéité des CAF	59
	c) Rôle des CAF dans le cancer.....	61
II.	LES COMPOSANTS NON CELLULAIRES DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	64
A.	<i>Les composants non matriciels</i>	64
B.	<i>La Matrice ExtraCellulaire (MEC)</i>	64
1.	Composition de la MEC	65
	a) Les macromolécules fibreuses	65
	L'élastine	65
	Les collagènes	65
	b) Les macromolécules glycoprotéiques	66
	Les protéoglycanes.....	66
	La fibronectine	67
	Les laminines	68
	c) Les protéines matricielles	68
	SPARC (ou ostéonectine).....	68
	Les ténascines	68
	d) Les enzymes de remodelage de la MEC.....	69
	Les enzymes de dégradation de la MEC.....	69
	Les enzymes de réticulation de la MEC.....	69
2.	Rôle de la MEC dans le cancer.....	70
	La prolifération	71
	L'angiogenèse.....	72
	L'invasion et la formation de métastases.....	72
	La réponse immunitaire	72
3.	Cibler la MEC comme nouvelle approche thérapeutique	73

CHAPITRE IV : LYSYL OXIDASE LIKE 2.....	74
I. LA FAMILLE DES LYSYL OXIDASES.....	74
A. Généralités.....	74
B. Activité enzymatique	75
II. ROLES PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE DES LYSYL OXIDASES	77
A. Profil d'expression et rôle physiologique de la famille des Lysyl Oxidases.....	77
B. Rôle pathologique des membres de la famille des Lysyl Oxidases.....	77
III. LOXL2 ET CANCER.....	79
A. Régulation de LOXL2.....	79
1. Régulation transcriptionnelle.....	80
2. Régulation post transcriptionnelle.....	80
3. Régulation post-traductionnelle :	81
B. Rôle de LOXL2 dans la progression tumorale	82
1. Le développement de la tumeur primaire	82
2. La prolifération.....	83
3. L'angiogenèse tumorale.....	83
4. La transition épithélio-mésenchymateuse.....	83
5. La migration et l'invasion	84
6. La niche pré-métastatique et métastases.....	85
7. Résistance au traitement	86
C. LOXL2 en tant que cible thérapeutique.....	86
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE	89
RÉSULTATS.....	90
Article 1 : The Lysyl OXidase Like 2 (LOXL2) plays a critical role in extracellular matrix remodeling and invasive properties of dedifferentiated mesenchymal melanoma cells	90
RESULTATS COMPLEMENTAIRES :	137
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	146
Est-ce que LOXL2 agit comme un acteur ou est-il une conséquence de la transition phénotypique des cellules de mélanome cutané ?.....	146
Dans quelle mesure les rôles extracellulaires et intracellulaires de LOXL2 sont impliqués dans la progression du mélanome cutané ?.....	149
Quelle est la contribution de LOXL2 au sein du microenvironnement tumoral ?.....	151
La protéine LOXL2 peut-elle favoriser un dialogue entre les cellules de mélanome et leur microenvironnement ?.....	153
Peut-on considérer LOXL2 comme une nouvelle cible thérapeutique ?.....	155
CONCLUSION	158
BIBLIOGRAPHIE	160
ANNEXES.....	201
Annexe 1 : Targeting DDR1 and DDR2 overcomes matrix- mediated melanoma cell adaptation to BRAF- targeted therapy	204
Annexe 2 : The profibrotic miR-143/145 cluster promotes mesenchymal phenotypic plasticity associated with resistance to targeted therapies in melanoma	205

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Introduction :

Figure 1 : Incidence et mortalité du mélanome cutané en France au cours du temps	21
Figure 2 : Structure générale de la peau.....	22
Figure 3 : La progression du mélanome et les différentes altérations génétiques associées.....	23
Figure 4 : Schéma représentant les voies des MAP kinases	25
Figure 5 : La voie des MAP kinases en conditions physiologique et pathologique	26
Figure 6 : La voie des PI3K/AKT en conditions physiologique et pathologique	29
Figure 7 : Hétérogénéité du mélanome à différentes échelles.....	31
Figure 8 : Plasticité phénotypique dans la progression du mélanome	32
Figure 9 : Les différents états phénotypiques des cellules de mélanome	35
Figure 10 : Marqueurs et inducteurs de la transition phénotypique.....	37
Figure 11 : Options de traitement approuvées pour les patients atteints d'un mélanome métastatique	39
Figure 12 : Les immunothérapies anti-CTLA-4 et anti-PD-1/PD-L1	42
Figure 13 : Mécanismes de résistance intrinsèque aux thérapies ciblées par réactivation de la voie MAPK ou activation de la voie PI3K/AKT	44
Figure 14 : Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées sur la voie des MAPK	46
Figure 15 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques impliqués dans la réponse aux immunothérapies	49
Figure 16 : Les différents types de résistance que le microenvironnement confère aux cellules tumorales	51
Figure 17 : Le microenvironnement tumoral	54
Figure 18 : Origines possibles des CAFs dans le microenvironnement tumoral	58
Figure 19 : Représentation schématique de l'hétérogénéité des CAFs	61
Figure 20 : Interactions des CAF avec les différentes cellules stromales et leurs rôles dans la progression tumorale	62
Figure 21 : Rôles des CAF dans les propriétés tumorales	63
Figure 22 : Étapes de formation des fibres de collagène	66
Figure 23 : Structure de la fibronectine	67
Figure 24 : Rôle de la MEC dans les propriétés tumorales.....	71
Figure 25 : Structure des membres de la famille des Lysyl Oxidases.....	74
Figure 27 : La réaction de déamination par les lysyl oxydases sur les collagènes	76
Figure 28 : La réaction de déamination par les lysyl oxydases sur l'élastine	76
Figure 29 : Régulation de LOXL2	79
Figure 30 : Effecteurs en aval de LOXL2 dans le cancer	82

Résultats complémentaires :

Figure 1 : LOXL2 knockdown or inhibition decreases the acquired myofibroblastic properties induced in skin fibroblasts upon TGFβ1 treatment :	140
Figure 2 : LOXL2-silenced MAF lose their ability to deposit aligned ECM fibers :.....	142
Figure 3 : Melanoma cells show an increase motility and a more elongated phenotype on fibroblast-derived matrices deposited by LOXL2 expressing MAF :	144

Conclusion :

Figure 1 : Modèle proposé du rôle tumoral et stromal de LOXL2 dans le mélanome cutané	159
---	-----

INTRODUCTION

Chapitre I : Le mélanome cutané

I. Epidémiologie :

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Prenez quelques minutes pour vous rendre sur le site Worldometers, un site de statistiques en temps réel. Vous pouvez suivre différents chiffres comme le nombre de naissance, le nombre de décès, ou même le nombre d'e-mail envoyés ce jour. Maintenant, dans la catégorie « Health », vous pouvez voir le nombre de décès dû au cancer cette année d'après la « World Health Organization (WHO) ». Au moment où j'écris ces quelques lignes, le cancer a tué 6 061 637... 6 061 650... 6 061 657...6 061 659 personnes. Oui, vous voyez le nombre de décès augmenter devant vos yeux.

D'après les données de l'IARC (International Agency for Research on Cancer), nous avons recensé 19,3 millions de nouveaux cas de cancer dans le monde en 2020, ainsi que 10 millions de décès. En France, nous estimons à 382 000 le nombre de nouveaux cas de cancer diagnostiqués en 2018, et 157 400 décès en 2018.

Les cancers cutanés représentent environ 2 millions de nouveaux cas dans le monde en 2020 et environ 120 000 décès. Ils se divisent principalement en cancers cutanés non mélanocytaires et cancers cutanés mélanocytaires ou mélanome. La première catégorie regroupe les tumeurs d'origine épithéliale : les carcinomes basocellulaires, qui sont très fréquents mais peu dangereux au vu de leur faible potentiel métastatique, et les carcinomes spinocellulaires. Les mélanomes proviennent eux de la transformation des mélanocytes, cellules qui dérivent de la crête neurale.

Le mélanome quant à lui représente 324 635 nouveaux cas en 2020 dans le monde et 57 043 décès. C'est un cancer agressif et son incidence reste en constante augmentation (+3,4% en moyenne pour les hommes et +2% pour les femmes) en France entre 1990 et 2018. Ainsi, en 2018, nous avons recensé 15 500 nouveaux cas en France et 1800 décès d'après les données de l'Institut National du Cancer en 2018.

Il existe des mélanomes muqueux ou intraoculaires mais ils ne représentent que 5% des mélanomes. Nous nous intéressons ici au mélanome qui se développe à partir de la peau : le mélanome cutané.

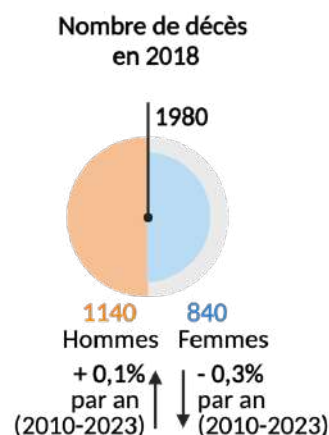
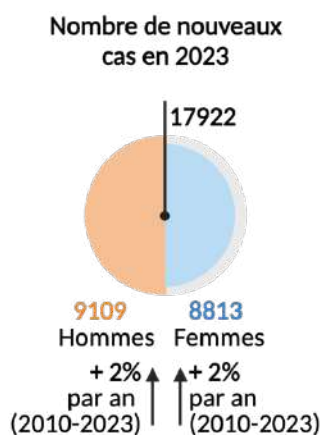
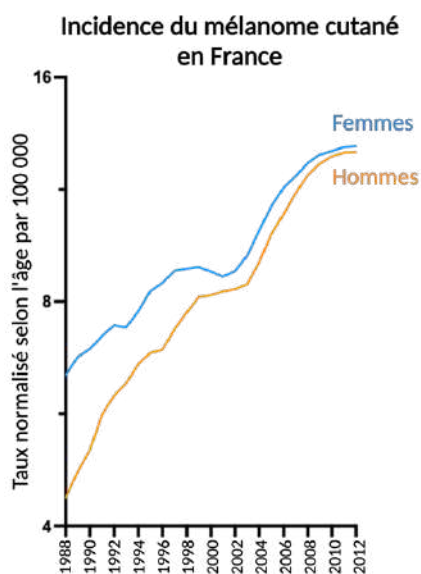


Figure 1 : Incidence et mortalité du mélanome cutané en France au cours du temps

A gauche, graphique montrant l'incidence du cancer cutané au cours du temps (1988-2012) en France, chez les hommes et les femmes d'après l'IARC (International Agency for Research on Cancer). A droite, nombre de nouveaux cas de mélanome cutané chez les hommes et les femmes en France en 2023. Nombre de décès causé par le mélanome cutané chez les hommes et les femmes en France en 2018 d'après l'Institut National du Cancer.

II. Facteurs de risques :

A. Facteurs extrinsèques

L'incidence du mélanome cutané continue de progresser, malgré les campagnes de prévention quant au facteur environnemental le plus important : l'exposition au soleil et aux rayons ultraviolets (UV) artificiels ainsi que les antécédents de coups de soleil répétés durant l'enfance (Sample et He 2018). Le risque accru de développer un mélanome est corrélé à l'intensité et au temps d'exposition aux UV. Nous retrouvons alors des mélanomes dits induits par les UV (CSD) ou non induits par les UV (non-CSD) qui diffèrent par leur site d'origine, âge du patient, et du fardeau mutationnel associé. En effet, les mélanomes induits par les UV sont caractérisés par des mutations *NF1*, *NRAS*, *BRAF*^{nonV600E} et *KIT* (Shain et Bastian 2016; Bastian 2014).

B. Facteurs intrinsèques

En plus des facteurs environnementaux, le nombre de nævi mélanocytaires, le phototype ainsi que les prédispositions génétiques sont les facteurs de risques intrinsèques principaux. Les nævi mélanocytaires représentent une accumulation de mélanocytes bénigne. Environ 25% des mélanomes se développent à partir d'un nævus pré-existant (Bevona et al. 2003). C'est pourquoi, le nombre de nævi ainsi que leur taille et type est corrélé avec le risque de développer un mélanome (Gandini et al. 2005).

Concernant les prédispositions génétiques, 5 à 10% des personnes présentant un mélanome ont des antécédents familiaux au premier degré. Cette prédisposition familiale est causée par des mutations sur des gènes de prédisposition à forte ou intermédiaire pénétrance. On retrouve alors des mutations sur le gène à haute pénétrance *CDKN2A* principalement (Goldstein et al. 2007) et les gènes *CDK4* (Puntervoll et al. 2013), *BAP1* (Carbone et al. 2012), *TERT* (Horn et al. 2013), et *POT1* (Robles-Espinoza et al. 2014). Enfin on retrouve des variantes dans les gènes à risque intermédiaire *MC1R* (Gerstenblith et al. 2007) et du facteur Microphthalmia-associated transcription factor *MITF* (Yokoyama et al. 2011).

Enfin, le phototype et la sensibilité de la peau au soleil augmentent le risque de développer un mélanome. Le phototype dépend de la pigmentation de la peau qui est un processus complexe dont le gène *MC1R* constitue un facteur génétique crucial. Pour se protéger des UV, la peau possède un système de défense basé sur l'interaction entre les kératinocytes et les mélanocytes. Les UV stimulent les kératinocytes qui vont produire l'hormone α MSH qui se lie au récepteur à la surface des mélanocytes : *MC1R*. Cette signalisation va permettre l'expression de *MITF* et entraîne l'activation des enzymes *TRP1* et *TRP2* pour la synthèse des pigments mélaniques. La synthèse de mélanine permet d'absorber les rayons UV et d'empêcher les dommages à l'ADN. Deux types de pigments composent la mélanine : les phéomélanines (de couleur jaune) et les eumélanines (de couleur brune ou noire) qui absorbent la lumière. Les polymorphismes de *MC1R* entraînent des dysfonctionnements du récepteur et une transition de la synthèse d'eumélanine vers la synthèse de phéomélanine. Ce dernier type de mélanine présente une absence ou une réduction des propriétés photoprotectrices et conduit à un phototype clair et peu protecteur (Beaumont et al. 2007). Ainsi, les personnes possédant un teint clair, des yeux clairs et des cheveux blonds ou roux ont plus de risque de développer un mélanome (Titus-Ernstoff et al. 2005).

III. L'origine du mélanome cutané :

A. Généralités sur la peau

La peau est l'organe le plus étendu de l'être humain et possède des fonctions indispensables à l'organisme. Elle nous protège contre les agressions extérieures : les infections par des pathogènes, les blessures ainsi que les rayons UV. Elle nous permet aussi de réguler notre température corporelle, permet la production de vitamine D et détecte les informations extérieures faisant d'elle un organe sensoriel. Elle est composée de plusieurs couches : l'épiderme, le derme, et l'hypoderme en fonction de leur profondeur (Boer et al. 2016).

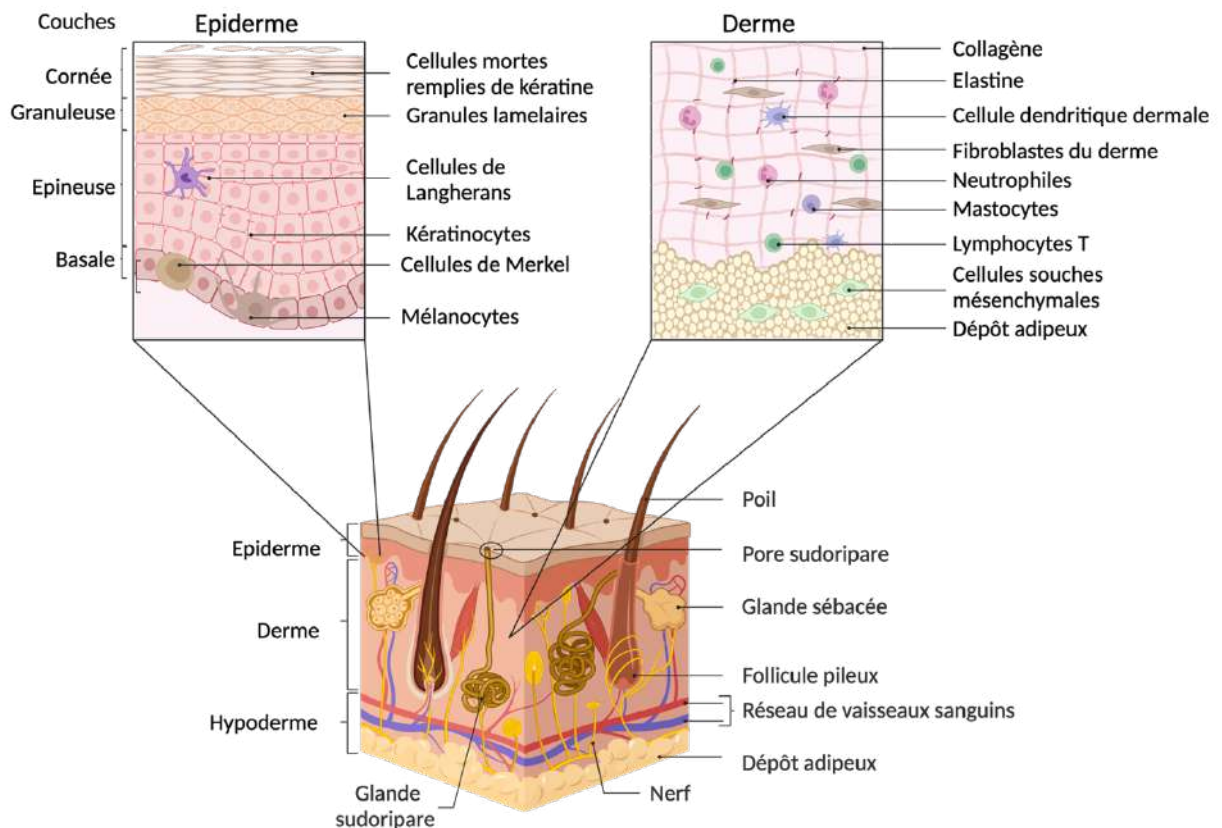


Figure 2 : Structure générale de la peau

En bas, Schéma légendé montrant la structure générale de la peau et de ses différentes couches. En haut, grossissement pour détailler la structure de l'épiderme à gauche et du derme à droite. Adapté de (Massella et al. 2019).

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. Il est composé à 90% de kératinocytes, mais aussi de cellules de Langherans, de macrophages résidents de la peau, de cellules tactiles, de cellules inflammatoires et de cellules de Merkel. L'épiderme contient lui-même plusieurs couches : la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale. C'est dans cette dernière que nous retrouvons les mélanocytes qui produisent la mélanine au sein d'organelles nommées mélanosomes (Paluncic et al. 2016) et de la transmettre aux kératinocytes pour leur protection contre les dommages à l'ADN causés par les UV. Cet épiderme, dépourvu de vaisseaux sanguins, repose sur le derme le principal tissu de soutien de la peau.

Le derme est composé majoritairement de fibroblastes produisant la matrice extracellulaire (MEC) qui permet de former la structure du derme. La MEC présente dans le derme est composée majoritairement de fibres de collagène de type I, III et en moindre proportion IV et de fibres d'élastine étant à l'origine de la souplesse et de l'élasticité de la peau. Nous retrouvons aussi des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des récepteurs neuronaux comme les récepteurs nerveux sensoriels de Merkel et Meissner pour le toucher, des corpuscules de Ruffini qui sont des mécanorécepteurs et les corpuscules de Pacini pour la pression.

Enfin, l'hypoderme est la couche la plus profonde. Il s'agit d'un tissu conjonctif lâche qui forme des poches de tissus adipeux. Cela va permettre d'assurer des fonctions de réserves graisseuses, d'isolant thermique, et de protection des organes internes. Les principaux types de cellules retrouvées dans l'hypoderme sont donc des cellules adipeuses, mais aussi des fibroblastes et macrophages.

B. La transformation du mélanocyte

Nous savons que 25% des mélanomes se développent à partir d'un nævus préexistant alors que 75% des mélanomes apparaissent à partir d'une lésion nouvelle, un mélanocyte qui accumule des altérations génétiques et épigénétiques. Dans les deux cas, nous retrouvons une altération de la voie des MAPK et plus spécifiquement de l'oncogène BRAF ou NRAS, qui initie la mélanomagenèse. Pour suivre la transformation du mélanocyte en mélanome métastatique, nous pouvons nous référer au modèle de Clark (Clark et al. 1969).

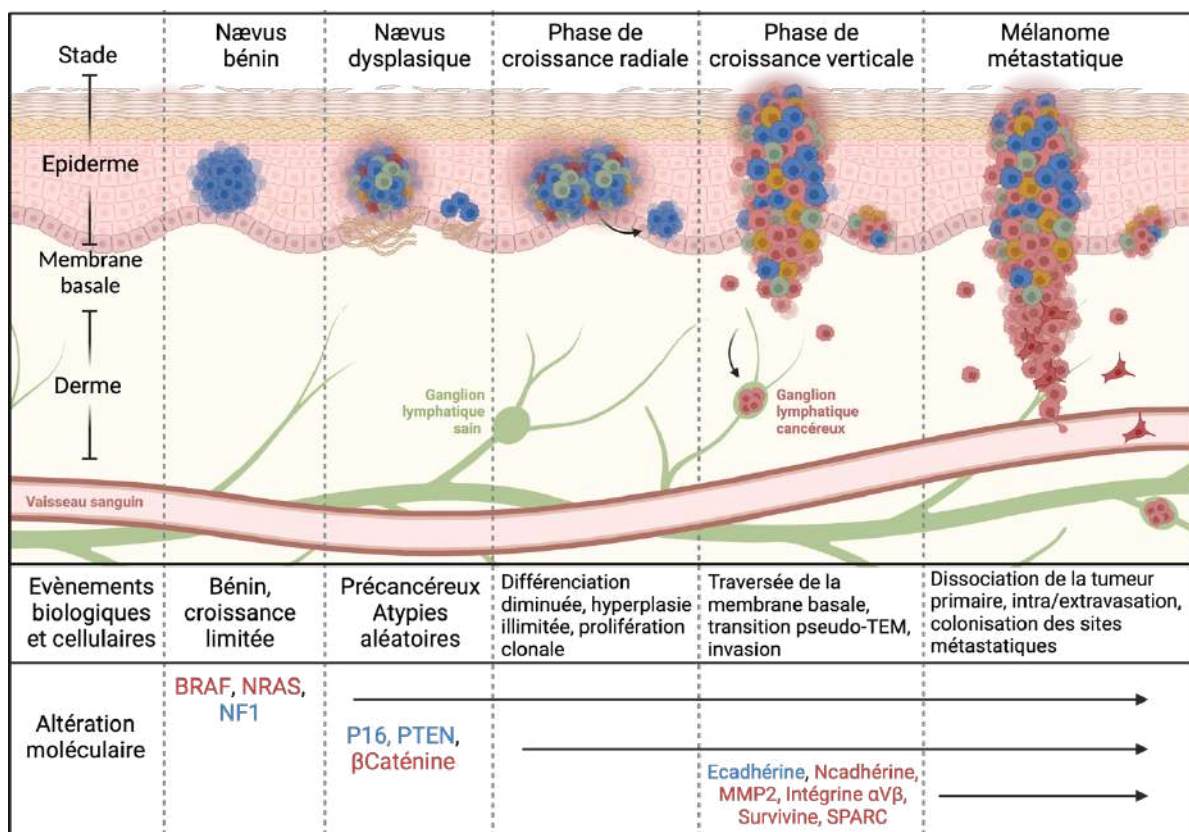


Figure 3 : La progression du mélanome et les différentes altérations génétiques associées

Schéma montrant les étapes de la progression du mélanome cutané. Chaque étape de la progression tumorale est illustrée et légendée avec les différentes altérations moléculaires et les évènements biologiques et cellulaires qui y sont associés. Les gènes surexprimés ou avec une mutation gain de fonction sont écrits en rouge, alors qu'en bleu nous retrouvons les gènes dont l'expression diminue ou les gènes qui possèdent une mutation perte de fonction. Adapté de (A. J. Miller et Mihm 2006; Gesbert et Larue 2018).

Le premier changement phénotypique qui se met en place dans la progression du mélanome, est la prolifération du mélanocyte en un nævus bénin. Cependant, l'activité prolifératrice est limitée par la sénescence qui empêche ainsi la transformation maligne du nævus (A. J. Miller et Mihm 2006). En effet, en réponse au stress induit par l'oncogène BRAF, le cycle cellulaire s'arrête et les cellules entrent en sénescence. C'est ce qu'on appelle la sénescence induite par l'oncogène (Kaplon et al. 2014). Pourtant, les nævi bénins sont capables d'échapper à la sénescence et évoluer en néoplasme.

Les mutations BRAF se produisent à une fréquence identique entre les nævi bénins et dans les mélanomes primaires et métastatiques. Cela suggère ainsi que les nævi doivent acquérir des mutations secondaires et des lésions moléculaires supplémentaires pour échapper à la sénescence et devenir malins. Ainsi, dans le développement des nævi dysplasiques, on retrouve des anomalies moléculaires affectant la prolifération cellulaire, la réparation de l'ADN et la mort cellulaire. On retrouve par exemple des mutations sur le gène *CDKN2A* (Kannan et al. 2003) responsable de la synthèse des oncosuppresseurs p16^{INK4A} et p19^{ARF} dans 20 à 40% des cas de mélanome familiaux.

Une fois que les cellules ont échappé à la sénescence, elles entrent en phase de croissance radiale (RGP) caractérisée par l'extension horizontale de la lésion (Clark et al. 1969). Les cellules mélanocytaires dépendent des différents facteurs de croissance produits par les kératinocytes, ce qui explique leur incapacité à envahir le derme. Durant cette phase, les cellules acquièrent de fortes capacités de prolifération et une résistance à la mort apoptotique en se multipliant de manière anarchique dans l'épiderme sans franchir la jonction dermo-épidermique. Ces cellules progressent ensuite vers un état dédifférencié dû à la diminution de l'expression du facteur de transcription clé du lignage mélanocytaire : MITF (Hoek et al. 2006).

Les cellules de mélanome vont ainsi acquérir des capacités invasives, leur permettant de traverser la lame basale de l'épiderme et de se multiplier dans le derme. Cette phase cruciale de la progression du mélanome est appelée phase de croissance verticale (VGP) et confère au mélanome son agressivité de par son potentiel métastatique. L'acquisition de cette propriété invasive est liée à une pseudo-transition de type épithélio-mésenchymateuse (TEM ou pseudo-TEM), l'altération de l'adhésion cellulaire, la communication intercellulaire, et une importante plasticité cellulaire conférée par les différents signaux du microenvironnement. Au niveau moléculaire, les cellules en phase VGP ont une modification de l'expression des cadhérines qui sont des protéines transmembranaires multifonctionnelles permettant les contacts de cellule à cellule. On observe alors une perte de l'E-Cadhérine, une protéine qui régule leur interaction avec les kératinocytes au profit de la N-Cadhérine généralement exprimée dans les cellules mésenchymateuses du derme. En phase VGP, nous retrouvons aussi l'expression de SPARC, la fibronectine et l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Cette dernière induit ainsi l'expression de la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP2), ce qui va alors permettre la dégradation du collagène dans la membrane basale (Cédric Gaggioli et al. 2007a; G. Robert et al. 2006; A. J. Miller et Mihm 2006). Après avoir envahi le derme, les cellules de mélanome rejoignent la circulation sanguine ou lymphatique afin de coloniser des organes secondaires et d'y former des métastases notamment au niveau des ganglions lymphatiques, du cerveau, des poumons ou du foie (Jianglan Liu et al. 2014; Massagué et Obenauf 2016).

Nous avons aussi montré au laboratoire que l'interaction de la protéine SPARC exprimée par les cellules tumorales et la protéine d'adhésion VCAM-1 exprimée dans les cellules endothéliales du poumon, permet ainsi l'extravasation des cellules de mélanomes au poumon, une étape importante dans la formation des métastases (Tichet et al. 2015). Un des premiers sites de formation des métastases est le ganglion lymphatique. Afin de le rendre plus permissif, de favoriser l'arrivée des cellules tumorales, de permettre la formation de métastases et leur dissémination vers les autres organes, les cellules de mélanome sont capables de sécréter elles-mêmes des facteurs solubles (Riedel et al. 2016). Nous avons en effet montré que la sécrétion d'IL1 β par les cellules de mélanome dédifférenciées entraîne un relâchement des fibroblastes du ganglion favorisant la création d'une niche pré-métastatique et ainsi l'invasion des cellules de mélanome (Rovera et al. 2022).

C. Mutations initiatrices et voies de signalisation impactées

1. La voie des MAPK

Le mélanome est un cancer très hétérogène dont la progression est marquée par la présence de mutations somatiques « drivers » touchant des gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. En 2015, le Cancer Genome Atlas a classifié le mélanome en quatre sous-types moléculaires principaux, en se basant sur la mutation qu'il présente. Les trois premiers groupes portent des mutations somatiques très fréquentes conduisant à l'activation constitutive de la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase).

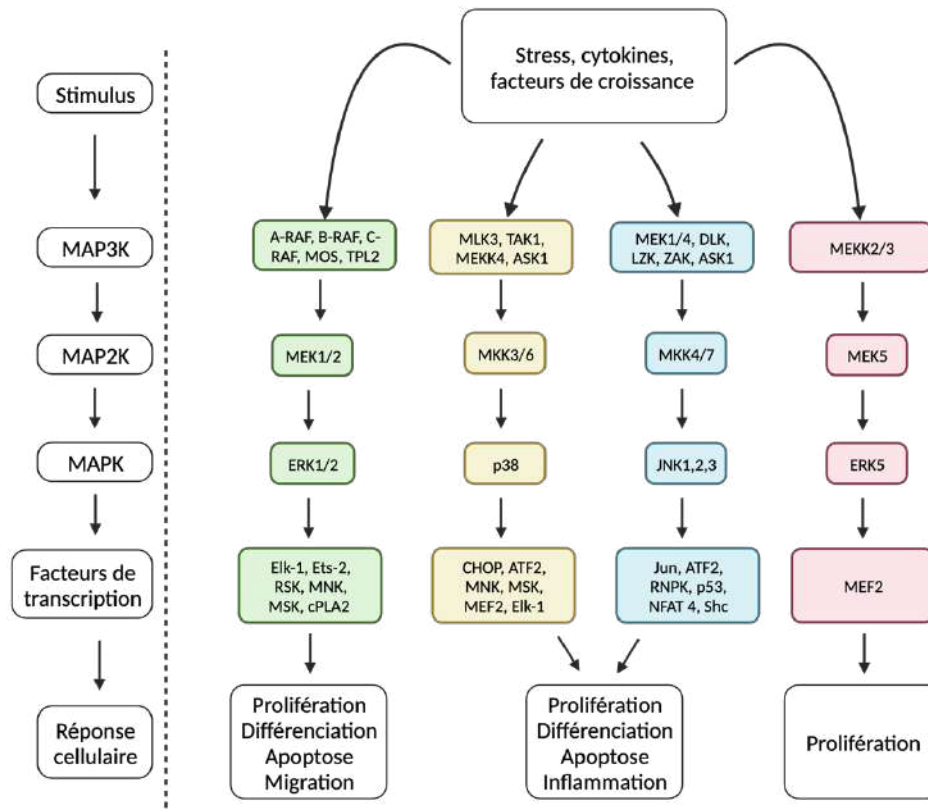


Figure 4 : Schéma représentant les voies des MAP kinases

Schéma représentant les quatre grandes cascades de protéines kinases MAPKKK, MAPKK, MAPK chez les mammifères. Il est intéressant de noter que la voie ERK est généralement activée par des facteurs de croissance alors que les voies JNK, p38 et ERK5 sont activées par le stress environnemental. Adapté de (Roberts et Der 2007; Dhillon et al. 2007).

La voie MAPK est composée d'un module de kinase à trois niveaux dans lequel une MAPK est activée lors de sa phosphorylation par une MAPKK, qui à son tour est activée lorsqu'elle est phosphorylée par une MAPKKK. Ainsi, différents signaux extracellulaires comme des facteurs de croissance ou des cytokines vont induire cette cascade, conduisant à l'activité des MAPK : JNK, p38 ou ERK. Concernant cette dernière, en conditions physiologiques, une petite protéine G de la famille RAS recrute et active une MAPKKK de la famille RAF (A-RAF, B-RAF ou C-RAF) qui va par la suite phosphoryler la MAPKK MEK1/2 et conduire à l'activation de la MAPK ERK1/2 (W. Zhang et Liu 2002). Au niveau du cytoplasme, ERK1/2 activé peut phosphoryler certaines protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette telles que les protéines associées aux microtubules MAP1, MAP2, MAP4. Dans le noyau, ERK1/2 peut activer de nombreux facteurs de transcription comme ELK-1, c-JUN, c-MYC ou encore c-FOS (Shaul et Seger 2007).

En oncologie, cette voie joue un rôle majeur dans le développement du cancer via son action sur de nombreuses fonctions physiologiques comme la prolifération cellulaire, la différenciation, la mort cellulaire ou la migration. Dans le mélanome, nous retrouvons une dérégulation importante de la voie MAPK suite aux différentes mutations somatiques. En effet, les trois premiers sous-types de mélanome présentent des mutations sur les gènes BRAF, NRAS et NF1 (« Genomic Classification of Cutaneous Melanoma » 2015).

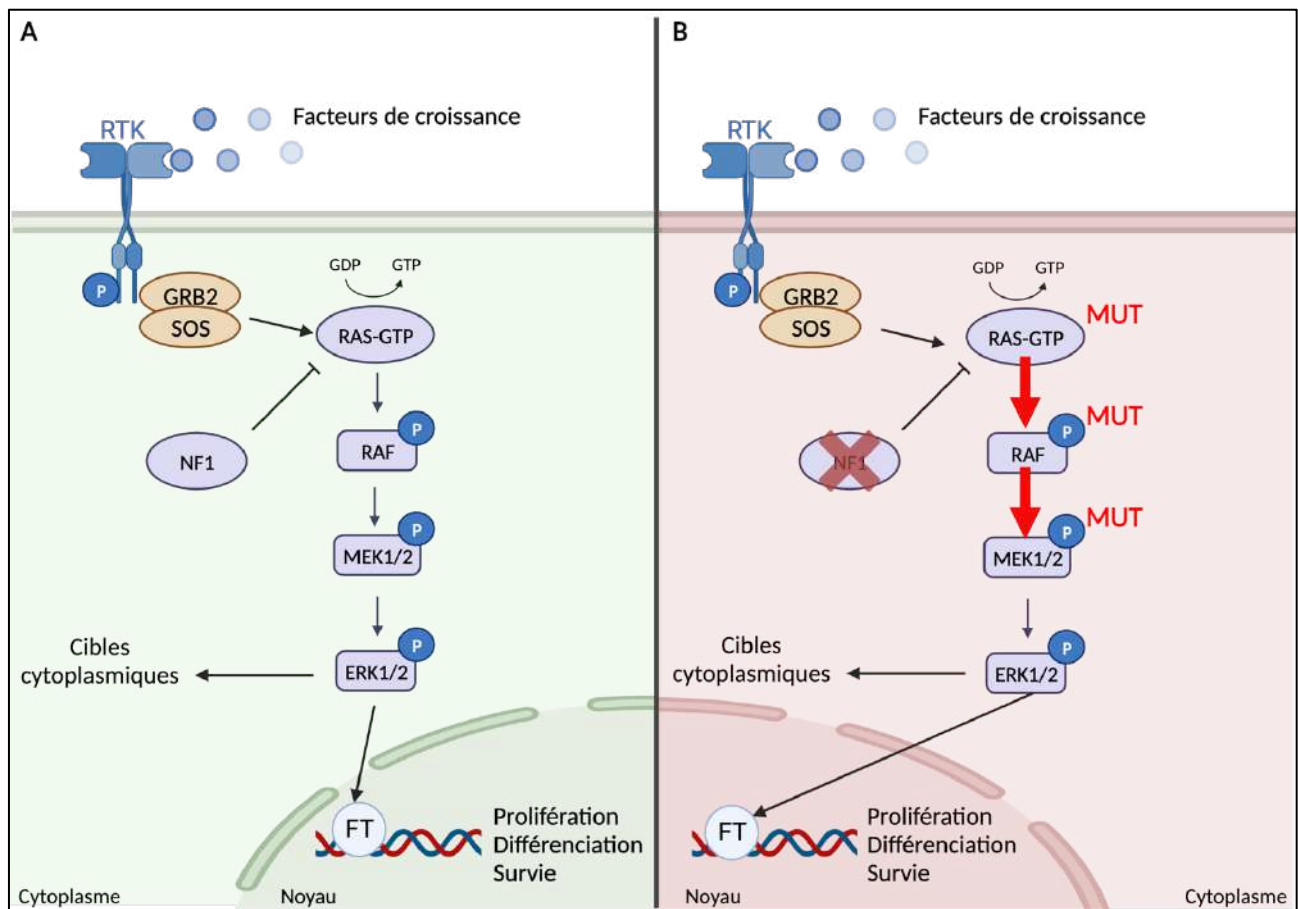


Figure 5 : La voie des MAP kinases en conditions physiologique et pathologique

En condition physiologique (à gauche), certains ligands comme des facteurs de croissance se lient aux RTK qui s'activent par autophosphorylation. Les résidus phospho-tyrosines recrutent les protéines adaptatrices Grb2 et Sos, ce qui favorise l'association RAS-GTP. Cela entraîne l'activation de RAF, la première kinase effectrice de la voie MAPK. RAF phosphoryle ensuite MEK, qui à son tour phosphoryle ERK. La protéine ERK phosphorylée active les substrats cytoplasmiques et nucléaires. Dans les cellules de mélanome (à droite), des mutations sur RAS peuvent altérer sa capacité à hydrolyser le GTP, restant ainsi activé, de même que les mutations perte de fonction sur NF1. Les mutations de la kinase BRAF sont les plus fréquentes dans le mélanome, provoquant une phosphorylation continue de la MEK et des cibles en aval. Adapté de (Dantonio et al. 2018).

BRAF :

Dans 50% des cas, les patients présentent une mutation BRAF dont la principale est la substitution de la Valine (V) par de l'Acide Glutamique (E) au niveau du codon 600 de l'exon 15. (V600E) dans 39% des cas (H. Davies et al. 2002). La deuxième mutation la plus commune, BRAFV600K est responsable de 15% des mélanomes (Bucheit et al. 2013). Ces mutations sont à l'origine de l'activation constitutive de son domaine kinase et ainsi de la voie des MAPK. Nous savons que la mutation BRAFV600E apparaît à haute fréquence dans les mélanocytes et que l'expression de l'oncoprotéine BRAFV600E dans des mélanocytes humains entraîne pourtant un arrêt de cycle cellulaire et une entrée en sénescence (Michaloglou et al. 2005). La sénescence induite par l'oncogène BRAFV600E est d'ailleurs connue pour limiter les lésions mélanocytaires précancéreuses (Hensin Tsao et al. 2012). Ainsi, cette mutation sur le gène BRAF n'est pas suffisante pour

induire la transformation maligne du mélanocyte. Des altérations génétiques supplémentaires sont donc nécessaires afin d'échapper à la sénescence. D'autres études ont ainsi mis en évidence que la perte du suppresseur de tumeur PTEN associé à la mutation de BRAF permet le développement du mélanome dans un modèle murin (Dankort et al. 2009). La coopération entre BRAFV600E et MITF a aussi été montrée comme étant impliquée dans la transformation maligne (Garraway et al. 2005; Wellbrock et Marais 2005). Enfin, la β -caténine joue un rôle important dans la progression tumorale et la formation de métastases ganglionnaires et pulmonaires dans un modèle murin de mélanome basé sur la mutation *BrafV600E* et la perte de *Pten* spécifique aux mélanocytes (Damsky et al. 2011).

NRAS :

Le deuxième type majeur de mélanome est défini par la présence de mutations sur la protéine RAS. 28% des mélanomes présentent une mutation NRAS, plus spécifiquement sur la glutamine 61 (61Q) dans 90% des cas (« Genomic Classification of Cutaneous Melanoma » 2015). Les protéines RAS appartiennent à la famille de petites protéines G possédant une activité GTPase intrinsèque. La mutation de NRAS empêche l'hydrolyse du GTP en GDP et rend la protéine constitutivement active. Les mutations sur KRAS et HRAS sont peu fréquentes dans le mélanome, contrairement aux cancers du côlon, poumon ou encore pancréas (Hobbs, Der, et Rossman 2016). La mutation NRAS suivie de la perte de INK4A conduit à la formation de métastases (Ackermann et al. 2005). De même, la coopération de NRAS et de la β -caténine favorise le développement du mélanome (V. Delmas et al. 2007).

NF1 :

Le troisième sous-type de mélanome cutané est caractérisé par la présence d'une mutation sur le gène NF1 que l'on retrouve dans 14% des cas (« Genomic Classification of Cutaneous Melanoma » 2015). NF1 est un gène codant pour la neurofibromine, un suppresseur de tumeur dont la fonction est de stimuler l'activité GTPase de la protéine RAS en catalysant l'hydrolyse du GTP en GDP. Ainsi, les mutations pertes de fonction de NF1 entraînent une activation de la voie RAS et de ces effecteurs importants dans les voies MAPK et PI3K/AKT (Andersen et al. 1993).

Triple négatif :

Ce sous-type moléculaire de mélanome cutané est très hétérogène puisqu'il comprend toutes les tumeurs qui n'expriment pas les trois mutations décrites précédemment. Parmi les mutations présentes dans ce groupe, nous retrouvons des mutations d'amplification des gènes *ERBB4*, *KIT*, *GNA11*, et *GNAQ* qui entraînent elles aussi une activation de la voie MAPK. Certaines tumeurs présentent aussi des mutations sur *PDGFRA* et *VEGFR2* entraînant une activation de la voie PI3K/AKT. Enfin, des mutations sur la voie du cycle cellulaire, la réponse aux dommages à l'ADN et à la mort cellulaire, ont également été décrites, avec notamment une amplification des gènes *CDK4*, *CCND1*, *HDM2* (impliqués dans le contrôle de p53) et une augmentation de l'expression du facteur anti-apoptotique *BCL2* (« Genomic Classification of Cutaneous Melanoma » 2015).

2. La voie PI3K/AKT :

La famille des kinases lipidiques appelées phosphoinositides 3-kinases (PI3K) joue un rôle clé dans de nombreux processus cellulaires notamment dans la survie cellulaire, la prolifération, ou encore la différenciation en réponse à différents stress ou stimuli. Les PI3K permettent de transduire les signaux de différentes cytokines et facteurs de croissance en messages intracellulaires par la génération de phospholipides capables d'activer la sérine/thréonine kinase AKT. C'est pour cela que la voie PI3K est l'effectrice principale en aval des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) et des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (P. Liu et al. 2009; Engelman 2009).

Il existe plusieurs classes de PI3K selon leurs caractéristiques structurales et leur spécificité de substrat. Les PI3K de classe IA sont activées directement par les RTK, les GPCR ou la petite protéine G RAS (L. Zhao et Vogt 2008) tandis que les PI3K de classe IB ne sont activés que par les GPCR. Concernant la classe IA, ce sont des hétérodimères composés d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110 (D. R. Kaplan

et al. 1987). En réponse aux facteurs de croissance et ainsi à l'activation des RTK, PI3K est recruté à la membrane via l'interaction entre la sous-unité p85 et les motifs tyrosine phosphorylés de la partie intracellulaire des récepteurs. Cela va permettre d'activer la sous-unité catalytique p110 qui va ensuite générer un phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, PI(3,4,5)P₃, un second messager essentiel pour l'activation d'AKT et son recrutement à la membrane plasmique. La protéine AKT également connue sous le nom de protéine kinase B est une sérine/thréonine kinase exprimée sous trois isoformes AKT1, AKT2 et AKT3. Après son recrutement, AKT subit un changement de conformation exposant alors deux résidus importants et critiques pour sa phosphorylation. L'activation complète d'AKT dépend ainsi de la phosphorylation du résidu T308 par PDK1 et S473 par PDK2 (Wick et al. 2000). Une fois phosphorylé et activé, AKT va pouvoir réguler d'importants processus cellulaires comme le cycle cellulaire, la réparation à l'ADN, l'apoptose, le métabolisme du glucose, la prolifération, la transcription, la migration, l'angiogenèse via la phosphorylation de certaines protéines comme GSK3 (glycogène synthase kinase 3) (Cross et al. 1995) et FOXO (Brunet et al. 1999) ou encore PRAS40 et TSC2. La phosphorylation de ces deux protéines empêche leur effet inhibiteur sur mTORC1. Il s'agit d'un complexe composé des protéines mTOR, Raptor, PRAS40, et mLST8 dont les cibles en aval les mieux caractérisées sont S6K1 (kinase p70S6) et 4E-BP1 (protéine de liaison 4E). Ce sont deux protéines impliquées dans la régulation de la synthèse protéique. Cela confère donc un avantage dans la croissance cellulaire grâce à la synthèse accrue de nouvelles protéines. Il est intéressant de noter que la liaison de mTOR à Rictor dans le complexe MTORC2 fonctionne comme PDK2 pour phosphoryler AKT.

Pour contrôler et prévenir une activation persistante et durable de cette voie, le suppresseur de tumeur PTEN utilise son activité lipide phosphatase en convertissant PIP3 en PIP2 et constitue ainsi le principal régulateur négatif de PI3K/AKT. Dans plusieurs cancers, la voie de signalisation PI3K/AKT est activée de manière aberrante permettant à la cellule de se protéger face aux différents stress, et ainsi avoir une meilleure capacité de survie. Les mécanismes d'activation de la voie PI3K/AKT sont dépendants des RTK ou de mutations somatiques d'éléments spécifiques de la voie de signalisation. Des mutations sur les voies de signalisation adjacentes à la voie PI3K/AKT sont aussi possibles. Nous remarquons que les mutations sur la protéine RAS entraînent une activation accrue de la voie PI3K/AKT en plus de la voie des MAPK.

Nous pouvons aussi retrouver des altérations géniques de *PIK3CA* codant pour p110a qui consistent en des mutations somatiques et augmentent ainsi les niveaux d'expression de PIP3, l'activation d'AKT et la transformation des cellules (Bader, Kang, et Vogt 2006), notamment dans le cancer du côlon, du sein et de l'ovaire. Dans le mélanome, les mutations activatrices de *PIK3CA* sont rares et ne représentent que 1,5% des mélanomes (Curtin et al. 2006; Omholt et al. 2006).

AKT est l'une des kinases les plus activées dans les cancers humains, et permet de moduler la prolifération, le métabolisme, la survie, le caractère invasif et l'angiogenèse des cellules, conférant ainsi un avantage important pour les cellules cancéreuses. L'amplification des gènes *AKT1* et *AKT2* sont décrits dans les cancers gastriques, du pancréas et de l'ovaire. Dans le cas du mélanome, la mutation E17K sur *AKT3* a été identifiée dans le mélanome comme étant la première identification d'une mutation sur AKT3 dans le cancer, et d'une mutation sur AKT dans le mélanome (M. A. Davies et al. 2008). Dans notre équipe, nous avons montré que la production de la protéine SPARC active la voie PI3K/AKT et régule la survie dépendante de p53 et les propriétés invasives des cellules (Fenouille et al. 2011 et 2012). Les mutations de mTOR ont aussi une importance, puisqu'elles représentent 3 à 7% des mélanomes cutanés et sont un facteur de mauvais pronostic de survie des patients (Kong et al. 2016).

Comme nous l'avons vu, le principal régulateur négatif de cette voie est PTEN. Ainsi, la voie PI3K/AKT peut être hyper activée dans le mélanome par une perte de l'activité du suppresseur de tumeur PTEN. En effet, la perte d'expression de PTEN a été retrouvée dans environ 10 à 30% des mélanomes, conduisant à des niveaux d'activation d'AKT anormalement élevés et permettant un environnement tumoral favorable (H. Tsao et al. 1998).

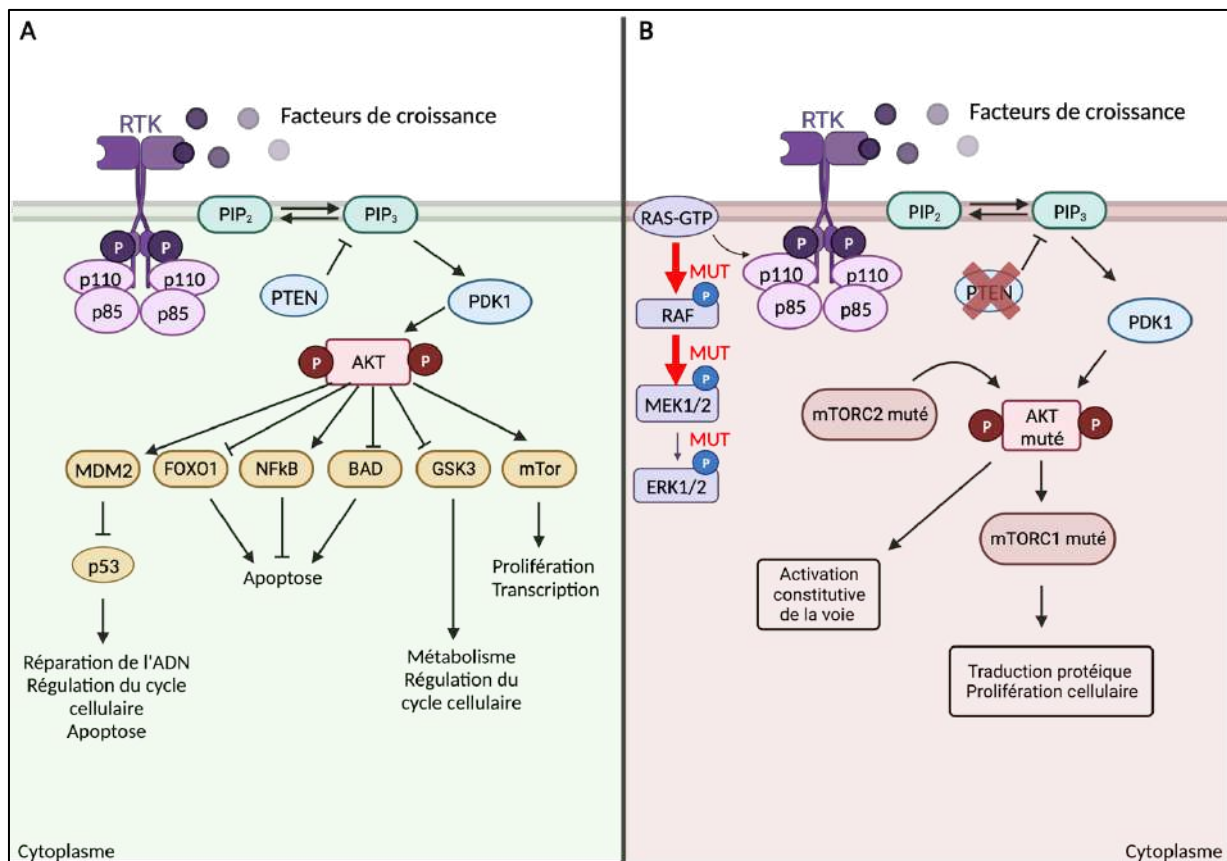


Figure 6 : La voie des PI3K/AKT en conditions physiologique et pathologique

En condition physiologique (à gauche), la liaison du ligand au RTK l'active, ce qui va lui permettre de recruter PI3K dans la membrane plasmique. PI3K est constitué d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110). Cette dernière convertit le PIP₂ en PIP₃ au niveau de la membrane, et représente des sites d'accueil pour AKT. La phosphorylation d'AKT possède un large éventail de cibles de signalisation en aval qui régulent le cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, le métabolisme du glucose, la croissance et la traduction. Dans le mélanome (à droite), nous retrouvons certaines mutations qui entraînent une activation constitutive de la signalisation PI3K-AKT favorisant ainsi l'initiation et la progression de la tumeur. Adapté de (Dantonio et al. 2018).

3. La voie NFkB :

L'activation de la voie NFkB a été décrite comme pouvant favoriser la progression tumorale du mélanome cutané (Richmond 2002). En effet, plusieurs chimiokines régulées par NFkB comme CXCL8, CXCL1, CCL5 ou CCL2 sont fortement exprimées dans le mélanome et favorisent la progression du mélanome par des boucles autocrines et paracrines. La surexpression de CXCL8 entraîne une croissance tumorale métastatique et, est associée au passage de la phase RGP à la phase VGP dans le mélanome (Leslie et Bar-Eli 2005). De façon intéressante, la voie NFkB peut interagir avec différentes voies de signalisation qui sont altérées dans le mélanome. Les mutations de NRAS et BRAF entraînent une activation constitutive de ERK qui peut réguler l'expression de cytokines et ainsi activer la voie NFkB (Norris et Baldwin 1999). De plus, la délétion de PTEN favorise une activation constitutive de la voie NFkB (Dhawan et al. 2002).

Dans l'équipe, nous avons mis en évidence que la glycoprotéine inflammatoire PTX3 est l'un des facteurs sécrétés par les cellules de mélanome de type invasif. La production autocrine de PXT3 entraîne l'activation de la voie de signalisation IKK/NFkB par le récepteur TLR4 afin de contrôler la migration et l'invasion tumorale (Rathore et al. 2019). Notre équipe a également montré que la voie NFkB non-canonique était impliquée dans la résistance thérapeutique des mélanomes via sa régulation par les récepteurs du collagène DDR1/2 (Berestjuk et al. 2022).

4. La voie YAP/TAZ :

Les coactivateurs transcriptionnels YAP/TAZ sont surexprimés dans de nombreux cancers solides, dont le mélanome cutané. Ils se lient entre-autres aux facteurs de transcription TEAD afin de favoriser la survie, la prolifération, la migration, l'invasion et les métastases des cellules de mélanome. L'activation de YAP/TAZ est aussi capable de conférer une résistance aux thérapies ciblées et immunothérapies (Girard et al. 2020; Lamar et al. 2012; Nallet-Staub et al. 2014; M. H. Kim et al. 2018; C.-K. Lee et al. 2019; L. Lin et al. 2015).

5. La voie du TGF- β :

Il existe trois isoformes de TGF- β qui partagent une similitude structurelle TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 et convergent vers les mêmes récepteurs transmembranaires de type I (T β RI) et de type 2 (T β RII) qui possèdent une activité sérine/thréonine kinase (Heldin et Moustakas 2016). La formation d'un complexe entre TGF- β et T β RII suivi de la liaison à T β RI entraîne l'activation de T β RI et la phosphorylation de SMAD2/3 qui se lient à SMAD4. La translocation au noyau de ce complexe permet la transcription de ses gènes cibles PAI-1 (Dennler et al. 1998) ou encore TMEPAI (Watanabe et al. 2010). La voie du TGF β est impliquée dans de nombreux processus importants pour la progression du mélanome cutané, et notamment dans l'acquisition des capacités invasives des cellules de mélanome, la réponse immunitaire anti-tumorale ou encore le remodelage tissulaire (Van Belle et al. 1996). Il est intéressant de noter que le TGF β a des rôles opposés selon le stade de la maladie. En effet, aux stades précoces, la voie du TGF β agit comme un suppresseur de tumeur par la stimulation de gènes pro-apoptotiques alors qu'aux stades plus tardifs, elle agit comme un promoteur de la croissance tumorale (Javelaud, Alexaki, et Mauviel 2008). Le TGF β est en effet connu pour induire une transition phénotypique des cellules de mélanome et favoriser l'acquisition de propriétés invasives par une surexpression de la métalloprotéase MMP9 et des intégrines β 1 et β 3 (Perrot, Javelaud, et Mauviel 2013). L'utilisation de l'inhibiteur de T β RI, SD-208 bloque la phosphorylation de SMAD3, l'invasion en matrigel des cellules de mélanome et réduit considérablement le nombre de métastases osseuses lorsqu'il est administré de manière systémique à des souris immunodéprimées avant l'inoculation de cellules de mélanome (Mohammad et al. 2011). Le TGF- β va aussi permettre de réprimer la réponse immunitaire anti-tumorale en inhibant par exemple la différenciation des lymphocytes T (LT), en augmentant le nombre de LT régulateurs, et en entraînant la différenciation des macrophages vers un phénotype M2 pro-tumoral (L. Yang, Pang, et Moses 2010). Enfin, le TGF- β a un rôle important dans le stroma tumoral puisqu'il va permettre de stimuler les fibroblastes à produire de la MEC dont nous verrons les impacts sur les cellules de mélanome par la suite (Berking et al. 2001).

IV. Hétérogénéité du mélanome :

L'hétérogénéité du mélanome est responsable du caractère agressif et récidiviste de ce cancer. Elle est définie par la présence de sous-populations cellulaires distinctes possédant différents comportements et caractérisées par des différences génomiques, épi-génomiques et protéomiques au sein de la même tumeur (intra-tumorale), entre les tumeurs de même type chez un patient (inter-tumorale) ou entre différents patients (inter-patient) qui ne présentent pas la même évolution de la maladie.

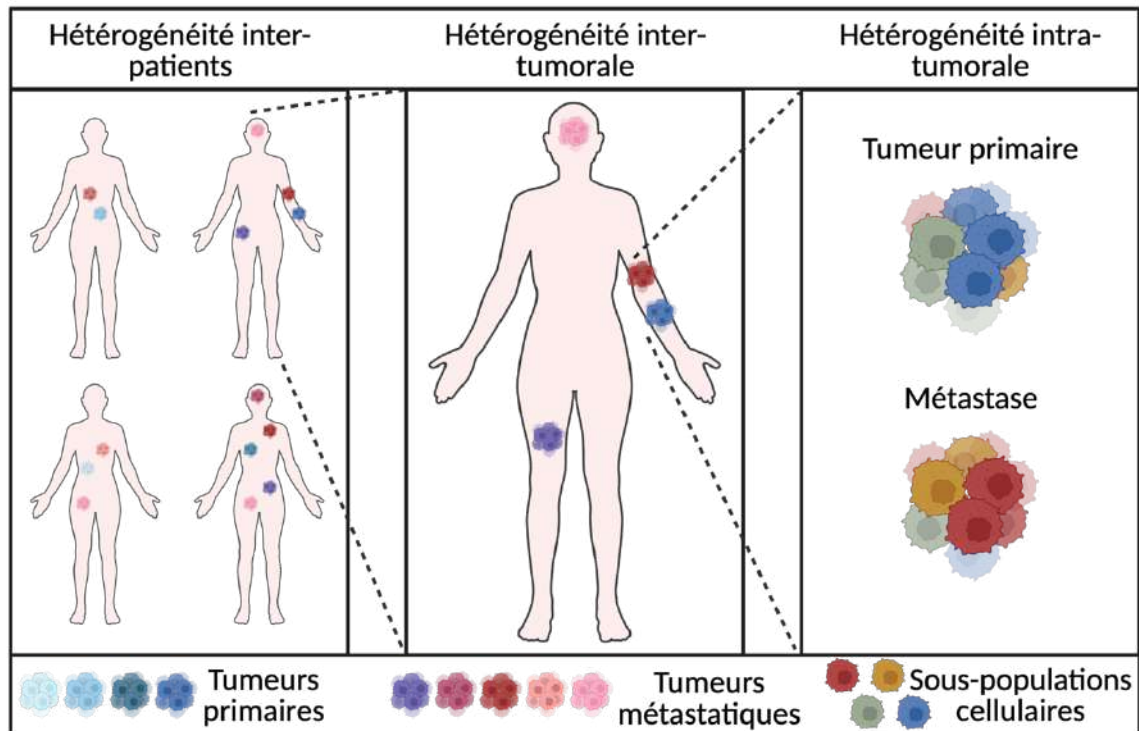


Figure 7 : Hétérogénéité du mélanome à différentes échelles

Les différences entre les cellules tumorales représentent une hétérogénéité intra-tumorale que nous avons représenté sur la partie droite du schéma. Les différences entre la tumeur primaire et la tumeur métastatiques constituent une hétérogénéité inter-tumorale. Enfin, à gauche du schéma, nous avons illustré l'hétérogénéité inter-patients qui est traduite par des différences entre les tumeurs de différents patients. Adapté de (Grzywa, Paskal, et Włodarski 2017).

Pour observer l'hétérogénéité tumorale, le mélanome reste l'un des meilleurs modèles. Plusieurs études ont montré des signatures différentes dans les mélanomes en phase radiale ou verticale (Haqq et al. 2005) et dans les métastases en comparaison à la tumeur primaire au niveau génétique avec l'apparition de nouvelles mutations, ou au niveau phénotypique (Harbst et al. 2014). En intra-tumoral, nous pouvons observer des différences dans les profils d'expression géniques de biopsies de patients avant un traitement, pendant un traitement ou au moment d'une rechute (Johannessen et al. 2013).

Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire l'hétérogénéité tumorale : le modèle d'hétérogénéité intra-tumorale génétique, les cellules souches et la plasticité cellulaire. L'ITH génétique peut survenir à la suite d'erreurs de réplication, d'une mutagenèse induite par les UV, d'une réparation inefficace des dommages à l'ADN, de l'altération des télomères ou de défauts de ségrégation des chromosomes (Jeggo, Pearl, et Carr 2016). Cela va entraîner des mutations génétiques qui contribuent à l'acquisition d'un phénotype malin. Une forte ITH génétique est un facteur de mauvais pronostic de survie chez les patients puisque cela implique que la tumeur est plus susceptible de présenter de rares sous-clones préexistants dont la sélection va tendre vers ceux dotés d'une capacité à former des métastases ou à présenter une résistance au traitement importante

(Samra Turajlic et al. 2019). Il est important de noter que ces changements génétiques responsables de cette ITH sont irréversibles et non adaptatifs (Shackleton 2010). Ainsi, une même variante génétique peut être avantageuse ou désavantageuse pour la cellule cancéreuse, en fonction du contexte dans laquelle elle se trouve (McGranahan et Swanton 2015). De plus en plus de preuves suggèrent que, bien qu'importante, l'ITH génétique semble insuffisante pour expliquer l'émergence de la résistance au traitement et la biologie de la progression du cancer, y compris le processus de dissémination métastatique (Rambow, Marine, et Goding 2019).

Concernant le modèle des cellules souches, une petite fraction de cellules définies comme étant les « cellules souches cancéreuses » sont dotées d'une capacité d'auto-renouvellement afin d'agir comme un moteur la progression tumorale et de maintenir la tumeur en générant les différents sous-types cellulaires qui la composent. Ces cellules peuvent se différencier en « cellules cancéreuses non-souches » qui sont non tumorigène, via l'acquisition de modifications épigénétiques stables, et constituent une grande partie de la tumeur.

Ces deux modèles présentent des changements moléculaires de nature unidirectionnelle et irréversible conduisant à une hétérogénéité tumorale. Le troisième modèle alternatif est la « plasticité cellulaire » qui suggère que les cellules tumorales ont un comportement phénotypique et fonctionnel différent et peuvent ainsi se déplacer dynamiquement entre les différents programmes de transcription (Ahmed et Haass 2018).

A. Plasticité phénotypique :

La plasticité phénotypique est un mécanisme qui conduit à une ITH non-génétique importante qui met en place des réponses adaptatives pour faire face aux différents signaux et stress du microenvironnement tumoral. Ce processus va être régulé par un équilibre entre l'expression et l'activité de différents régulateurs principaux afin d'adapter le répertoire d'expression génique des cellules en réponse aux changements perçus dans le microenvironnement et de manière réversible (Rambow, Marine, et Goding 2019). Grâce à cette transition, les cellules vont pouvoir passer d'un phénotype prolifératif à un phénotype invasif et inversement en passant par différents phénotypes intermédiaires grâce à l'acquisition de modifications transcriptionnelles.

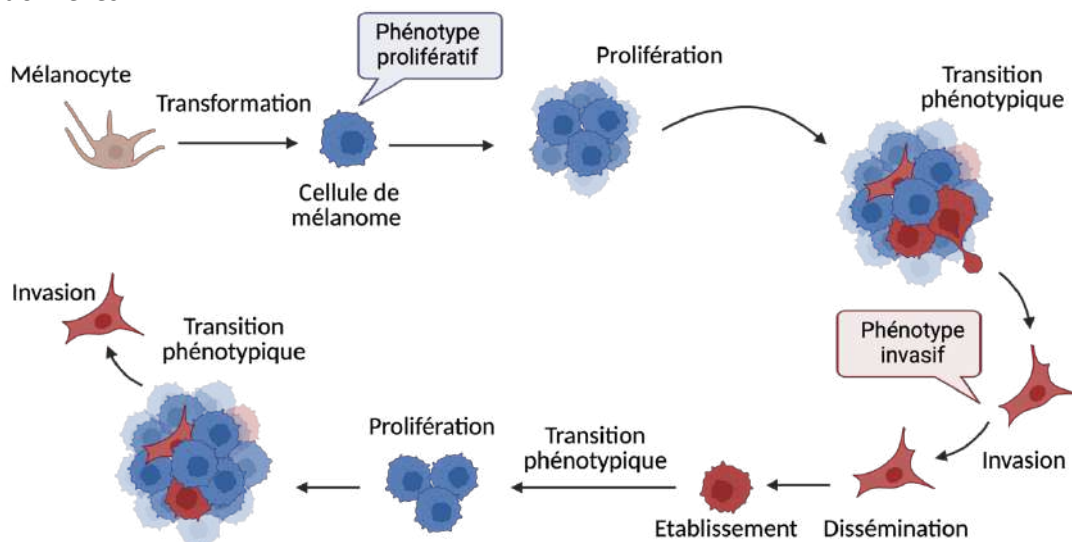


Figure 8 : Plasticité phénotypique dans la progression du mélanome

Dans le modèle de « transition phénotypique », le phénotype prolifératif détermine la croissance initiale de la tumeur. Le passage à un phénotype invasif établit quant à lui des cellules capables d'envahir le derme et de disséminer dans les différents organes. Au site métastatique, un retour au phénotype prolifératif doit se produire afin de favoriser la croissance de la tumeur secondaire. Les cellules tumorales peuvent ainsi subir plusieurs transitions phénotypiques au cours de leur progression, afin de s'adapter aux besoins de la tumeur. Adapté de (Arozarena et Wellbrock 2019).

Cette transition va se mettre en place aux différents stades de la progression tumorale. À savoir, dès la tumeur primaire, la transition phénotypique va permettre aux cellules d'acquérir des capacités invasives afin de former des métastases et de disséminer dans différents organes. Au niveau des métastases, la transition phénotypique va permettre aux cellules de s'établir dans le nouvel organe colonisé via une prolifération accrue. Par une nouvelle transition phénotypique, les cellules de l'organe à distance pourront à nouveau exprimer des marqueurs favorisant l'invasion pour former de nouvelles métastases. Cette capacité de transiter entre différents états phénotypiques confère aux cellules de mélanome des avantages importants d'adaptation rapide aux différents stress. Il est d'ailleurs tout aussi important que cette adaptation rapide puisse être graduée. Différents niveaux de signaux de stress nécessitent en effet différents niveaux de l'altération de l'expression génique. En réponse à un stress modéré, nous retrouvons des altérations transcriptomiques à court terme via une activation de facteurs de transcription importants pour le maintien d'un phénotype spécifique. Lors d'un stress soutenu, une adaptation plus profonde peut se mettre en place entraînant des modifications transcriptomiques radicales et la stabilisation d'un état cellulaire spécifique à la suite de remodelage épigénétique ou de boucles de rétroaction positive (Brandman et Meyer 2008).

La plasticité phénotypique possède de nombreuses similitudes avec la TEM. Cependant, ce terme n'est pas approprié pour le mélanome car les mélanocytes ne sont pas des cellules épithéliales et le phénotype invasif que les cellules peuvent adopter après une transition phénotypique peut être différent du phénotype mésenchymateux. C'est ainsi que le terme de « changement phénotypique » introduit pour la première fois en 2008 par Hoek *et al*, semble plus approprié pour décrire les transitions entre n'importe quels états phénotypiques, au lieu d'indiquer un changement directionnel entre deux états prédéfinis (Hoek et al. 2008).

B. Marqueurs de plasticité

La plasticité cellulaire du mélanome a été décrite dans les années 1980 (Fidler et al. 1981; Bennett 1983) mais la caractérisation moléculaire des différents états phénotypiques a été affinée grâce au clonage du gène *MITF*. Il a été isolé sur la base que son inactivation entraînait une perte des cellules pigmentaires en développement (Hodgkinson et al. 1993; Hughes et al. 1994) mais s'est très vite révélé comme étant un régulateur clé des gènes impliqués dans la mélanogenèse et sa fonction principale est associée à la différenciation des mélanocytes (Goding 2000; Cheli et al. 2010). Dans le mélanome, MITF est connu pour réguler des gènes impliqués dans la différenciation (Dooley et al. 1988; R. E. Wilson, Dooley, et Hart 1989), la survie (McGill et al. 2002), le contrôle du cycle cellulaire (Carreira et al. 2005), l'invasion (Carreira et al. 2006; Cheli et al. 2011; 2012), l'autophagie (Möller et al. 2019), et la sénescence (Giuliano et al. 2010).

Le rôle de MITF dans la régulation de la prolifération était contradictoire selon les études qui le décrivaient. Certains groupes ont en effet révélé un rôle pro-prolifératif de MITF (Garraway et al. 2005) alors que d'autres études ont suggéré que MITF inhibe la progression du cycle cellulaire et favorise un arrêt de cycle associé à une différenciation (Carreira et al. 2005). En réalité, le modèle du rhéostat de MITF traduit que de faibles niveaux de MITF sont associés à un cycle lent et un caractère invasif des cellules. En revanche, l'expression de MITF entraîne une importante prolifération, et de faibles capacités invasives, alors qu'une augmentation encore plus accrue de l'expression de MITF induit un arrêt de cycle en phase G1 et la différenciation cellulaire (Carreira et al. 2006).

La même année, l'étude de Hoek *et al* a permis d'associer des phénotypes cellulaires spécifiques à des profils d'expression génique dans le mélanome (Hoek et al. 2006). Ils ont pu identifier trois cohortes de lignées cellulaires de mélanome. La cohorte A est caractérisée par une expression importante du facteur de transcription MITF, un taux de prolifération élevée et de faibles capacités invasives. La cohorte C est caractérisée par une faible expression de MITF, une faible prolifération et de fortes capacités invasives. La cohorte B représente quant à elle, un phénotype intermédiaire entre les cellules de type prolifératives et les cellules de type invasives.

En plus de l'expression de MITF, d'autres marqueurs ont été identifiés pour caractériser le phénotype des cellules de mélanome. En effet, les premières preuves d'une transition phénotypique avaient d'ores et déjà

révélées deux signatures transcriptionnelles différentes par analyse transcriptomique de lignées de mélanome ou de biopsies de patients. Ils ont pu identifier un groupe de gènes liés aux marqueurs mélanocytaires Endothelin receptor type B (EDNRB) et Melan-A (MLANA) pour le phénotype prolifératif et pour le phénotype invasif, ils ont retrouvé WNT5A et AXL (Bittner et al. 2000). D'autres études ont d'ailleurs confirmé que WNT5A et AXL étaient des marqueurs du phénotype invasif et ont proposé MITF comme marqueur du phénotype prolifératif (Widmer et al. 2012). Une autre étude a permis d'identifier une signature proliférative caractérisée par l'expression de MITF et SOX10 et une signature invasive régie par AP1-TEAD (Verfaillie et al. 2015).

Les facteurs de transcription ZEB1 et ZEB2 sont des marqueurs liés à la TEM, mais jouent aussi un rôle dans la transition phénotypique du mélanome cutané. ZEB2 favorise la prolifération et l'expansion tandis qu'il inhibe l'invasion des cellules. À l'inverse, ZEB1 est associé au phénotype invasif. Il a été rapporté que ZEB2 est nécessaire pour la croissance de la tumeur primaire mais aussi des métastases sur les sites secondaires. Les cellules de mélanome qui subissent une transition phénotypique pour acquérir des capacités invasives voient une diminution de l'expression de ZEB2 au profit de celle de ZEB1. Par conséquent, une commutation entre ZEB2/ZEB1 est nécessaire *in vivo* pour un gain d'invasivité et de dissémination métastatique (Caramel et al. 2013; Vandamme et al. 2020).

Ces dernières années, les analyses d'expression génique à l'échelle de la cellule unique ont permis de proposer un nouveau modèle concernant les transitions phénotypiques des cellules de mélanome et de définir des états supplémentaires dans le mélanome. Le modèle de Hoek *et al*, qui propose différentes cohortes A, B et C a été élargi. Les cellules de mélanome peuvent ainsi être catégorisées dans quatre différents groupes en fonction de leur signature transcriptomique et de leur comportement. Les classes C1 et C2 sont respectivement nommées « undifferentiated » et « neural crest-like » et correspondent à la cohorte C invasive et présentant une faible expression du facteur de différenciation mélanocytaire MITF. Ces deux classes peuvent être différenciées par l'expression des facteurs SOX9 et SOX10 respectivement exprimés dans les sous populations C1 et C2 et sont décrites sensibles à la ferroptose. La classe C4 est définie comme étant « melanocytic ». Il s'agit de la classe la plus différenciée qui correspond à la cohorte A de la précédente nomenclature en raison de la forte expression de MITF. La classe C3 est une classe intermédiaires « transitory » entre les classes C1/C2 et la classe C4 et peut rappeler la cohorte B (Tsoi et al. 2018).

En combinant les profils d'accessibilité à la chromatine et les analyses en cellule unique de mélanome de patients, les réseaux de régulations géniques ont pu être identifiés en fonction du phénotype différencié, transitoires, ou dédifférencié des cellules de mélanome. Les « enhancers » actifs dans les cellules mélanocytaires sont les mêmes que ceux activés dans les mélanocytes tandis que ceux des cellules dédifférenciées sont similaires à ceux des fibroblastes de peau (Verfaillie et al. 2015). Ce changement dans la chromatine est associé à une modification des histones. Dans les cellules prolifératives, nous retrouvons par exemple la modification H3K27ac activatrice, permettant au promoteur de SOX10 d'être actif. Dans les cellules possédant de fortes capacités invasives, le promoteur de SOX10 porte une modification inhibitrice H3K27me. Le phénotype intermédiaire est caractérisé par un niveau d'expression intermédiaire de MITF, un phénotype migratoire léger, et un état de chromatine différent, et est régulé par différents facteurs de transcription comme SOX6, NFATC2 et EGR3 (Wouters et al. 2020).

Pour approfondir les connaissances sur la transition phénotypique du mélanome, une étude s'est basée sur une analyse en cellule unique appliquée sur des cellules de mélanomes isolées à partir d'un modèle de xénogreffes de cellules de patients traitées aux thérapies ciblées. Pour la première fois, nous pouvons suivre la trajectoire que prennent les cellules face à un stress du microenvironnement (Rambow et al. 2018). Dans les lésions naïves, ils ont pu identifier trois sous-types cellulaires : prolifératif, invasif et semblable à la crête neurale. Ces deux derniers états se chevauchent et présentent tous deux une faible expression MITF, un remodelage de la MEC et des propriétés invasives, bien qu'ils soient distincts. En effet, les cellules invasives n'expriment pas SOX10 tandis que les cellules NCSC (neural crest stem cell) ont un programme transcriptionnel piloté par SOX10/SOX2, NFAP2B et RXRG. En raison de la perte de plusieurs marqueurs mélanocytaires dont MITF et SOX10, les cellules invasives sont appelées « cellules indifférenciées ». Les cellules indifférenciées et NCSC rappellent respectivement les états C1 et C2 de l'étude de Tsoi *et al*. Le sous-type NCSC est similaire à la population à cycle lent exprimant de faible niveau de NGFR (Fallahi-Sichani et al.

2017). Ce récepteur des neutrophines a un rôle important dans la transition phénotypique par les modifications dynamiques de son expression. Grâce à un modèle murin NGFR inducible, nous savons que la forte expression de NGFR est importante pour l'acquisition d'un phénotype invasif, mais que sa désactivation est aussi nécessaire aux cellules pour retrouver leurs propriétés prolifératives et permettre aux métastases de bien s'établir une fois présentes sur les organes distants (Restivo et al. 2017).

Après traitements aux inhibiteurs de la voie des MAPK, certains états décrits par Rambow *et al*, ont été enrichis, notamment les états invasifs et NCSC. De façon intéressante, d'autres états définis comme pigmentés ou SMC ("starved"-like melanoma cells) ont émergé. L'état phénotypique SMC présente des caractéristiques géniques de cellules privées de nutriments, avec une expression intermédiaire de MITF, des capacités prolifératives et invasives simultanées et une forte expression de la translocase d'acide gras CD36. Ces cellules ont d'ailleurs une localisation préférentielle dans des régions de tumeurs éloignées des vaisseaux sanguins, et ainsi loin des sources de nutriments. Cela conforte l'idée que les signaux et stress du microenvironnement influent et façonnent les états phénotypiques du mélanome (Rambow, Marine, et Goding 2019). La contribution de l'hétérogénéité tumorale dans la résistance aux thérapies sera discutée dans la suite de ce manuscrit au chapitre II.

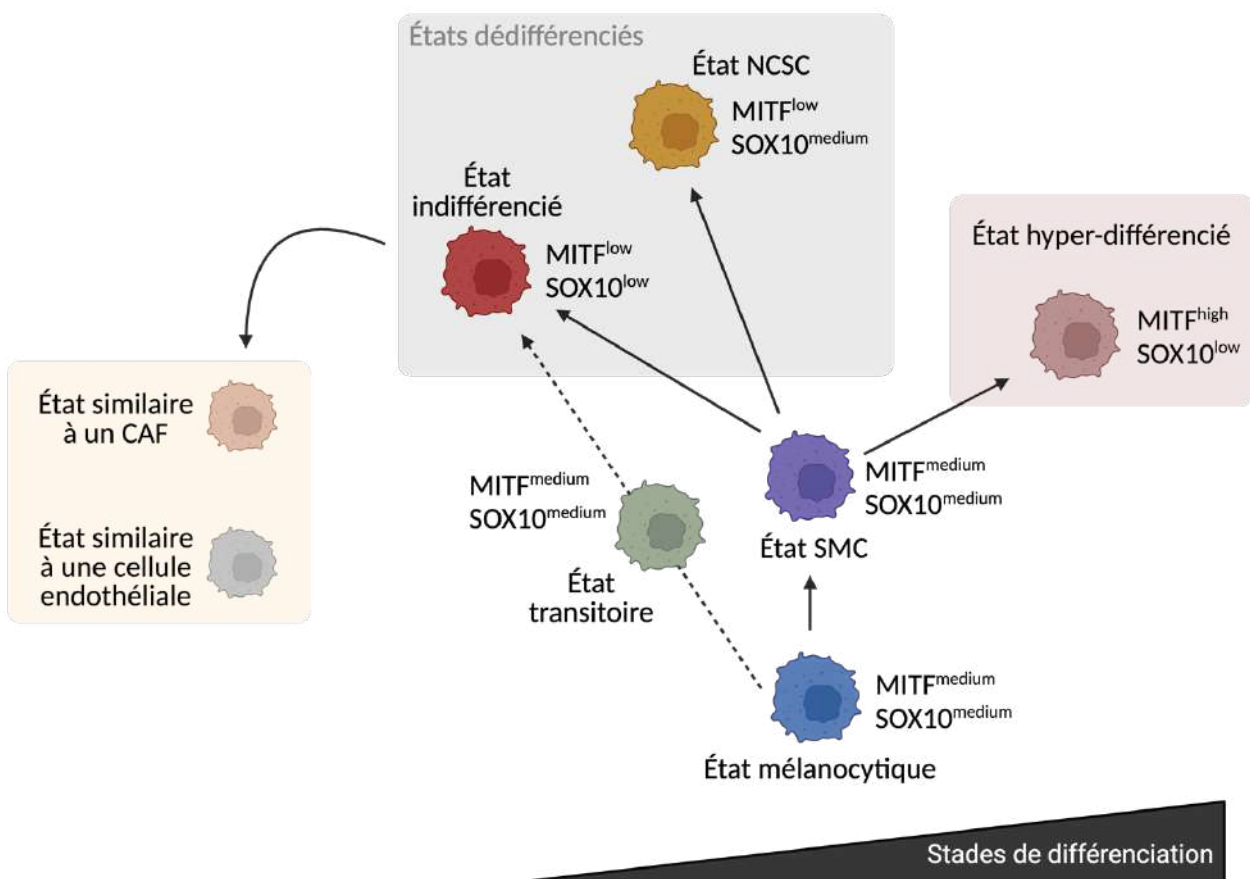


Figure 9 : Les différents états phénotypiques des cellules de mélanome

Schéma illustrant la disposition hiérarchique potentielle des six états phénotypiques différents du mélanome cutané et leur expression relative de MITF et SOX10. Les états semblables aux CAF et aux cellules endothéliales sont également indiqués puisque ces états pourraient être générés par une transdifférenciation des cellules à partir de leur état indifférencié. CAF : Cancer associated fibroblast, SMC : starved melanoma cell, NCSC : neural crest cell like. Adapté de (Rambow, Marine, et Goding 2019).

C. Induction de la plasticité

La transition phénotypique peut avoir lieu à la suite d'altérations génétiques et épigénétiques au sein de la cellule. Dans certains cas, de nombreux signaux et stress provenant du microenvironnement tumoral influencent la plasticité des cellules qui s'adaptent et peuvent en retour remodeler le stroma tumoral par leurs interactions ou la sécrétion de différents facteurs. Il a été démontré qu'une grande variété de stress tels que l'hypoxie, la privation de nutriments consistant en une faible teneur en glucose, une limitation des acides aminés, les stimuli inflammatoires et les facteurs de croissance tels que le TGF β influent sur la transition phénotypique et peuvent entraîner une diminution de l'expression de MITF et favoriser l'acquisition de propriétés invasives.

Les différentes conditions physiologiques du microenvironnement peuvent être altérées notamment par les différentes cellules et facteurs qui s'y trouvent, modulant la disponibilité de l'oxygène et des nutriments. A certains endroits de la tumeur, et par exemple au niveau de certains vaisseaux sanguins non-fonctionnels, l'hypoxie est augmentée et entraîne une transition phénotypique des cellules de mélanome vers un phénotype dédifférencié, moins prolifératif (Cheli et al. 2012; Feige et al. 2011; Louphrasitthiphol et al. 2019). Ces cellules consomment moins d'oxygène et peuvent ainsi mieux résister à un environnement hypoxique. La plasticité cellulaire permet ainsi aux cellules de s'adapter aux mieux à leur environnement et ainsi leur conférer des avantages de survie. La consommation en oxygène est directement liée à des processus intracellulaires de production d'énergie à partir de nutriments. La disponibilité des nutriments est ainsi un signal limitant pouvant influencer la plasticité des cellules de mélanome. En effet, la restriction de la disponibilité du glucose conduit à une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une augmentation de l'expression d'ATF4 connu pour réprimer l'expression de MITF (Ferguson et al. 2017). Une restriction en glutamine entraîne elle aussi une transition vers un phénotype invasif caractérisé par la perte de l'expression de MITF (Falletta et al. 2017). De la même manière, les changements métaboliques des cellules au sein d'une tumeur peuvent influencer certains paramètres physiologiques comme l'acidité du milieu. Ainsi, un pH plus bas à 6,7 est suffisant pour induire un phénotype quiescent des cellules. L'acidose extracellulaire déclenche une activation de l'expression d'ATF4, entraînant une répression du facteur MITF et active l'expression du récepteur à tyrosine kinase AXL (Böhme et Bosserhoff 2020).

La transition phénotypique peut aussi être induite par un contact direct avec les cellules du microenvironnement dont nous expliquerons la composition dans le chapitre 3. Les fibroblastes associés au cancer (CAF) peuvent en effet entraîner l'acquisition d'un phénotype invasif dans les cellules de mélanome ce qui a été mis en évidence par des expériences de co-culture (Seip et al. 2016). De plus, le TGF β sécrété par les CAF stimule la coopération entre YAP et TEAD/SMAD, ce qui supprime l'expression de MITF et favorise un phénotype dédifférencié (Miskolczi et al. 2018). Enfin, l'inflammation peut aussi favoriser la plasticité phénotypique du mélanome. Il a été montré que les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α provoquent une suppression progressive de l'expression de MITF par le facteur c-JUN. Il est intéressant de noter que MITF peut lui-même se lier à la région promotrice régulatrice de c-JUN, et que la diminution de MITF entraîne ainsi une sur expression de cet oncogène pouvant à son tour influencer sur la stimulation de cytokines (Riesenberg et al. 2015).

Paradoxalement, les thérapies ciblées contre le mélanome sont capables d'induire une transition phénotypique des cellules vers un phénotype dédifférencié, tolérant au traitement et peu prolifératif (Tsoi et al. 2018). Plus précisément, le traitement aux inhibiteurs de la voie des MAPK est capable d'induire une augmentation des propriétés invasives des cellules de mélanome ainsi qu'une réorganisation de leur cytosquelette d'actine (Kim et al. 2016) et une remodelage de la MEC modulé par l'augmentation de l'expression de nombreuses protéines matricielles (Girard et al. 2020; Lecacheur et al. 2020; Diazi et al. 2022; Diazi, Tartare-Deckert, et Deckert 2020; Sandri et al. 2016; Marusak et al. 2020). En effet, nous avons récemment montré dans l'équipe que la transition phénotypique induite en réponse à l'inhibition de la voie des MAPK par les thérapies ciblées est médiée par l'activation du cluster de FibromiR miR-143/-145 inhibant la FASCIN1. Nous avons également pu démontrer que la surexpression de la FASCIN1 dans des cellules de type dédifférencié est suffisante pour moduler la plasticité phénotypique et permettre aux cellules de transiter à nouveau vers un phénotype mélanocytaire prolifératif (Diazi et al. 2022).

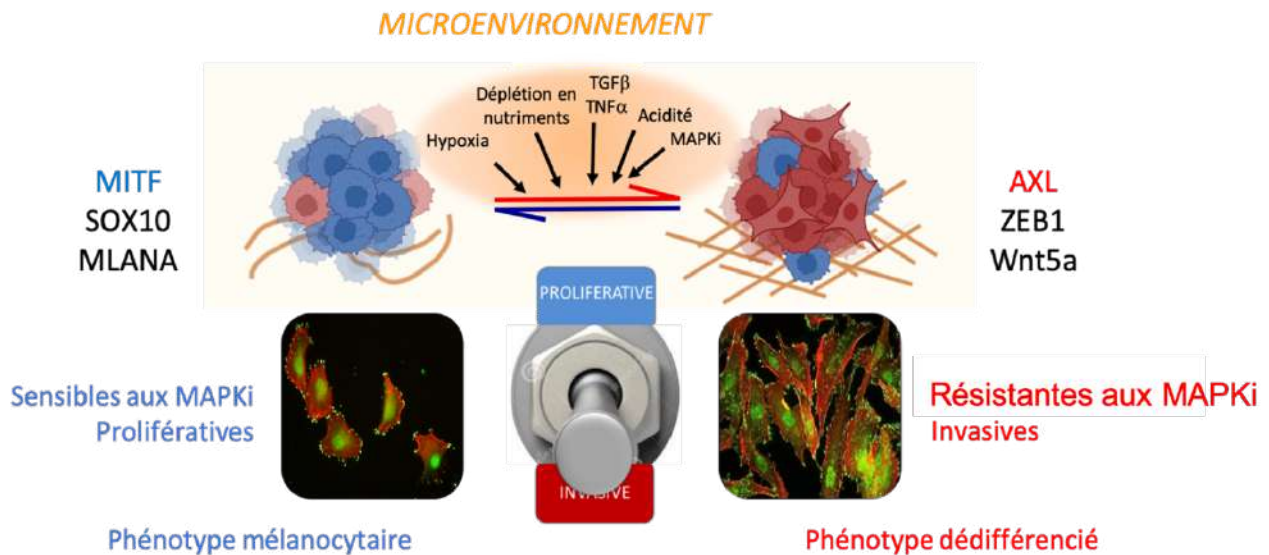


Figure 10 : Marqueurs et inducteurs de la transition phénotypique

Schéma simplifiant le phénomène de transition phénotypique dans le mélanome cutané. Comme nous l'avons vu, ce processus permet aux cellules de se reprogrammer vers différents phénotypes, ce qui leur confère des propriétés particulières pour s'adapter à leur environnement. Nous simplifions ici la transition phénotypique comme étant le passage réversible d'un état prolifératif à un état invasif. L'état prolifératif correspond aux cellules différenciées avec des marqueurs mélanocytaires de la pigmentation comme MITF, SOX10 ou MLANA. Le phénotype invasif qualifie les cellules dédifférenciées avec l'expression de marqueurs mésenchymateux comme AXL, WNT5A ou ZEB1. Ce phénotype est associé à une plus grande résistance aux traitements et à une production accrue de MEC. Différents facteurs extrinsèques du microenvironnement peuvent induire cette transition comme des facteurs sécrétés (TGFβ ou TNFα), la carence en nutriment, l'hypoxie ou les inhibiteurs de BRAF. Cette plasticité phénotypique fait partie des processus d'échappement thérapeutique du mélanome.

Pour résumer, les différentes études menées sur l'identification et la caractérisation des différents états cellulaires dans le mélanome ont permis de mettre en évidence au moins six phénotypes cellulaires différents qui peuvent émerger au cours de la progression du mélanome. Nous retrouvons ainsi un état hyper différencié présentant une très forte expression de MITF, un état mélanocytaire très prolifératif exprimant MITF, un état intermédiaire avec des capacités invasives et prolifératives simultanées, un état induit par la déprivation en nutriment, un état proche des cellules souches de la crête neurale et un état dédifférencié, tous deux n'exprimant plus le facteur de transcription MITF. Ces différents états traduisent la forte hétérogénéité des cellules de mélanome et leur capacité remarquable d'adaptation aux différents signaux du microenvironnement, favorisant ainsi leur survie.

Chapitre II : Le traitement du mélanome cutané

I. Prise en charge clinique

Afin de lutter contre le développement d'un cancer, la meilleure arme reste la prévention et le dépistage précoce de celui-ci. En effet, dans le cadre du mélanome, la détection de ce cancer à un stade précoce, lorsqu'il est toujours localisé dans l'épiderme (stade 0), assure un excellent pronostic de survie avec un taux de survie à 5 ans de 98,4%. Le traitement de référence pour ces mélanomes localisés est l'exérèse chirurgicale qui consiste en l'excision de la zone concernée par la croissance tumorale, et d'une quantité supplémentaire de tissus environnants afin de limiter les risques de récives. Ces marges, requises pour l'exérèse chirurgicale, sont définies par l'épaisseur de Breslow que nous avons vu précédemment. Pour les mélanomes diagnostiqués aux stades I et II, l'exérèse chirurgicale reste encore la meilleure option thérapeutique où elle peut être associée à une biopsie des ganglions lymphatiques sentinelles et à leur excision. Notons qu'au stade II, les patients peuvent nécessiter d'un traitement adjuvant en plus de la chirurgie. Les stratégies de traitement se compliquent en effet lorsque le mélanome commence à envahir le derme. Au stade III, une chirurgie peut être envisagée si la tumeur est résécable. À ce stade, des thérapies adjuvantes ou néo-adjuvantes sont administrées. Les thérapies néo-adjuvantes font références aux traitements qui sont proposés avant l'intervention chirurgicale pour réduire la tumeur et faciliter son excision, tandis que les thérapies adjuvantes commencent après la chirurgie pour diminuer les risques de récives et comprennent aujourd'hui les thérapies ciblées et les immunothérapies. Aux stades non résécables III et IV, les patients sont traités par des thérapies adjuvantes en fonction de la composition génétique du mélanome. À ces stades, la tumeur a envahi le derme et forme des métastases, ce qui représente un mauvais pronostic de survie des patients. En effet, lorsqu'il est diagnostiqué à un stade tardif, le taux de survie des patients est d'environ 15%.

Jusqu'en 2011, le traitement de référence pour les patients atteints d'un mélanome était la chimiothérapie conventionnelle avec l'administration d'agents alkylants qui inhibent la synthèse d'ADN entraînant l'arrêt de la prolifération cellulaire. Le principal agent chimio thérapeutique utilisé, la Dacarbazine, n'a donné des réponses positives que chez 10 à 15% des patients (Eggermont et Kirkwood 2004; Lui et al. 2007; Bhatia, Tykodi, et Thompson 2009) et présentait une toxicité et des effets secondaires assez importants pour les patients. Ces dernières années, la découverte des mutations initiatrices du mélanome et les avancées faites sur les mécanismes favorisant l'évasion tumorale et le contrôle immunitaire, ont permis de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques révolutionnaires dans la prise en charge du mélanome cutané. Nous retrouvons des thérapies ciblant la voie des MAPK (les thérapies ciblées) et les immunothérapies. Le traitement proposé dépend fortement du statut mutationnel de BRAF chez les patients à un stade avancé et non résécable, ainsi que de la rapidité à laquelle la maladie progresse. Les patients présentant une mutation sur BRAF peuvent être traités en première ligne préférentiellement par une combinaison d'inhibiteurs de BRAF muté et MEK si une réponse précoce est nécessaire. Dans le cas où les patients mutés BRAF présentent une croissance lente de leur tumeur, ils peuvent être traités en première ligne par les immunothérapies qui fournissent une réponse plus lente mais plus durable (Bai et Flaherty 2021).

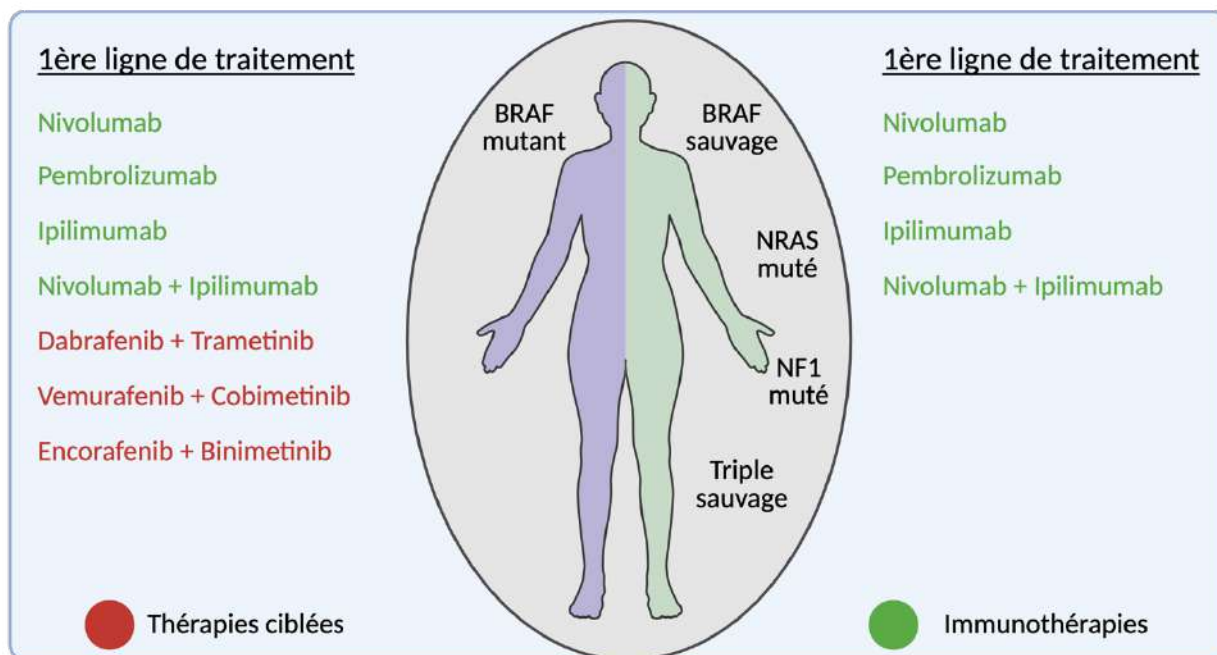


Figure 11 : Options de traitement approuvées pour les patients atteints d'un mélanome métastatique

Le choix de traitement dans le cadre du mélanome dépend du statut mutationnel des patients et de la vitesse à laquelle la maladie progresse. Les patients atteints d'un mélanome muté sur BRAF peuvent recevoir un traitement aux thérapies ciblées ou aux immunothérapies en première intention, en sachant que les BRAFi sont préférentiellement utilisés lorsqu'il est nécessaire d'obtenir une réponse rapide. Les patients atteints d'un mélanome de type BRAF sauvage sont traités par les immunothérapies. Les patients qui ne répondent pas aux BRAFi en première intention peuvent recevoir des immunothérapies en deuxième intention et inversement. Enfin, certains agents chimio-thérapeutiques comme la Dacarbazine ou le Temozolimide peuvent être administrés aux patients en seconde intention. Adapté de (Kozar et al. 2019).

A. Les thérapies ciblées

Les inhibiteurs de BRAF :

La mutation BRAFV600 est la mutation la plus courante dans le mélanome et a permis de développer de nouvelles stratégies de traitements prometteuses et révolutionnaires pour la prise en charge des mélanomes avancés. Comme nous l'avons vu, la mutation BRAF est une mutation somatique qui entraîne un gain de fonction, et conduit à la sur-activation de l'effecteur MEK en aval, et rend BRAF indépendant de la signalisation en amont RAS. Pour le traitement du cancer, deux classes d'inhibiteurs de BRAF ont été développées. La première comprend des inhibiteurs à large spectre qui affectent d'autres kinases en plus de BRAF alors que la seconde comprend des inhibiteurs sélectifs de BRAF. Ces inhibiteurs sont des compétiteurs réversibles de l'ATP. Ils se lient au domaine actif de BRAF et bloquent l'accès de l'ATP au domaine kinase, inhibant ainsi la transduction du signal entre BRAF et la kinase MEK en aval (Waizenegger et al. 2016; Lorentzen 2019). Dans le mélanome, le premier inhibiteur testé a été le Sorafenib qui est un inhibiteur appartenant à la première classe, dirigé contre CRAF. Malgré de bons résultats pré-cliniques, cet inhibiteur n'a pas présenté d'effets cliniques notables (Ott et al. 2010; Eisen et al. 2006).

En 2011, le Vémurafenib est le premier inhibiteur de BRAF qui obtient une autorisation de mise sur le marché (AMM) suivi du Dabrafenib, un autre inhibiteur de cette molécule, en 2013, pour les patients atteints d'un mélanome de stade avancé et présentant une mutation BRAFV600. Le Vémurafenib cible en effet les mutations BRAFV600E, BRAFV600K, BRAFV600D et RAFV600L et le Dabrafenib cible les mutations BRAFV600E et BRAFV600K. Les essais cliniques de phase I à III ont montré des réponses cliniques intéressantes avec notamment des réponses globales de 80%, une durée médiane sans progression de 6,8 mois, et une survie globale moyenne de 15,8 mois avec le Vémurafenib (Flaherty et al. 2010; Sosman et al. 2012). Par rapport à l'agent de chimiothérapie traditionnellement utilisé la Dacarbazine, les deux inhibiteurs présentent une meilleure efficacité avec une meilleure survie globale, et une augmentation de la survie sans progression de la maladie. En effet, la survie sans progression des patients est à 6,9 mois lorsqu'ils sont traités avec le Vémurafenib, contre 1,6 mois pour le groupe traité avec la Dacarbazine selon l'essai clinique de phase III BRIM-3 (Chapman et al. 2011). D'après l'essai clinique BREAK-3, Les patients traités avec le Dabrafenib ont une survie sans progression de 5,1 mois contre 2,5 mois pour la Dacarbazine. Bien que les thérapies ciblées représentent une avancée spectaculaire dans la prise en charge des patients atteints de mélanome, elles s'accompagnent d'effets secondaires que l'on peut retrouver chez certains patients. Malheureusement, il a été montré que le principal effet secondaire observé lors du traitement avec les inhibiteurs de BRAF est le développement de cancers induits par RAS comme la leucémie, le cancer du côlon ou le carcinome épidermoïde causé par l'activation paradoxale de CRAF en réponse aux thérapies (Chapman et al. 2011; McArthur et al. 2014). Les autres effets indésirables peuvent comprendre des éruptions cutanées, des arthralgies, des réactions de photosensibilité, des anomalies hépatiques, une neutropénie, et de la fatigue (Ho et Tsao 2015).

Malgré l'efficacité rapide et importante de ces inhibiteurs, nous retrouvons environ 20% des patients qui ne répondent pas au traitement (résistance innée) et la majorité des réponses observées sont transitoires. En effet, au bout de six mois de traitements, les tumeurs développent des résistances acquises aux thérapies ciblées (Griffin et al. 2017; Villanueva, Vultur, et Herlyn 2011; Torres-Collado, Knott, et Jazirehi 2018). Nous développerons les mécanismes de résistance aux thérapies mis en place par les cellules de mélanome dans la partie IIb, ce qui représente le principal enjeu de la prise en charge thérapeutique des patients. Enfin, il est intéressant de noter que différentes stratégies d'administration du traitement ont été envisagées avec notamment une administration discontinue afin d'empêcher l'accoutumance des cellules de mélanomes aux thérapies ciblées et permettre des réponses plus durables (Das Thakur et al. 2013).

La combothérapie : inhibiteurs de BRAFV600 et inhibiteurs de MEK :

Dans la voie des MAPK, les kinases MEK1 et MEK2 sont les seuls effecteurs en aval de BRAF et représentent ainsi une cible intéressante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces. En 2013, l'inhibiteur allostérique réversible de MEK1/2 appelé Trametinib est autorisé sur le marché et des essais cliniques ont d'abord montré son efficacité seul, sur les patients atteints de mélanome. Par rapport aux chimiothérapies traditionnelles, l'utilisation du Trametinib seul montre une amélioration de la survie sans progression (4,8 mois pour le groupe traité avec le Trametinib contre 1,5 mois pour le groupe traité avec la chimiothérapie) et une amélioration de la survie globale (Flaherty et al. 2012) et déclenche des effets secondaires minimes. Il est intéressant de noter que les mélanomes mutés BRAF sont plus sensibles à l'inhibiteur de MEK que les mélanomes mutés NRAS. Cela est dû au fait que la mutation NRAS conduit à l'activation de voies supplémentaires en aval comme la voie PI3K/AKT. Ainsi, une combinaison entre les inhibiteurs de PI3K et de MEK a été envisagée, et montre des résultats pré-cliniques encourageants bien que la toxicité de cette combinaison soit limitante. Malgré l'amélioration de la survie des patients, un traitement à base de Trametinib seul a une efficacité trop faible en comparaison aux inhibiteurs de BRAF seuls. C'est ainsi qu'entre 2014 et 2015, la première thérapie ciblée associant un inhibiteur de BRAF, le Dabrafenib, et un inhibiteur de MEK, le Trametinib, a été approuvée après des essais cliniques concluants. Le premier essai clinique (COMBI-d et COMBI-v) a montré une augmentation de taux de réponse de 76% au lieu de 50%, une survie sans progression de 11 mois contre 8,8 mois et une survie globale médiane de 25,1 mois contre

18,7 mois respectivement pour les patients traités avec la combothérapie en comparaison avec un traitement au Dabrafenib seul (Long et al. 2012). Cette efficacité accrue de la combinaison thérapeutique a d'ailleurs été confirmée à cinq ans dans le mélanome métastatique (Robert et al. 2019). La combinaison entre le Vemurafenib et le Cobimetinib a elle aussi été testée dans un essai clinique (coBRIM), et montre que la survie sans progression est passée de 6,2 mois pour les patients traités avec le Vemurafenib seul contre 9,9 mois pour les patients traités avec la combinaison des deux inhibiteurs. Ces deux combinaisons ont les mêmes avantages et confèrent ainsi une meilleure réponse sans progression, une meilleure réponse globale ainsi qu'une diminution des effets secondaires comme l'apparition des carcinomes (Larkin et al. 2014).

Enfin, en 2018, l'utilisation d'une nouvelle combinaison d'inhibiteur de BRAF et MEK a été approuvée. Il s'agit de l'Encorafenib et du Binimetinib dont l'essai clinique de phase III COLOMBUS a permis de montrer que la survie sans progression des patients traités avec cette combinaison est de 14,9 mois contre 7,3 mois pour les patients traités avec le Vemurafenib (Dummer et al. 2018). Si l'on regarde les résultats de l'essai clinique à 5 ans, on s'aperçoit que la survie sans progression et la survie globale avec l'Encorafenib plus le Binimetinib sont de 23 % et 35 % contre 10 % et 21 % avec le Vemurafenib (Dummer et al. 2022).

Ces trois combinaisons de traitement combinant un inhibiteur de BRAF et un inhibiteur de MEK font partie de l'arsenal clinique de première ligne et ont une réponse rapide et drastique. Néanmoins, l'acquisition d'une résistance à l'association de plusieurs inhibiteurs, et la sélectivité de ce traitement pour un certain groupe de patients restent un risque majeur, et le principal enjeu de la prise en charge thérapeutique des patients.

B. Les immunothérapies

Pour les patients qui n'expriment pas la mutation BRAF, l'immunothérapie représente leur première ligne de traitement. Les patients atteints d'un mélanome muté BRAF peuvent eux aussi être traités par les immunothérapies en première ligne si la progression de leur mélanome est lente. Les immunothérapies sont aussi utilisées en deuxième ligne de traitement pour les patients mutés BRAFV600 qui ne répondent pas ou qui ont développé une résistance aux thérapies ciblées. Le succès récent des immunothérapies s'explique dans le mélanome par une forte immunogénicité et à la sensibilité de ces cellules cancéreuses aux modulations immunitaires.

Les immunothérapies les plus efficaces dans le cadre du mélanome ciblent une famille de récepteurs qui servent de points de contrôle du système immunitaire situés sur les lymphocytes T. Ces deux récepteurs agissent comme des « freins » immunologiques à l'activation des LT et ainsi rétablissent l'homéostasie une fois que la réponse immunitaire n'est plus nécessaire. Les cellules immunitaires sont censées reconnaître les cellules tumorales et les détruire. Cependant, les cellules cancéreuses sont capables d'échapper au système immunitaire (Hanahan et Weinberg 2011) et détournent à leur avantage ces deux systèmes de « frein » immunitaire. Pour déclencher une réponse immunitaire, deux signaux d'activation des cellules présentatrices d'antigène vers les LT sont nécessaires. L'un de ces deux signaux est alors généré par la liaison entre CD28 à la surface des LT et le ligand des cellules présentatrices d'antigène B7 (CD80/CD86). Ces protéines co-stimulatrices sont en compétition avec des protéines co-inhibitrices comme CTLA-4. La liaison de CD80 ou CD86 à CTLA-4 (de plus forte affinité) transmet ainsi des signaux inhibiteurs aux LT (W. M. Lin et Fisher 2017). La deuxième protéine inhibitrice est PD-1 qui est un récepteur exprimé sur les LT. Il interagit avec les ligands PD-L1 et PD-L2 présents sur les cellules tumorales ou stromales, ce qui va empêcher l'activation des LT anti-tumoraux. L'immunothérapie a ainsi pour but d'activer le système immunitaire afin de détruire les cellules tumorales en ciblant les points de contrôle immunologiques par différents anticorps monoclonaux : les anti-CTLA-4 et les anti-PD-1.

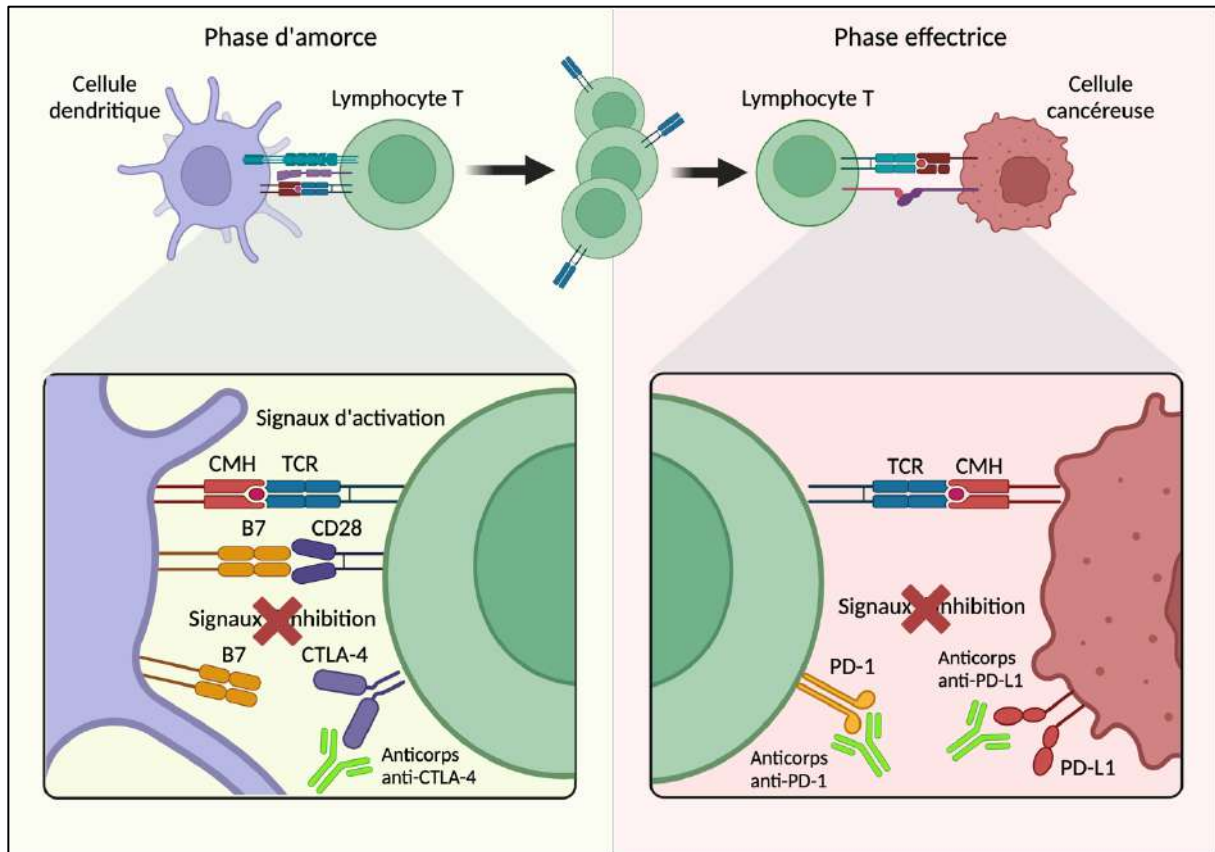


Figure 12 : Les immunothérapies anti-CTLA-4 et anti-PD-1/PD-L1

Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) via leur récepteur de lymphocytes T (TCR). Ce premier signal n'est pas suffisant pour activer une réponse des lymphocytes T, il est nécessaire qu'un second signal soit délivré par les molécules co-stimulatrices B7. Il s'agit alors d'un signal d'activation lorsque ces molécules se lient au CD28 ou d'inhibition lorsqu'elles se lient à CTLA-4. La thérapie par anticorps anti-CTLA-4 permet de lever cette inhibition. Le récepteur inhibiteur de la mort programmée 1 (PD-1) est exprimé par les lymphocytes T et entraîne une régulation négative des lymphocytes T lors de sa liaison avec les ligands PD-L1 et PD-L2 exprimés par les cellules cancéreuses. Son blocage par des anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1 entraîne l'activation préférentielle des lymphocytes T spécifiques au cancer. Adapté de (Ribas 2012).

Les anti-CTLA-4 :

Les anticorps anti-CTLA-4 agissent comme des antagonistes de la liaison entre CTLA-4 et le ligand B7. Cela bloque ainsi l'effet inhibiteur induit par CTLA-4 et entraîne une sécrétion importante de cytokines pro-inflammatoires par les LT, et une augmentation de l'expansion clonale des LT et de leur infiltration au sein de la tumeur (Ribas 2007; Ribas et al. 2009).

L'anticorps monoclonal Ipilimumab dirigé contre CTLA-4 a été approuvé en 2011 et est utilisé dans le mélanome. Il permet d'augmenter la survie de 10% en comparaison aux chimiothérapies traditionnelles après 1 à 3 ans. Cependant, le taux de réponse au traitement est faible avec moins de 20% des patients qui y répondent (C. Robert et Mateus 2011; Hodi et al. 2010). Les effets secondaires générés par les anticorps monoclonaux sont importants et comprennent des altérations auto-immunes telles que les dermatites, les colites ou les hépatites (Wolchok et al. 2010; Domingues et al. 2018).

Les anti-PD-L1 :

Le premier anticorps monoclonal dirigé contre PD-1 a été accepté dans le traitement du mélanome en 2014. Il s'agit du Nivolumab qui va permettre de bloquer la liaison des ligands PD-L1 et PD-L2 exprimés par les cellules de mélanome, les cellules dendritiques et les CAF, au récepteur PD-1 et ainsi induire une réponse immunitaire anti-tumorale pour réduire la progression de la tumeur. En effet, le taux de survie sans progression à six mois est de 51,1% pour les patients traités avec le Nivolumab, contre 39,3% pour les patients traités avec l'anticorps anti-CTLA-4. Le taux de survie globale atteint alors 72,2% et 59,3% à 12 mois et 24 mois pour l'anti-PD-1 en comparaison à un taux de 50,4% et 28,6% pour l'anti-CTLA-4. De plus, la combinaison anti-PD-1 et anti-CTLA-4 permet d'augmenter la survie sans progression à 63,8% à 6 mois, et la survie globale à 73,1% et 62,9% à 12 et 24 mois (Ugurel et al. 2017). En 2015, l'anticorps anti-PD-1 Pembrolizumab obtient l'autorisation de mise sur le marché et permet d'obtenir le taux de réponse est aussi plus important avec l'anti-PD-1 puisque l'on observe un taux de réponse de 33,7% au lieu de 11,9% pour l'anti-CTLA-4. Enfin, il est important de noter pour les patients que l'utilisation du Pembrolizumab a une plus faible toxicité puisque la fréquence d'effets secondaires de haut grade est moins élevée (C. Robert et al. 2015). D'autres molécules sont en essais cliniques mais ne font pas pour l'instant partie de l'arsenal thérapeutique utilisé dans le traitement du mélanome cutané. Il s'agit d'anticorps dirigés contre PD-L1, le Durvalumab, l'Avelumab, et l'Atezolizumab qui permettent d'empêcher l'interaction entre le ligand PD-L1 et son récepteur PD-1 (Domingues et al. 2018).

Les immunothérapies présentent des réponses aux traitements plus durables alors que les thérapies ciblées ont pour avantage d'obtenir des réponses rapides (Ugurel et al. 2017). C'est une des raisons pour laquelle les patients atteints de la mutation BRAFV600 sont toujours traités en première ligne par les thérapies ciblées lorsqu'une réponse rapide est nécessaire. Cependant, grâce aux immunothérapies, on observe une meilleure survie des patients BRAF mutés qui rencontrent une résistance aux thérapies ciblées (W. M. Lin et Fisher 2017). Plutôt que d'aborder la question du choix du traitement entre l'association BRAF/MEK et la monothérapie PD-1, un essai de phase III a été réalisé. Des patients atteints d'un mélanome métastatique mutant *BRAFV600* naïfs de traitement ont été assignés au hasard pour recevoir soit l'association Nivolumab/Ipilimumab, soit la combinaison Dabrafenib/Trametinib. À la progression de la maladie, les patients ont ensuite reçu le traitement inverse, à savoir la combinaison Dabrafenib/Trametinib ou Nivolumab/Ipilimumab respectivement. Le critère d'évaluation principal était la survie globale à 2 ans. Il a été alors démontré une supériorité pour le Nivolumab/Ipilimumab suivi du Dabrafenib/Trametinib par rapport à la séquence inverse (Atkins et al. 2023).

C. Combinaison entre les thérapies ciblées et les immunothérapies

De nouveaux essais cliniques de phase III étudient la combinaison entre les thérapies ciblées et les immunothérapies pour les patients mutés BRAFV600. Il existe l'essai COMBI-i qui combine l'anti-PD-1 Spartalizumab avec la combinaison Dabrafenib et Trametinib qui présente des résultats intéressants avec 44% de réponse complète chez les patients (Dummer et al. 2020). L'essai clinique IMspire-150 combine le Vemurafenib et Cobimetinib avec l'anti-PD-L1 Atezolizumab comme traitement de première intention pour les patients atteints d'un mélanome cutané avancé et porteurs de la mutation BRAFV600. Les patients qui ont reçu l'Atezolizumab ont une survie sans progression de 15,1 mois contre 10,6 mois pour les thérapies ciblées seules. L'ajout de l'Atezolizumab au traitement ciblé par le Vemurafenib et le Combimetinib était tolérable et a permis d'augmenter la survie sans progression chez les patients atteints d'un mélanome avancé. L'utilisation de l'immunothérapie associée aux thérapies ciblées semble prometteuse pour la prise en charge de ce cancer agressif.

II. Les mécanismes de résistance thérapeutique

A. La résistance intrinsèque

1. La résistance innée aux thérapies ciblées

Malgré les récents progrès concernant la prise en charge des patients atteints d'un mélanome cutané avancé, la résistance aux différents traitements proposés conduit à de nombreux échecs thérapeutiques. Nous distinguons deux types de résistances aux traitements actuels : la résistance innée et la résistance acquise. La résistance innée est une résistance préexistante aux médicaments et concerne l'ensemble de la population de cellules cancéreuses, ou une certaine sous population de cellules, qui n'ont jamais été exposées au traitement auparavant. La résistance acquise se réfère à une tumeur qui va initialement répondre au traitement puis mettre en place des stratégies afin de continuer de progresser. La résistance innée au Vemurafenib représente par exemple 50% des patients. 15% d'entre eux ne montrent aucune réduction de la tumeur sous traitement et 35% des patients ont une diminution de leur tumeur mais qui ne respecte pas les critères RECIST pour compter comme une réponse partielle (Roesch 2015). Concernant les mécanismes de résistance, nous pouvons distinguer les mécanismes intrinsèques qui résultent de modifications internes à la cellule et les mécanismes extrinsèques qui dépendent du microenvironnement tumoral.

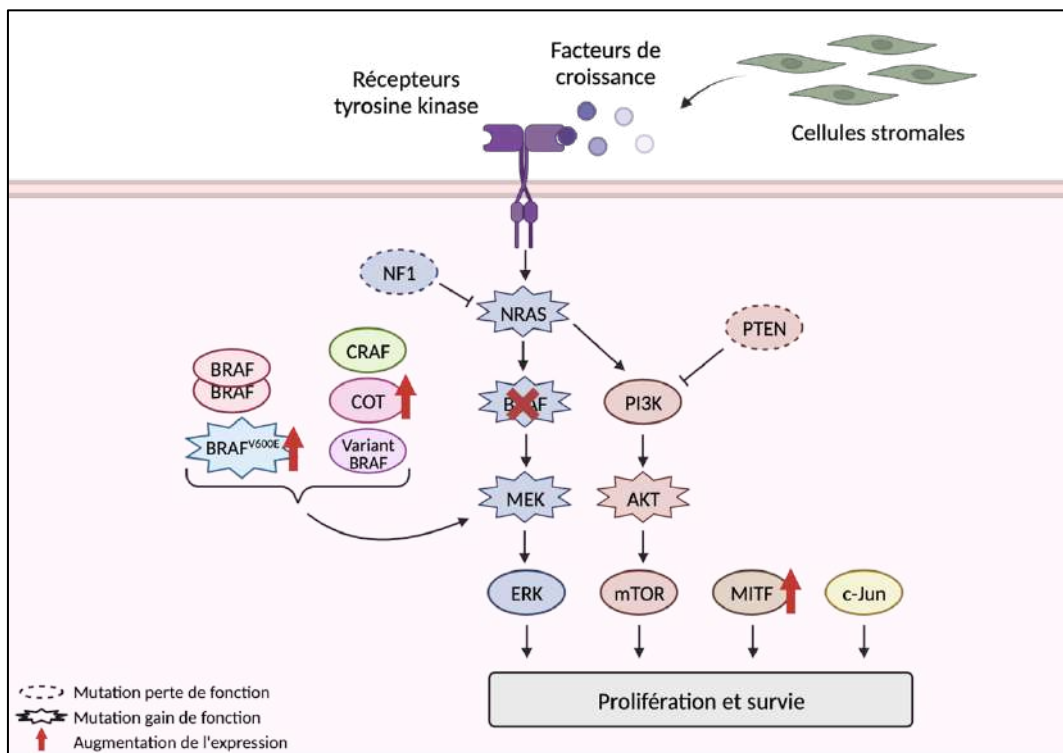


Figure 13 : Mécanismes de résistance intrinsèque aux thérapies ciblées par réactivation de la voie MAPK ou activation de la voie PI3K/AKT

Parmi les mécanismes de résistance les plus communs, nous retrouvons la réactivation de la voie des MAPK (dans 80% des cas) et une activation de voies alternatives comme la voie PI3K/AKT. Ces activations se produisent le plus souvent par des mécanismes impliquant des mutations perte ou gain de fonction et des amplifications géniques dans les gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. Adapté de (Kozar et al. 2019).

Dans les mélanomes mutés BRAF, la résistance innée s'explique par d'autres mutations génétiques. En effet, une étude a cherché la cause sous-jacente de l'échec du traitement chez un patient atteint d'un mélanome muté BRAF qui présentait une résistance innée. Pour cela, ils ont effectué un séquençage du génome et une analyse des polymorphismes nucléotidiques uniques et ont ainsi découvert deux mutations impliquées dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF. La première est la mutation GNAQ qui déclenche une activation importante de ERK, et la deuxième est une perte de PTEN conduisant à l'activation de la voie PI3K/AKT (S. Turajlic et al. 2014). Il est important de retenir que la perte de PTEN entraîne une résistance innée aux inhibiteurs de BRAF. De même, *NF1* est le gène le mieux classé pouvant entraîner une résistance à l'inhibition de RAF (Whittaker et al. 2013). Sa perte entraîne en effet cette résistance par l'activation de la voie MAPK et PI3K/AKT (Gibney et Smalley 2013). D'autres altérations génétiques peuvent elles aussi être à l'origine d'une résistance innée au traitement comme la perte de RB (Xing et al. 2012) ou l'hyperactivation d'AKT (Shao et Aplin 2010).

De façon intéressante, le microenvironnement tumoral peut aussi participer à une résistance innée des cellules de mélanome. En effet, une étude a montré que la sécrétion d'HGF par le stroma tumoral permet l'activation du récepteur MET et la réactivation des voies MAPK et PI3K/AKT, conférant ainsi une résistance aux cellules de mélanome. De plus, une corrélation est observée par des analyses immunohistochimiques entre la sécrétion stromale d'HGF et la résistance innée au traitement des patients (Straussman et al. 2012; Blum, LaBarge, 2014). De plus, nous avons montré dans notre laboratoire que les signaux physiques et structurels provenant de la MEC dérivée des fibroblastes abrogent les réponses antiprolifératives à l'inhibition de BRAF/MEK par l'activation des DDR qui favorisent la survie cellulaire par la voie NIK/IKK α /NF- κ B2 (Berestjuk et al. 2022).

2. La résistance acquise aux thérapies ciblées

Les thérapies ciblant BRAFV600 dans le mélanome mènent à une résistance thérapeutique acquise dont les mécanismes peuvent être classés en deux groupes : génétiques et non génétiques. Les mécanismes de résistance génétique concernent la majorité des patients (entre 51 et 58%) (Kakadia et al. 2018). Cependant, la contribution récente des mécanismes de résistance acquise non génétique a commencé à être élucidée et montre que l'évasion thérapeutique est à la fois due à des événements moléculaires génétiques et non génétiques qui sont liés et ne s'excluent pas (Marine, Dawson, et Dawson 2020).

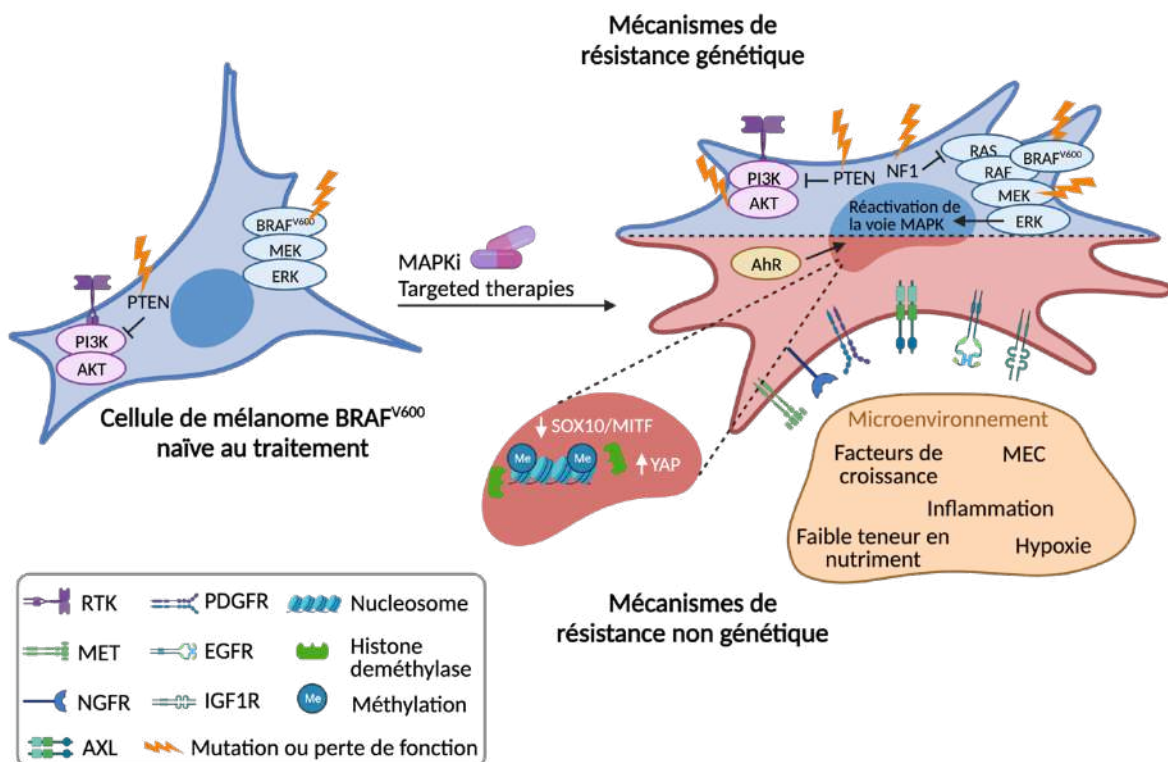


Figure 14 : Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées sur la voie des MAPK

Schéma décrivant les mécanismes génétiques et non génétiques conduisant à une résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPK. Adapté de (Diazzi, Tartare-Deckert, et Deckert 2020).

Mécanismes de résistance génétique :

La résistance acquise génétique est définie comme étant l'évolution génétique du cancer en réponse à la pression thérapeutique. Il s'agit en effet d'une adaptation au traitement où les cellules vont acquérir des altérations génétiques et spécifiques telles que des mutations, des amplifications et délétions de gènes et des altérations chromosomiques qui confèrent des avantages aux cellules cancéreuses afin d'échapper aux traitements. Les inhibiteurs dirigés contre BRAF et MEK inhibent efficacement la voie des MAPK et entraînent une réponse rapide chez les patients atteints d'un mélanome avancé, et entraîne une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses portant la mutation BRAFV600 et ainsi de la progression de la tumeur. Malheureusement, une réactivation de la voie des MAPK a lieu dans 80% des cas. Ce cancer dépend tellement de cette voie que les cellules s'adaptent rapidement à son inhibition et mettent en place des mécanismes génétiques afin de la réactiver (Moriceau et al. 2015). Les plus courants agissent en amont de BRAF et comportent des mutations activatrices de NRAS qui activent la voie MAPK/ERK en utilisant l'isoforme CRAF, contournant ainsi l'inhibition de BRAF (Dumaz et al. 2006; Nazarian et al. 2010), ou la perte du régulateur négatif de la voie MAPK, NF1 (Whittaker et al. 2013). De plus, la surexpression de différents isoformes de RAF déclenche une résistance aux thérapies ciblées par l'activation directe de MEK (Doudican et Orlow 2017). Nous pouvons aussi retrouver des altérations de BRAF, notamment une amplification du gène *BRAF* (Shi et al. 2012) ou la production d'une version tronquée de BRAF qui empêche la liaison de l'inhibiteur (Poulikakos et al. 2011). En aval de BRAF, l'amplification ou des mutations MEK1, MEK2 et les activateurs de MEK peuvent enclencher la réactivation de la voie MAPK et également permettre la résistance au traitement (Villanueva, Vultur, et Herlyn 2011; Song et al. 2022; Dharanipragada et al. 2023). Parallèlement à la réactivation de la voie des MAPK, la voie PI3K/AKT est la plus communément retrouvée dans la résistance du mélanome, et l'on retrouve des altérations de cette voie dans 22% des cas. L'augmentation de la voie PI3K est due à la perte de fonction par mutation ou délétion de PTEN dans 10% des cas de mélanome (Shi et al. 2014). Les altérations génétiques affectant ces deux voies peuvent se retrouver au sein d'une même tumeur.

Outre les gènes impliqués dans la régulation de la voie des MAPK, la mutation ou l'amplification de différents facteurs de transcription est responsable d'une résistance clinique aux inhibiteurs de la voie des MAPK comme cela a été observé pour les facteurs HOXD8 et MITF (Van Allen et al. 2014). De façon surprenante, un taux élevé de MITF permet d'échapper à la mort cellulaire induite par l'inhibition de BRAF et MEK (Wellbrock et Arozarena 2015). En effet, nous avons abordé précédemment le modèle du rhéostat de MITF qui montre qu'un très fort taux d'expression de MITF traduit un état hyper-différencié induit par les traitements et surtout qui permet de s'adapter et résister à ces traitements (Carreira et al. 2005). Une faible expression de MITF est associée quant à elle à une transition phénotypique, une surexpression du récepteur AXL qui représente un mécanisme de résistance non génétique important que nous allons aborder à présent.

Mécanismes de résistance non génétique :

La plasticité phénotypique permet de mettre en place au sein de la cellule de mélanome des réponses adaptatives lors d'une exposition aux différentes conditions expérimentales, et notamment face aux différentes stratégies thérapeutiques utilisées en clinique, afin d'acquérir une résistance aux traitements. Ainsi, comprendre les différents mécanismes de résistance non génétique peut nous indiquer les faiblesses et vulnérabilités des cellules de mélanomes afin d'éradiquer les résistances. L'adaptation des cellules de mélanomes aux thérapies ciblées se traduit par l'émergence de différents phénotypes cellulaires qui deviennent progressivement plus différenciés. En effet, les cellules vont présenter une signature invasive ou proche de la crête neurale, que nous avons décrites précédemment (Tsoi et al. 2018). Ces sous-types de cellules vont présenter une expression et activité accrue de plusieurs RTK comme NGFR (Rambow et al. 2018), PDGFR (Nazarian et al. 2010), IGF1R (Villanueva et al. 2010), EGFR et AXL (Müller et al. 2014) et une perte de l'expression de MITF et SOX10 (Verfaillie et al. 2015). L'augmentation de l'expression de PDGFR β est associée

à l'acquisition d'une signature unique et résistante aux thérapies malgré une absence de mutation activatrice du récepteur, introduisant ainsi le concept de résistance non génétique (Nazarian et al. 2010). La surexpression de PDGFR β et EGFR est associée à une augmentation de l'activité de c-JUN qui est le principal facteur de transcription de la famille AP-1 impliqué dans la progression du mélanome (Sun et al. 2014). Celui-ci joue un rôle important dans l'adaptation à l'inhibition de BRAF et MEK. On retrouve en effet une augmentation de l'activité de c-JUN en réponse au Vemurafenib dans les cellules mutées BRAF (A. Delmas et al. 2015). Cette induction est ainsi retrouvée lors d'une exposition à court terme aux inhibiteurs de BRAF mais elle est aussi maintenue à un stade plus tardif lorsque les cellules acquièrent une résistance au traitement (Titz et al. 2016). De plus, nous retrouvons l'expression de ZEB1 dans les cellules de mélanome présentant une résistance acquise. ZEB1 représente alors un acteur majeur de la plasticité des cellules du mélanome, et conduit à l'adaptation des cellules de mélanome aux thérapies, et ainsi à la résistance phénotypique à MAPKi (Richard et al. 2016).

Dans une étude récente, les chercheurs ont établi des PDX à partir de tumeurs de patients atteints d'un mélanome avancé, mutées BRAFV600 et sensibles à un premier traitement à l'inhibiteur de BRAF et de MEK (Rambow et al. 2018). Les souris ont été traitées avec la combinaison Dabrafenib et Trametinib. De façon attendue, les tumeurs rétrécissent (phase 1) jusqu'à être impalpables au bout de deux semaines (phase 2) bien que le développement d'une résistance soit par la suite inévitable (phase 3). Cela indique qu'une phase appelée « maladie résiduelle minimale » (MRD, minimal residual disease) est présente. Cette phase décrit des cellules cancéreuses résiduelles et tolérantes aux traitements, qui restent ainsi viables après l'administration du traitement et qui entraînent une rechute. Cette étude a montré qu'il pouvait y avoir jusqu'à quatre sous-types cellulaires distincts lors de cette phase MRD, illustrant la remarquable plasticité des cellules de mélanome. On retrouve ainsi les cellules pigmentées qui expriment fortement MITF, les cellules SMC, les cellules invasives « indifférenciées » et les cellules proches de la crête neurale NCSC qui mettent en place des mécanismes de tolérance aux traitements. L'analyse de la dynamique transcriptionnelle montre que l'exposition aux médicaments favorise d'abord une transition de l'état mélanocytaire à l'état SMC. A partir de cet état, les cellules peuvent suivre une trajectoire de différenciation pour devenir « pigmentées » ou de dédifférenciation et devenir invasives ou NCSC. Le passage à cet état dédifférencié qui possède la capacité à initier des tumeurs est appelé état « phénix » en référence à l'oiseau qui renaît de ses cendres (Marine, Dawson, et Dawson 2020). Les phénotypes invasifs et NCSC sont tous deux responsables des rechutes dans le mélanome et sont donc assimilés à cet état « phénix ».

Ainsi, il est important de mieux comprendre les mécanismes conduisant à cette hétérogénéité tumorale et à l'émergence des différentes sous populations cellulaires tolérantes aux traitements. La plasticité cellulaire représente alors une cible prometteuse pour surmonter la résistance thérapeutique du mélanome. Pour ce faire, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre, dont la première approche qui correspond à une « commutation phénotypique dirigée ». Pour tester cette stratégie, les cellules de mélanome sont d'abord traitées par le méthotrexate qui stimule l'expression de MITF, entraînant ainsi une différenciation des cellules et une expression accrue de la tyrosinase. La combinaison avec un promédicament antifolate conçu pour être activé par la tyrosinase permet un effet cytotoxique spécifique à ce type de cellule et induit une réponse tumorale *in vitro* et *in vivo* (Sáez-Ayala et al. 2013). Une deuxième stratégie consiste à cibler la population cellulaire dédifférenciée invasive qui exprime de fort taux d'AXL. Le ciblage d'AXL à l'aide d'un anticorps bloquant AXL-107-MMAE permet d'éradiquer les cellules AXL positives et d'obtenir des réponses anti-tumorale *in vivo* sur des PDX de différents cancers, dont le mélanome. La combinaison de l'anticorps dirigé contre AXL et des inhibiteurs de BRAF et MEK permet de d'éliminer les cellules sensibles aux thérapies ciblées mais aussi les cellules qui y résistent par l'acquisition d'un phénotype invasif. Il est intéressant de noter que le traitement aux thérapies ciblées induit l'expression d'AXL, potentialisant ainsi l'effet de l'anticorps anti-AXL (Boshuizen et al. 2018). Enfin, une troisième stratégie consiste à cibler le phénotype NCSC avec un antagoniste pan-RXR étant donné que cet état cellulaire est principalement régi par l'activation du récepteur gamma de l'acide rétinoïque X (RXRG) (Rambow et al. 2018). Cependant, le ciblage de cette sous population de cellules conduit à une accumulation des trois autres phénotypes cellulaires. Il serait donc intéressant d'envisager une combinaison entre l'anticorps anti-AXL et l'antagoniste pan-RXR. Dans notre laboratoire, nous avons pour stratégie de cibler la réponse fibrotique qui se met en place par les cellules de mélanome dédifférenciées MITF^{low}/AXL^{high} avec notamment des agents anti-fibrotiques (Diazi et al. 2022).

3. La résistance aux immunothérapies

Les mécanismes de résistances aux immunothérapies mis en place par les cellules cancéreuses comprennent une diminution des composants de la machinerie de présentation des antigènes ou une expression différentielle des gènes qui régulent l'infiltration immunitaire (Sharma et al. 2017). Les mécanismes de résistances affectent principalement les lymphocytes T (LT) et peuvent en effet entraîner une production insuffisante de LT anti-tumoraux ou entraîner leur perte de fonction. Parmi les mécanismes de résistance intrinsèque, nous retrouvons la signalisation de la voie des MAPK et/ou la perte de l'expression de PTEN conduisant à une signalisation PI3K importante, l'expression de la voie WNT/ β -caténine, la perte de la signalisation de l'interféron gamma (IFN γ) et une absence de la réponse LT en raison de la perte de l'antigène tumoral. La mutation BRAFV600E peut entraîner une immunosuppression par la sécrétion d'IL-1 (Khalili et al. 2012) et la voie des MAPK est connue pour permettre la production de VEGF et IL-8 favorisant ainsi l'inhibition du recrutement et de la fonction des LT (Chengwen Liu et al. 2013). La perte de PTEN conduit à l'activation de la signalisation PI3K ce qui s'est avéré être associée à une résistance aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires. La perte de PTEN est d'ailleurs corrélée sur le TCGA à une diminution significative de l'expression génique de l'IFN γ , de la granzyme B et à une plus faible infiltration de LT (W. Peng et al. 2016). Dans des modèles murins de mélanome, une stabilisation de la β -caténine et une signalisation constitutive de WNT entraînent une diminution de l'infiltration des LT et permet ainsi une résistance aux anti-PD-L1 et anti-CTLA-4 (Spranger, Bao, et Gajewski 2015). La voie IFN γ est un acteur clé de la réponse aux immunothérapies et la perte des gènes de cette voie est connue comme étant un mécanisme de résistance aux anti-CTLA-4 (Gao et al. 2016). L'IFN γ produit par les LT spécifiques de la tumeur induit une réponse immunitaire anti-tumorale efficace par une présentation favorisée de l'antigène tumoral, un recrutement important d'autres cellules immunitaires et des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques direct sur les cellules tumorales. Ainsi, des mutations sur les protéines liées aux récepteurs de l'IFN γ JAK1/2 ou sur le transducteur du signal STAT entraînent une résistance aux immunothérapies. L'analyse de tumeurs de patients qui n'ont pas répondu au traitement Ipilimumab a révélé une fréquence enrichie de mutations les récepteurs de l'interféron gamma 1 et 2 (IFNGR1/2), JAK2 et le facteur de régulation de l'interféron 1 (IRF1) (Gao et al. 2016). Enfin, certains facteurs de transcription peuvent être impliqués dans les mécanismes de résistances aux immunothérapies. ZEB1 a d'ailleurs été décrit comme étant un acteur clé de l'évasion immunitaire des mélanomes et représente ainsi une cible intéressante pour augmenter l'efficacité des immunothérapies (Plaschka et al. 2022). Étant donné son rôle précédemment décrit sur la résistance aux thérapies ciblées, ZEB1 illustre la résistance croisée entre les thérapies ciblées et les immunothérapies que nous allons aborder dans la prochaine sous-partie.

Il existe aussi des facteurs extrinsèques conduisant à une résistance aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires qui peuvent être liés au patient notamment son type de métabolisme, son âge, ou encore différentes maladies comme l'obésité ou le diabète. Les facteurs extrinsèques peuvent aussi impliquer des composants autres que les cellules cancéreuses au sein du microenvironnement tumoral. Nous pouvons retrouver les CAF, Tregs, les cellules myéloïdes suppressives, ou encore les macrophages anti-tumoraux qui peuvent tous contribuer à l'inhibition des réponses immunitaires anti-tumorales en sécrétant un milieu riche en cytokines immunosuppressives (Morad et al. 2021).

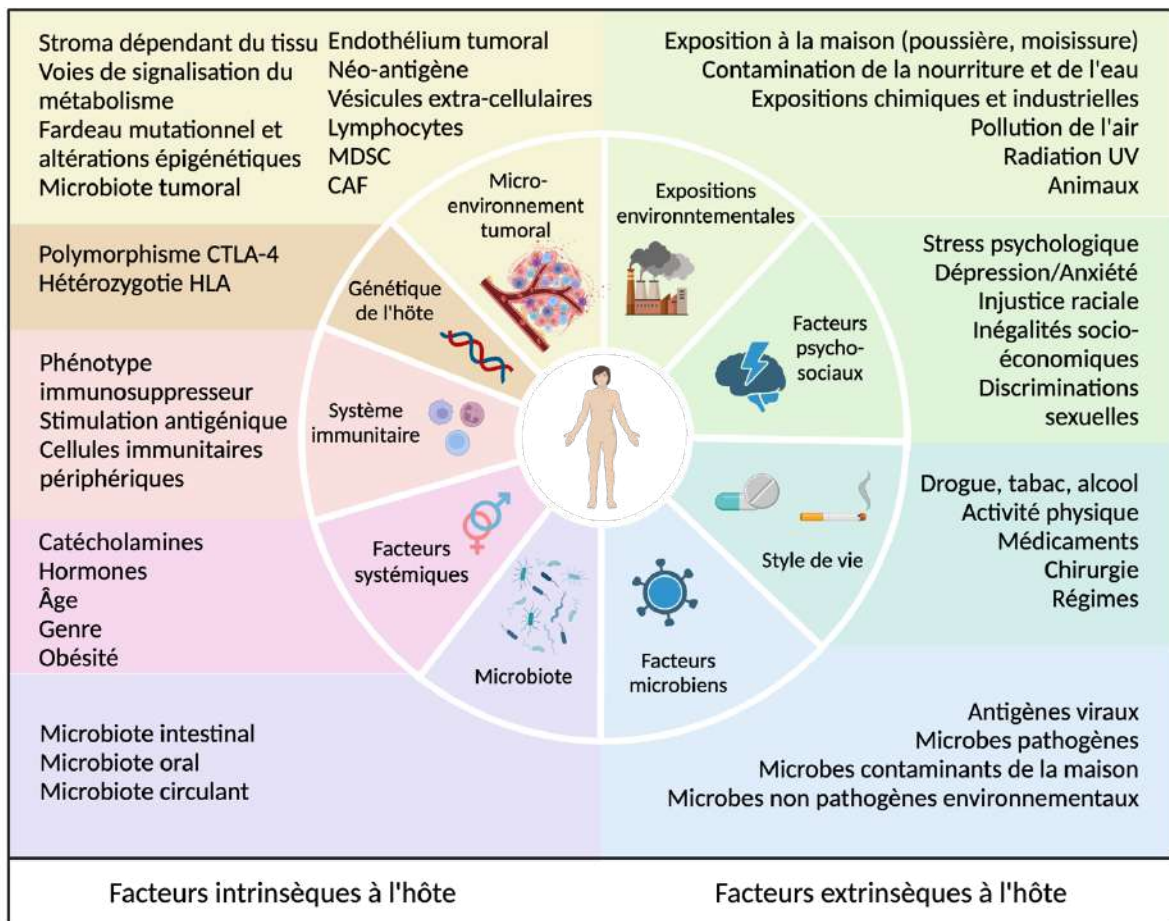


Figure 15 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques impliqués dans la réponse aux immunothérapies

De nombreux facteurs régulent le processus dynamique de l'immunité tumorale et de la réponse au blocage des points de contrôle immunitaires. Nous décrivons dans ce schéma les différents facteurs intrinsèques de l'hôte, notamment ceux inhérents aux cellules tumorales et au microenvironnement tumoral (en jaune), à la génomique et à l'épigénomique de l'hôte (orange), à l'immunité de l'hôte (rouge), ainsi qu'à d'autres facteurs de régulation immunitaire comme les facteurs systémiques (rose) et le microbiote (violet). Plus récemment, l'importance des facteurs extrinsèques de l'hôte dans la modulation de l'immunité tumorale et leur impact potentiel sur la réponse aux immunothérapies est de plus en plus étudiée. Adapté de (Morad et al. 2021).

4. Résistance croisée entre thérapies ciblées et immunothérapies

Récemment dans le mélanome, le concept de résistance croisée aux thérapies ciblées et immunothérapies a émergé. Les premières études étaient concentrées sur la résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPK et ont permis de faire des observations quant aux immunothérapies. En effet, les tumeurs présentant une résistance non génétique associée à une surexpression de c-MET par exemple, ont une diminution de l'infiltration des LT CD8+ au sein des tumeurs traitées avec les inhibiteurs de BRAF et de MEK (Hugo et al. 2015a). De plus, l'analyse transcriptomique des tumeurs résistantes aux immunothérapies est similaire à celle obtenue sur les tumeurs résistantes aux thérapies ciblées (Hugo et al. 2016).

En 2020, l'équipe du Dr Sanz Moreno a montré que les thérapies ciblées induisent l'activation de la voie ROCK/Myosin II pour favoriser leur survie. Une activation élevée de cette voie est corrélée à l'agressivité des cellules de mélanome, et permet d'identifier les mélanomes résistants aux thérapies ciblées mais aussi aux immunothérapies. Le ciblage de la voie ROCK/Myosine II est suffisant pour resensibiliser les cellules de mélanome aux thérapies ciblées par l'apparition de ROS létaux et de dommages à l'ADN. Ce ciblage est par ailleurs suffisant pour resensibiliser aux immunothérapies en limitant l'immunosuppression myéloïde et lymphoïde extrinsèque (Orgaz et al. 2020).

Enfin, une autre étude a montré que les tumeurs en rechute après un traitement aux thérapies ciblées présentent une résistance croisée aux immunothérapies qui est médiée par un microenvironnement tumoral immunosuppresseur instruit par les cellules cancéreuses elles-mêmes. Ce microenvironnement tumoral est dépourvu de cellules dendritiques CD103+ fonctionnelles, empêchant ainsi une réponse efficace des LT. Ainsi, la restauration de ces cellules permet de lutter et de combattre la résistance croisée qui peut être due à une réactivation de la voie MAPK/ERK qui favorise l'échappement immunitaire (Haas et al. 2021).

B. La résistance extrinsèque

Les cellules de mélanome co-existent avec de nombreux composants du microenvironnement que nous détaillerons dans le chapitre 3 et la dynamique de dialogue au sein de cet écosystème est responsable de nombreux processus favorisant la survie et la progression des cellules cancéreuses. Le microenvironnement peut d'ailleurs jouer un rôle important dans la résistance des cellules de mélanome aux traitements. La résistance conférée par le microenvironnement est appelée EM-DR (Environment-Mediated Drug Resistance). Il s'agit d'une forme de résistance qui peut se développer *de novo* ou bien être acquise par les cellules tumorales au cours des traitements. Dans les années 90, deux formes d'interactions entre les cellules et leur environnement ont pu être identifiées pour expliquer comment la cellule cancéreuse peut échapper à l'action des différents agents thérapeutiques. Il s'agit d'une résistance conférée par les facteurs solubles présents dans le microenvironnement SFM-DR (Soluble Factor-Mediated Drug Resistance) et une résistance due à l'adhésion des cellules tumorales aux cellules stromales et à la matrice extracellulaire MEC via des récepteurs de surface CAM-DR (Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance).

En plus de la contribution de ce dialogue entre les cellules tumorales et les cellules stromales à la résistance thérapeutique observée, plusieurs signaux extracellulaires sont connus pour entraîner une résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome. Nous retrouvons en effet une faible concentration en oxygène, une acidose ou encore une faible teneur en nutriments qui sont des signaux capables d'induire une plasticité phénotypique des cellules mélanome vers un phénotype dédifférencié et résistant.

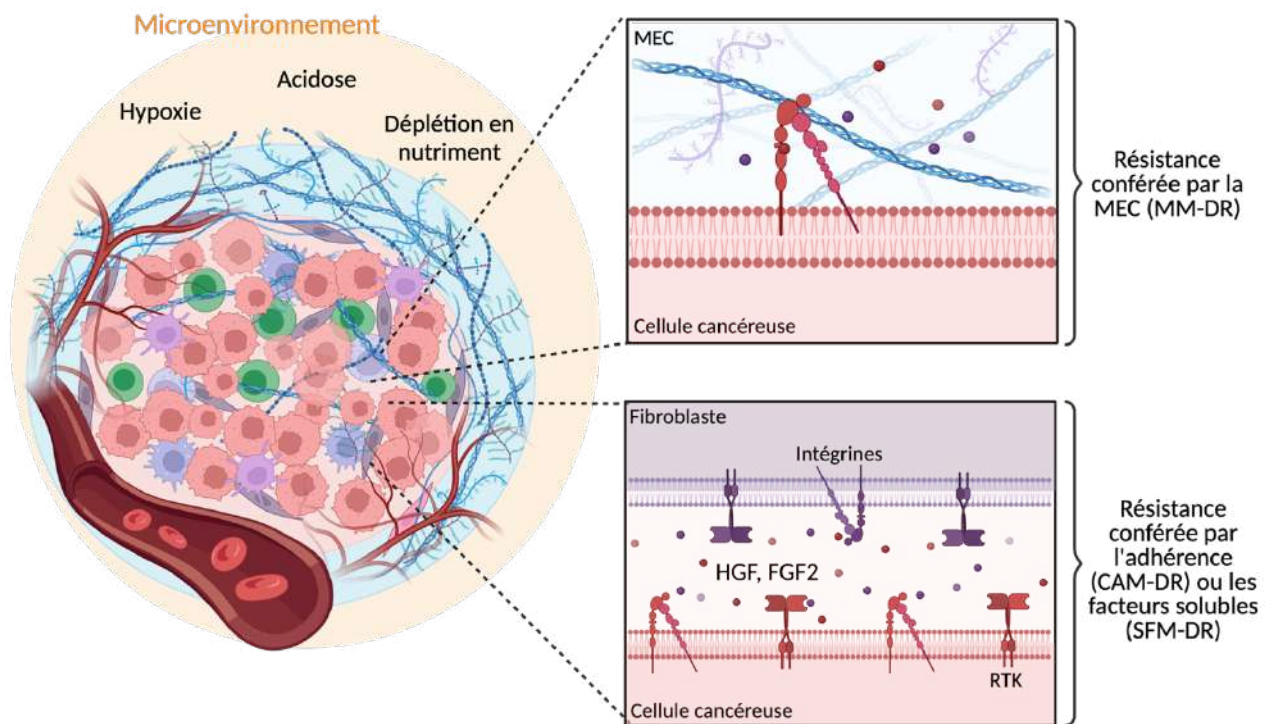


Figure 16 : Les différents types de résistance que le microenvironnement confère aux cellules tumorales

Certains composants présents dans le microenvironnement tumoral induisent une résistance aux médicaments médiée par l'environnement (EM-DR) par deux mécanismes principaux : la résistance aux médicaments médiée par les facteurs solubles (SFM-DR) et la résistance aux médicaments médiée par l'adhésion cellulaire (CAM-DR). Un nouveau sous-type de la CAM-DR, appelé MM-DR (matrix mediated drug resistance, fait intervenir l'adhésion des cellules à la MEC pour induire une résistance au traitement. D'autres signaux et stress extracellulaires du microenvironnement comme l'hypoxie, l'acidification du milieu ou une faible teneur en nutriment sont également impliqués dans la résistance. Adapté de (Meads, Gatenby, et Dalton 2009).

1. La résistance conférée par les facteurs solubles (SFM-DR)

Cette première forme de résistance a été décrite dans les cancers hématologiques où la sécrétion d'IL-6 par les cellules stromales de la moelle osseuse ont permis de réguler la survie et la prolifération de cellules de myélome (Klein et al. 1995). Il a même été montré que la sécrétion d'IL-6 peut induire une résistance à l'apoptose des cellules de myélome lors d'un traitement chimiothérapeutique (Chauhan et al. 1997). De façon intéressante, le milieu conditionné provenant d'une co-culture entre les cellules stromales et les cellules de myélome est suffisante pour conférer une résistance aux cellules cancéreuses à une chimiothérapie (Nefedova, Landowski, et Dalton 2003). En ce qui concerne le mélanome, les premières études ont démontré le rôle du HGF stromal dans la résistance acquise aux thérapies ciblées (Fedorenko et al. 2015; Straussman et al. 2012). La sécrétion de HGF par les cellules stromales entraîne une réactivation de la voie MAPK/ERK ainsi qu'une activation de la voie PI3K/AKT menant à une résistance des cellules aux inhibiteurs de la voie MAPK. D'autres études ont montré l'importance de certaines cytokines sécrétées par les cellules stromales dans ce processus de résistance. En effet, la sécrétion de FGF2 par les kératinocytes et les fibroblastes en réponse au traitement par le Vemurafenib entraîne l'activation de la voie STAT3 comme voie de contournement de la voie des MAPK et médie ainsi la résistance aux thérapies ciblées (Liu et al. 2013). La sécrétion d'un agoniste de Wnt (sFRP2) par les fibroblastes âgés dans le mélanome est aussi capable de conduire à une résistance aux traitements par une diminution de MITF et de la β -caténine (Kaur et al. 2016). Enfin, les thérapies ciblées et notamment le Vemurafenib sont capables d'entraîner une diminution de FRA1,

ce qui permet d'induire la production d'un sécrétome complexe par les cellules tumorales elles-mêmes. Ce riche sécrétome est alors composé par exemple d'IGF-1, ou d'HGF activant ainsi la voie PI3K et entraînant la progression et la résistance des cellules de mélanome (Obenauf et al. 2015).

Les cellules immunitaires sont des composants importants du microenvironnement tumoral et nous pouvons nous apercevoir qu'à la suite d'un traitement aux inhibiteurs de la voie des MAPK, le nombre de macrophages augmentent ainsi que leur production et sécrétion de $TNF\alpha$ qui va activer la voie NF- κ B, menant ainsi à une résistance aux traitements (Smith et al. 2014). Les thérapies ciblées sont aussi capables de façon paradoxale d'entraîner une réactivation de la voie des MAPK au sein des macrophages et de permettre ainsi la sécrétion de VEGF qui agit en favorisant la survie des macrophages et de façon encore plus intéressante, de permettre la réactivation de la voie MAPK/ERK au sein des cellules tumorales et faciliter ainsi leur survie (Wang et al. 2015). Enfin, les macrophages sont aussi capables de dialoguer avec les fibroblastes afin de créer une niche inflammatoire protectrice pour les cellules de mélanome via une signalisation dépendant de l'IL-1 (Young et al. 2017). Enfin, la sécrétion de FGF2 par les cellules tumorales entraîne l'infiltration de la tumeur par les lymphocytes B (LB) qui vont produire et sécréter le facteur de croissance IGF-1 qui est essentiel pour favoriser la résistance des cellules de mélanome aux thérapies ciblées grâce à l'émergence de différentes populations hétérogènes (Somasundaram et al. 2017).

2. La résistance conférée par l'adhérence (CAM-DR)

Adhérence cellulaire

De nouveau dans le myélome, l'adhésion des cellules tumorales aux cellules stromales a été identifié comme un processus permettant de conférer une résistance aux cellules cancéreuses. En effet, l'adhésion des cellules de myélome aux cellules stromales se fait par l'intermédiaire de l'intégrine β 1. Cette interaction va permettre d'entraîner la production d'IL-6 par les cellules stromales et induire ainsi une résistance aux traitements (Shain et al. 2009). Il est bien connu aussi dans la leucémie myéloïde chronique (LMC), que les cellules cancéreuses de LMC en contact avec les cellules stromales peuvent acquérir une résistance aux chimiothérapies par le processus de CAM-DR. En effet, la résistance contre l'Imatinib dans la LMC est favorisée par l'émergence d'une sous population de cellules adhérentes, qui sur exprime les intégrines α V β 3, entraînant l'activation de la voie PI3K/AKT et la signalisation ERK impliquée dans la CAM-DR et qui permet ainsi une résistance au traitement de référence (Puissant et al. 2012). Dans le mélanome, l'ensemencement de cellules tumorales sur une monocouche de fibroblastes associés au cancer favorise la survie des cellules traitées à la cisplatine (Flach et al. 2011).

Adhérence à la matrice extracellulaire

Nous verrons la composition de la MEC dans le prochain chapitre, mais il est important de savoir que les cellules tumorales peuvent adhérer à la MEC et activer certaines voies de signalisation qui conduisent à une diminution de la sensibilité aux différents traitements. Certains récepteurs présents à la surface des cellules cancéreuses peuvent entrer en contact avec différents composants de la MEC pour induire différents programmes transcriptionnels. Nous retrouvons les intégrines, les DDR ou encore les syndécans qui sont impliqués dans ce type de résistance. Les premières études abordant l'adhérence des cellules tumorales à la MEC ont montré que perturber leur adhésion en bloquant la liaison entre les intégrines présentes sur les cellules cancéreuses et les laminines présentes dans la MEC, entraîne une diminution de la croissance tumorale du cancer du poumon (Fridman et al. 1990). Dans les hémopathies malignes, la culture de cellules de myélome sur de la fibronectine leur confère une résistance aux chimiothérapies (Damiano et al. 1999). De même, dans les leucémies, la liaison entre la fibronectine et l'intégrine α 4 β 1 conduit à une résistance thérapeutique par l'activation de la voie PI3K/AKT/BCL-2 (de la Fuente et al. 2002).

Plus récemment, le rôle des propriétés biochimiques et biomécaniques de la MEC tumorale dans la résistance thérapeutique des cellules de mélanome a été évalué. En 2015, une étude a révélé que l'inhibiteur de BRAF Vemurafenib favorise une augmentation de la production et du remodelage de la MEC (plus précisément de la fibronectine) par les fibroblastes du microenvironnement, protégeant ainsi les cellules de mélanome du traitement. Les cellules tumorales présentes sur la MEC remodelée vont activer la voie intégrine $\beta 1$ /FAK/SRC et ainsi entraîner une réactivation de ERK et de MEK, permettant une résistance à l'inhibiteur de BRAF (Hirata et al. 2015). Nous retrouvons aussi l'expression de la fibronectine augmentée dans les cellules de mélanome en réponse au traitement. Cela permet l'activation d'AKT et le maintien de la protéine pro-survie MCL1 par les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et confère au mélanome une résistance aux thérapies ciblées (Fedorenko et al. 2016). Une analyse protéomique a montré que les cellules de mélanome possédant un phénotype invasif, mésenchymateux et résistant aux thérapies ciblées s'accompagne d'une expression importante de protéines matricielles comme le collagène de type I, la fibronectine, ou encore la thrombospondine 1 (Titz et al. 2016), observations que nous avons confirmé au laboratoire (Girard et al. 2020; Diazi et al. 2022). En effet, nous avons montré que la MEC produite par des cellules de mélanome résistantes possèdent des propriétés biochimiques et biomécaniques similaires à celle produite par les fibroblastes activés. Cette MEC, produite par les cellules de mélanome, est par ailleurs capable de conférer une protection aux cellules de mélanomes sensibles aux traitements, et ce processus serait en partie régulé par les voies de signalisation YAP/MRTF. Ainsi, nous avons pu montrer que normaliser les dépôts de MEC par des agent anti-fibrotiques ou par le ciblage pharmacologique de YAP entraîne une amélioration de l'efficacité des thérapies ciblées.

De plus, nous avons étudié le processus de résistance médiée par la matrice extracellulaire que nous avons appelé MM-DR (Matrix-Mediated Drug Resistance) et ainsi montré le rôle de la MEC produite par les CAF dans la résistance des cellules de mélanome induite par les thérapies ciblées. Nous avons pu mettre en évidence que la MM-DR est médiée par l'assemblage en clusters linéaires des récepteurs aux collagènes DDR1 et DDR2 phosphorylés en réponse aux thérapies ciblées qui activent la voie de signalisation NF- κ B2 non canonique pour induire la résistance des cellules de mélanome. Ainsi le ciblage *in vitro* et *in vivo* de ces récepteurs permettent de surmonter la résistance thérapeutique et de retarder les rechutes (Berestjuk et al. 2022).

La MEC est ainsi capable de favoriser la résistance des cellules cancéreuses via l'activation de différentes voies de signalisation. Il est intéressant de noter qu'elle peut aussi constituer une barrière physique empêchant la pénétrance de certains médicaments (Provenzano et al. 2012), et empêcher le contact entre les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires, participant ainsi à la résistance aux immunothérapies (Salmon et al. 2012). Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes permettant aux cellules de remodeler cette MEC et de s'en servir comme moyen de protection (Peranzoni et al. 2013).

Chapitre III : Le microenvironnement tumoral

En 1989, Stephen Paget a analysé des données post-mortem provenant de 735 femmes atteintes d'un cancer du sein. Il a noté que les cellules tumorales de sein métastasent préférentiellement dans certains organes, et que cela ne peut être le fruit du hasard. Il émet ainsi l'hypothèse connue sous le nom de « la graine et du sol » où la graine représente la cellule cancéreuse qui se développe préférentiellement dans le microenvironnement d'un organe spécifique (le sol), et que les métastases résultent uniquement lorsque la graine appropriée s'est implantée dans le sol approprié (Paget 1989). C'est alors la première fois que l'idée d'observer les propriétés du tissu hôte de la cellule cancéreuse émerge au sein de la communauté scientifique.

Les tumeurs ne sont pas seulement composées de cellules cancéreuses regroupées en amas. Elles sont, en effet, intégrées au sein d'un microenvironnement, et forme un organe complexe où des cellules saines sont recrutées et parfois détournées au profit de la progression et de la survie du cancer. En 2001, le microenvironnement tumoral est décrit comme un écosystème évolutif dans lequel un dialogue bidirectionnel est établi entre les cellules cancéreuses et les cellules saines qui peuvent être recrutées à distance ou activées localement (Bissell et Radisky 2001). Les communications intercellulaires entre les cellules cancéreuses et les cellules saines dites « stromales » (cellules endothéliales, cellules immunitaires, péricytes, fibroblastes) font intervenir un réseau complexe de cytokines, chimiokines, enzyme de remodelage de la MEC, protéines matricielles, facteurs de croissance et vésicules extracellulaires (EV). Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses vont pouvoir modifier leur environnement qui va à son tour favoriser le développement du cancer, et la dissémination métastatique.

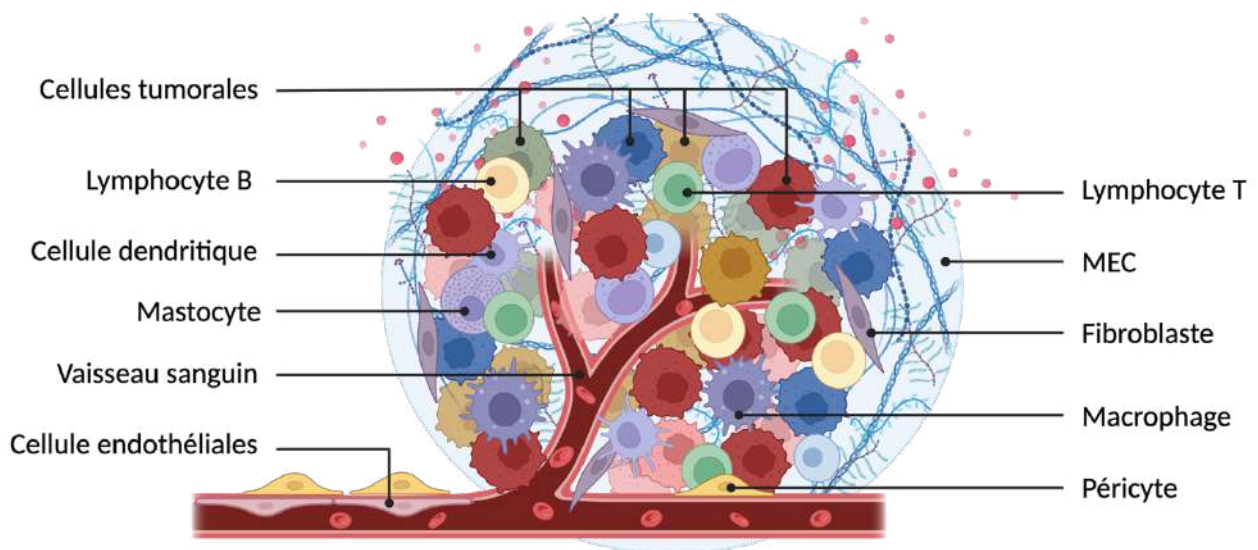


Figure 17 : Le microenvironnement tumoral

Les cellules cancéreuses des tumeurs primaires sont entourées d'un microenvironnement matriciel et cellulaire complexe comprenant de nombreuses cellules, notamment des cellules endothéliales de la circulation sanguine et lymphatique, des fibroblastes résidents et associés au cancer (CAF) et une variété de cellules immunitaires notamment des macrophages et des lymphocytes. Ce microenvironnement participe à la progression tumorale via la sécrétion de cytokines, de facteurs de croissance ou encore via le remodelage de la matrice extracellulaire. Adapté de (Joyce et Pollard 2009).

I. Les composants cellulaires du microenvironnement tumoral

A. Les cellules immunitaires

Au sein de la tumeur, nous retrouvons généralement une infiltration de cellules immunitaires, dont le rôle est d'inhiber le développement des tumeurs. Mais nous avons vu en abordant les mécanismes de résistance thérapeutique que les cellules sont capables de détourner des processus biologiques afin d'empêcher l'action du système immunitaire. Les cellules d'origine hématopoïétique peuvent jouer un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire tumorale, l'inflammation des tumeurs, la croissance tumorale ou encore la dissémination métastatique. On observe un double rôle des cellules immunitaires dans le développement et la progression du cancer. En effet, les LT cytotoxiques CD8 + et CD4 + Th1 ainsi que leurs cytokines sécrétées fonctionnent comme les principales cellules effectrices anti-tumorales. À l'inverse, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et leurs cytokines dérivées IL-6, TNF α , IL-1 β et IL-23 sont reconnus comme pouvant favoriser la tumeur (Zamarron et Chen 2011).

1. Les cellules de la lignée lymphoïde

Les lymphocytes T

Les LT font partie du système immunitaire adaptatif et permettent d'amplifier la réponse immunitaire contre un antigène spécifique et d'avoir une réponse mémoire. Au sein du microenvironnement tumoral, nous allons retrouver des LT CD8+ cytotoxiques dont le rôle va être de lyser les cellules cancéreuses, ce qui est en effet associé à un bon pronostic de survie des patients, de même que les LT CD4+ TH1 (Fridman et al. 2012). À l'inverse, d'autres populations LT CD4+ sont décrites pour être pro-tumorales, il s'agit plus précisément des cellules T régulatrices qui sont les LT CD4+ les plus décrits pour favoriser la croissance tumorale (Hsieh, Lee, et Lio 2012). Les T-Reg sont, en effet, capables de sécréter de l'IL-10 et du TGF- β , ce qui inhibe la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales par le système immunitaire (Campbell et Koch 2011). Enfin, nous avons vu précédemment que les LT ne sont pas capables d'éliminer correctement les cellules tumorales (Boon et al. 2006) à cause de différents mécanismes immunosuppresseurs. L'augmentation du récepteur PD-1 à la surface des LT et son interaction avec le ligand PD-L1 à la surface des cellules tumorales ou des cellules dendritiques et explique la dysfonction des LT (Robert et al. 2014).

Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont aussi issus de l'immunité adaptative et leur infiltration au sein d'une tumeur peut dans certains cas favoriser la progression du cancer par la sécrétion de cytokines pro-tumorales. En effet, des modèles précliniques ont permis de mettre en évidence que la présence des LB inhibe la réponse cytotoxique des LT (Qin et al. 1998). De plus, il existe une population de LB régulateurs qui favorise la progression tumorale en inhibant la réponse immunitaire spécifique à la tumeur par la conversion de LT CD4+ en cellules T régulatrices (Olkhanud et al. 2011). Dans le mélanome, les LB sont à la fois connus pour être un marqueur de bon pronostic de survie des patients puisqu'ils permettent de maintenir l'inflammation du mélanome et favoriser la réponse des cellules cancéreuses aux immunothérapies (Griss et al. 2019). Pourtant, les LB sont aussi connus pour être impliqués dans la résistance thérapeutique par la sécrétion d'IGF-1 (Somasundaram et al. 2017).

Les cellules « Natural Killer »

Les cellules "Natural Killer" NK sont un type de lymphocytes cytotoxiques de bon pronostic de survie dans les cancers colorectaux ou les cancers du poumon puisque leur rôle principal va être d'éliminer les cellules cancéreuses (Tachibana et al. 2005). Cependant, les cellules cancéreuses sont capables de produire du TGF- β , ce qui va alors empêcher l'action des NK présents dans le stroma (Fridman et al. 2012).

2. Les cellules de la lignée myéloïde

Les macrophages associés à la tumeur (TAM)

Les macrophages sont des cellules phagocytaires provenant du système immunitaire inné. Lors d'une réponse immunitaire, les macrophages vont être activés et polarisés en différents phénotypes en fonction des différents facteurs qui les affectent. Les macrophages activés sont le plus habituellement divisés en deux groupes, les macrophages M1 et les macrophages M2. Les macrophages M1 possèdent une réponse de type pro-inflammatoire, et ainsi favorise une réponse anti-tumorale. À l'inverse, les macrophages M2 sont impliqués dans des réponses anti-inflammatoires et ainsi pro-tumorales. Les macrophages associés à la tumeur (TAM) sont plus proches du phénotype M2 (Biswas et al. 2006) et leurs activités sont plutôt pro-tumorales avec notamment un impact sur la migration, l'invasion ou encore la formation de métastases (Condeelis et Pollard 2006). Dans le mélanome, les TAM peuvent être recrutés par la sécrétion de MCP-1 ou de VEGF par les cellules tumorales (Koga et al. 2008; Skobe et al. 2001).

Les cellules myéloïdes suppressives

Il est intéressant de noter qu'au sein du microenvironnement tumoral, nous retrouvons des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) définies comme des cellules immunitaires immatures et inhibitrices, qui peuvent se différencier en TAM (Sica et Bronte 2007), inhiber l'activation des LT CD8+ (Kusmartsev et al. 2004), induire le développement des T-Reg (Huang et al. 2006) ou encore entraîner la polarisation des macrophages en TAM (Sinha et al. 2007).

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigène qui jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire. En effet, ces cellules patrouillent dans l'environnement et sont capables de détecter la présence de pathogènes, de cellules altérées ou encore de cellules cancéreuses. Lors de l'absorption de l'antigène, les DC traitent et présentent l'antigène aux LT naïfs, déclenchant ainsi une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. Au sein du microenvironnement tumoral, les DC sont considérées comme des éléments centraux et peuvent favoriser les réponses anti-tumorales des LT (Wculek et al. 2020). Cependant, un microenvironnement suppressif peut altérer les fonctions des DC, favorisant la progression tumorale. Les DC présentent alors un rôle double et opposé dans la réponse immunitaire tumorale. En effet, elles peuvent entraîner la suppression de la réponse LT CD8+ cytotoxique (Fu et Jiang 2018) et exprimer de hauts niveaux de PD-L1 qui se lie aux récepteurs PD-1 des LT, empêchant alors leur action, ou encore stimuler la réponse T-Reg (Ito et al. 2007). D'un autre côté, le recrutement de DC matures dans le mélanome par l'utilisation d'un agoniste du récepteur TLR7 permet d'éliminer les cellules tumorales (Drobits et al. 2012).

Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent la population de cellules immunitaires la plus abondante soit entre 50 et 70% des leucocytes. Une augmentation du nombre de neutrophiles circulants est d'ailleurs observée dans certains cancers et notamment le mélanome cutané (Coffelt, Wellenstein, et de Visser 2016). Les neutrophiles vont avoir une importance dans l'initiation et la progression du cancer, et ils peuvent également jouer un rôle dans la formation de métastases en se liant aux cellules de mélanome, facilitant ainsi leur entrée dans la circulation et leur dissémination (Soler-Cardona et al. 2018). Une étude a montré que les neutrophiles étaient capables de produire des filaments de chromatine décondensée appelés NET pour « neutrophil extracellular traps » qui sont impliqués dans le réveil des cellules tumorales dormantes (Albregues et al. 2018). La suite de cette étude montre que la chimiothérapie est capable d'induire le recrutement de neutrophiles et de ces pièges extracellulaires NET, ce qui réduit la réponse thérapeutique dans des modèles murins de métastases pulmonaires de cancer du sein. Plus précisément, en réponse à la chimiothérapie, les cellules cancéreuses vont sécréter la cytokine IL-1 β qui à son tour déclenche la formation de NET qui vont par la suite activer le TGF- β latent, ce qui va ainsi favoriser une transition mésenchymateuse dans les cellules cancéreuses (Mousset et al. 2023).

B. Les cellules originaires du mésenchyme

1. Les cellules endothéliales

La progression tumorale est accompagnée d'une vascularisation accrue et assez désorganisée. Ce processus est appelé angiogenèse tumorale et vise à former de nouveaux vaisseaux sanguins au sein d'une tumeur. Ces vaisseaux sanguins tumoraux permettent de fournir de l'oxygène et des nutriments nécessaires à la croissance cellulaire, mais aussi d'éliminer les déchets des tissus tumoraux. De façon encore plus cruciale pour la tumeur, les vaisseaux sanguins permettent aussi de fournir une passerelle pour les cellules cancéreuses afin qu'elles entrent dans la circulation et disséminent dans les organes pour former des métastases (Folkman 2002). Les cellules endothéliales tumorales qui forment et tapissent ainsi l'intérieur des vaisseaux sanguins sont des acteurs importants de la tumorigenèse et de la dissémination métastatique. Le processus d'angiogenèse tumorale est favorisé par des niveaux augmentés des principaux facteurs angiogéniques. Nous retrouvons le facteur VEGFA qui favorise la prolifération des cellules endothéliales vasculaires et ainsi l'angiogenèse. Il existe aussi deux autres facteurs VEGFC et VEGFD sécrétés par les cellules cancéreuses et les macrophages qui induisent la prolifération et l'activation des cellules endothéliales lymphatiques et ainsi la lymphangiogenèse (Turley, Cremasco, et Astarita 2015; Alitalo 2011; Balkwill, Capasso, et Hagemann 2012). Les cellules endothéliales lymphatiques et les vaisseaux lymphatiques jouent alors un rôle important dans la progression du cancer, et en particulier l'invasion et la dissémination métastatiques des cellules cancéreuses puisque ces dernières peuvent aussi emprunter les vaisseaux lymphatiques pour disséminer dans les différents organes via les ganglions lymphatiques.

2. Les péricytes

En plus des cellules endothéliales, les vaisseaux sanguins sont aussi constitués de cellules péri-vasculaires dont les péricytes qui les entourent, jouent un rôle dans la contraction et la relaxation des vaisseaux sanguins et fournissent ainsi un support structural aux vaisseaux (Armulik, Genové, et Betsholtz 2011). Dans les cancers colorectaux et le cancer de la vessie, un faible taux de péricytes a été associé à un faible pronostic de survie des patients et à un fort potentiel métastatique (O'Keefe et al. 2008; Yonenaga et al. 2005). Cela s'explique par le fait que la déplétion des péricytes entraîne une perméabilité plus importante des vaisseaux sanguins, et ainsi une augmentation de l'hypoxie qui conduit à une augmentation des propriétés invasives et métastatiques des cellules cancéreuses (Cooke et al. 2012).

3. Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont des cellules stromales multipotentes avec des capacités d'auto-renouvellement et une capacité de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes ou encore adipocytes (Pittenger et al. 1999). Ces cellules sont présentes dans une variété d'endroits dans le corps et peuvent aussi migrer vers le stroma tumoral pour participer à la progression tumorale, en étant recruté par les facteurs solubles que les cellules cancéreuses sécrètent (Ridge, Sullivan, et Glynn 2017) Les MSC peuvent contribuer à la progression tumorale en interagissant avec les cellules cancéreuses et se différencier en différents types cellulaires. En effet, lorsque les MSC entourent une tumeur, elles peuvent après une stimulation par TGF- β ou SDF-1 sécrété par les cellules tumorales (S. Y. Ahn 2020) se différencier en cellules mésenchymateuses plus matures telles que les cellules endothéliales (Y. Zhou et al. 2013; Janeczek Portalska et al. 2012) ou les CAF (Direkze et al. 2004).

4. Les fibroblastes associés au cancer

Le dernier composant cellulaire et surtout le plus abondant au sein du microenvironnement que nous allons décrire dans cette partie sont les fibroblastes associés au cancer (CAF). Ce sont des fibroblastes activés qui

agissent comme un important carrefour de signalisation, mais aussi comme une machine de remodelage, et ce dans le but de favoriser la progression tumorale.

a) *Définition et origine des fibroblastes*

En condition physiologique, les fibroblastes sont le type cellulaire le plus abondant du derme. Ils ont été décrits dans les années 1850 comme étant des cellules sécrétant le collagène dans les tissus conjonctifs. En effet, les fibroblastes ont une morphologie étoilée avec de longs prolongements cytoplasmiques et possèdent la capacité de synthétiser de la MEC, montrant leur rôle important dans la cicatrisation des tissus. En fonction du contexte, les fibroblastes d'ordinaire quiescents vont s'activer pour devenir des myofibroblastes, en particulier lors d'un processus de cicatrisation, d'inflammation chronique ou encore dans le cadre d'une fibrose tissulaire (Darby et al. 2014; Desmoulière, Darby, et Gabbiani 2003; Micallef et al. 2012).

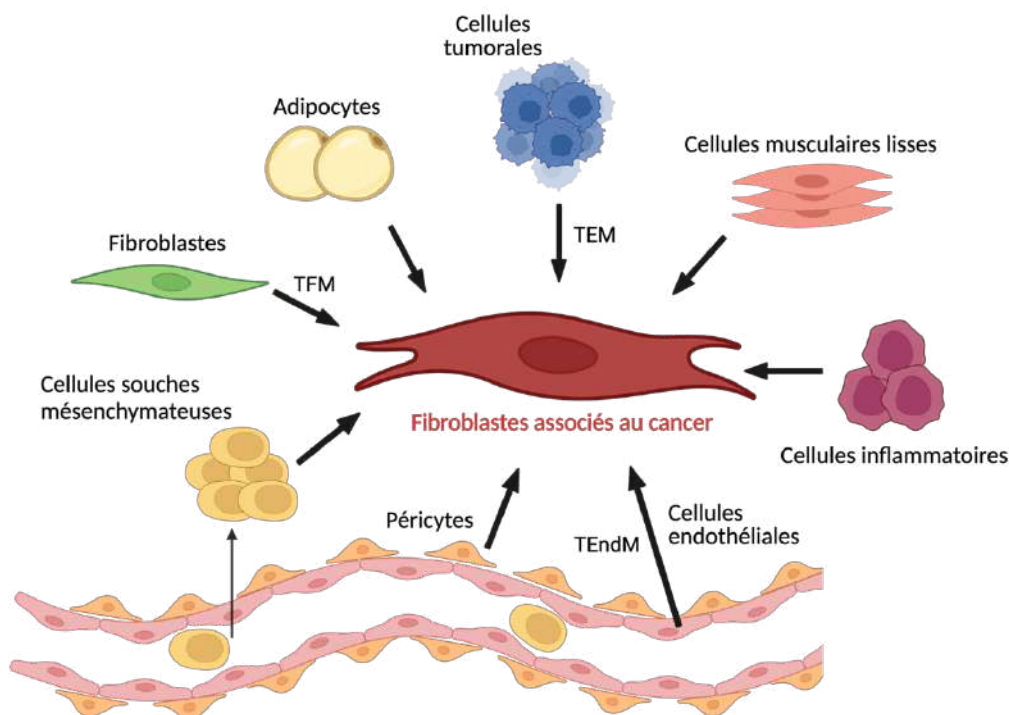


Figure 18 : Origines possibles des CAFs dans le microenvironnement tumoral

Les fibroblastes associés au cancer peuvent avoir plusieurs origines, et viennent soit de cellules résidentes soit de cellules qui peuvent transiter vers la tumeur. Les cellules peuvent par la suite subir différents processus de transition (fibroblastes-myofibroblastes, épithélio-mésenchymateuse, endothélio-mésenchymateuse) et de transdifférenciation (pour les péricytes, cellules musculaires lisses et adipocytes). Adapté de (Jing Zhang et Liu 2013).

Dans le contexte tumoral, de nombreux facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales mais aussi par les cellules immunitaires permettent de recruter et d'activer les fibroblastes en CAF. Certaines cytokines comme le TGF β ou les facteurs de croissance PDGF et FGF2 sont des médiateurs importants dans la conversion des fibroblastes en CAF (Elenbaas et Weinberg 2001). Plus récemment, une étude a montré le rôle de LIF, un membre de la famille des cytokines pro-inflammatoire IL-6 dans l'activation des fibroblastes. La sécrétion de LIF par les cellules tumorales soutient et favorise en effet la conversion pro-invasive des fibroblastes (Albregues et al. 2014). La majorité des CAF proviennent de fibroblastes résidents d'un tissu sain qui ont été activés par les différents facteurs sécrétés par les cellules tumorales. D'autres études ont montré que les MSC de la moelle osseuse peuvent se différencier en CAF dans les cancers du pancréas, du

sein ou encore le cancer gastro-intestinal (Quante et al. 2011). Les cellules épithéliales ainsi que les cellules endothéliales ont aussi été décrites comme pouvant donner origine aux CAF. En effet, ces cellules peuvent subir respectivement une transition épithélio-mésenchymateuse ou une transition endothélio-mésenchymateuse pour se transformer en CAF, et peuvent être amené à exprimer le marqueur FSP1 (Petersen et al. 2003; Zeisberg et al. 2007). Enfin, d'autres types cellulaires comme les adipocytes, les cellules musculaires lisses présentes dans le stroma, ou encore les péricytes peuvent subir une trans-différenciation mésenchymateuse et ainsi faire partie des progéniteurs des CAF (Xouri et Christian 2010; Sahai et al. 2020).

Une fois recrutés et activés, les CAF acquièrent des propriétés pro-tumorales, et présentent des caractéristiques morphologiques semblables à celles des myofibroblastes. Les CAF se distinguent des fibroblastes non activés par leurs caractéristiques morphologiques et par l'expression de certains marqueurs spécifiques. Par rapport aux fibroblastes non activés, les CAF ont une forme plus allongée, des noyaux dentelés, un réticulum endoplasmique rugueux plus important, un complexe de Golgi plus développé et un nombre plus important de fibres de stress (De Wever et al. 2008). En ce qui concerne les différents marqueurs, l' α -Smooth Muscle Actin (α SMA) a tout d'abord été identifiée dans les années 90 dans de nombreuses sous-populations de CAF, ce qui leur permet d'acquérir des capacités contractiles importantes (Lazard et al. 1993). Ces capacités contractiles vont permettre aux CAF de générer d'importantes forces de traction, entraînant le remodelage et la réticulation de la MEC dont ils sont les producteurs principaux. D'autres marqueurs peuvent aussi caractériser les fibroblastes activés comme FAP α , FSP1, Ténascine-C, SPARC, les récepteurs PDGFR α et PDGFR β , ou encore le récepteur DDR2 (Gascard et Tlsty 2016). Ces marqueurs sont connus pour être différemment exprimés d'un CAF à l'autre, indiquant l'existence de différents sous-types de CAF. Ainsi, les CAF représentent une population cellulaire très complexe et hétérogène.

b) Hétérogénéité des CAF

Comme les CAF ont pour origine différents types cellulaires et qu'ils expriment différents marqueurs, il n'est pas surprenant qu'il s'agisse d'une population très hétérogène (Sahai et al. 2020). Cette hétérogénéité des CAF a été étudiée dans le microenvironnement des cancers du sein et de l'ovaire. Cela a permis d'identifier 4 sous-populations de CAF différentes qui ont été caractérisées en fonction du niveau d'expression des différents marqueurs de CAF connus : FAP α , FSP1, α SMA, CAV1 et l'intégrine β 1 (Costa et al. 2018; Givel et al. 2018). Pour reconnaître les CAF, il est nécessaire d'utiliser une combinaison de ces marqueurs, puisqu'ils ne sont pas tous spécifiques aux CAF. Le marqueur α SMA représente par exemple un marqueur général des cellules mésenchymateuses comme les cellules musculaires lisses, le marqueur FSP1 est aussi exprimé dans les macrophages (Österreicher et al. 2011). FAP α est un marqueur exprimé par les fibroblastes activés dans 90% des cancers et peut jouer un rôle immunosuppresseur important dans le cancer du pancréas (Feig et al. 2013). La protéine peut aussi être exprimée par une sous-population de cellules immunitaires CD45+ (Arnold et al. 2014), mais aussi par les cellules de mélanome dédifférenciées (Girard et al. 2020). La première sous-population appelée CAF-S1 exprime des niveaux moyens d'intégrine β 1, élevée de FAP, faibles à élevés de FSP1, élevés de α SMA, moyens à élevés de PDGFR β , et faibles de CAV1. La sous-population CAF-S2 exprime de faibles niveaux d'intégrine β 1, négatifs de FAP, négatifs à faibles de FSP1, négatifs de α SMA, négatifs de PDGFR β , et négatifs de CAV1. Les CAF-S3 expriment des niveaux moyens d'intégrine β 1, négatif de FAP, moyens à élevés de FSP1, négatifs à faibles de α SM, moyens de PDGFR β et négatifs à faibles de CAV1. Enfin, la dernière sous population CAF-S4 exprime des niveaux élevés d'intégrine β 1, négatifs de FAP, faibles à moyens de FSP1, élevés de α SMA, faibles à moyens de PDGFR β et négatifs à faibles de CAV1. Les deux sous-populations CAF-S1 et CAF-S4 sont détectées au sein des tumeurs, alors que les CAF-S3 sont plutôt localisées au niveau juxta-tumoral. La population CAF-S2 se retrouve quant à elle dans les deux compartiments. Cette étude a par ailleurs montré que les CAF-S1 possèdent un rôle dans l'immunosuppression en attirant les LT, en entraînant leur différenciation en cellules CD25+ FOXP3+ et en améliorant la capacité des cellules Treg d'inhiber la prolifération des cellules T effectrices (Costa et al. 2018).

L'analyse de l'hétérogénéité des CAF au sein des sites métastatiques et plus spécifiquement au sein du ganglion lymphatique montre que les 4 sous populations que l'on retrouve dans la tumeur primaire sont également retrouvées dans le ganglion lymphatique. Plus particulièrement, les CAF-S1 et CAF-S4 ont été identifiés dans les tumeurs ainsi que dans les sites métastatiques, et contribuent à la formation de métastases grâce à leurs propriétés myofibroblastiques. Plus précisément, la population CAF-S1 est associée au remodelage de la MEC, et favorise la migration des cellules tumorales en activant la TEM via la voie TGF β et SDF-1. La population CAF-S4 possède des propriétés contractiles importantes et induit l'invasion en 3D des cellules tumorales via la voie Notch (Pelon et al. 2020; Costa et al. 2018; Givel et al. 2018).

L'hétérogénéité des CAF n'existe pas qu'au sein d'une même tumeur entre les différentes populations, mais elle est aussi présente au sein d'une même sous-population, puisque des groupes phénotypiques distincts ont été identifiés parmi les sous populations CAF-S1 et CAF-S4 (Mhaidly et Mechta-Grigoriou 2020). Dans l'adénocarcinome pancréatique, deux phénotypes distincts ont été identifiés parmi les CAF-S1 du microenvironnement tumoral. Le phénotype myofibroblastique (myCAF) produisent et remodelent la MEC, expriment un niveau élevé de α SMA, et se situent à proximité des cellules cancéreuses, alors que le phénotype inflammatoire (iCAF) secrètent des facteurs immunomodulateurs comme l'IL-6 (Öhlund et al. 2017). Des analyses récentes de séquençage ARN sur cellules uniques de la sous population CAF-S1 ont montré 5 clusters distincts dans la population myCAF et 3 clusters pour le phénotype iCAF. Les 5 clusters qui appartiennent au sous-groupe myCAF sont caractérisés par une forte expression de gènes codant pour les protéines de la MEC (ecm-myCAF), la voie de signalisation TGF β (TGF β -myCAF), la cicatrisation (wound-myCAF), la voie liée à l'interféron α/β (INF $\alpha\beta$ -myCAF), et la voie actomyosine (acto-myCAF). Les 3 clusters qui appartiennent à la population iCAF sont caractérisés par l'expression de la voie de détoxification (detox-iCAF), la voie de l'interleukine (IL-iCAF) et la voie liée à l'interféron γ (INF γ -iCAF) (Kieffer et al. 2020). De plus, au sein de la population des CAF-S1, l'expression de la protéine PDPN diffère également. Nous pouvons alors distinguer les CAF FAP α + PDPN+ et les CAF FAP α + PDPN- qui sont tous deux associés au remodelage matriciel, mais différent par le fait que les CAF FAP α + PDPN+ sont associés à une expression plus élevée des gènes liés à la signalisation du TGF β (Cremasco et al. 2018). Dans le cancer du sein et du poumon, deux molécules de surface CD10 et GPR77 définissent spécifiquement un sous-type de CAF FAP α + et α SMA qui favorisent la chimiorésistance en fournissant une niche de survie pour les cellules souches cancéreuses (Su et al. 2018). A ce jour, certaines études montrent aussi un rôle des CAF dans la suppression immunitaire et la résistance aux immunothérapies. En effet, certains sous-types spécifiques de myCAF comme les ecm-myCAF et TGF β -myCAF ont un effet direct sur l'expression de PD-1 et CTLA-4 (Kieffer et al. 2020). Dans le contexte du mélanome métastatique, les auteurs ont effectué une analyse d'enrichissement des gènes des signatures spécifiques aux différents sous-types de CAF-S1 sur les patients traités avec le Pembrolizumab en fonction de leur réponse au traitement. Les patients présentant une progression évidente de la maladie sont classés comme non-répondeurs alors que les patients qui montrent une réponse partielle ou totale sont classés comme étant répondeurs. Ainsi, leurs données montrent que les patients non-répondeurs présentent une augmentation significative de l'expression des gènes associés aux phénotypes ecm-myCAF, TGF β -myCAF et wound-myCAF dans les tumeurs au moment du diagnostic, en comparaison aux patients répondeurs. La présence de ces sous-types de CAF-S1 prédit alors une résistance aux immunothérapies (Kieffer et al. 2020). Cette étude est un bon premier exemple de la manière dont les CAF et la MEC produite contribuent à la résistance thérapeutique dans le cancer.

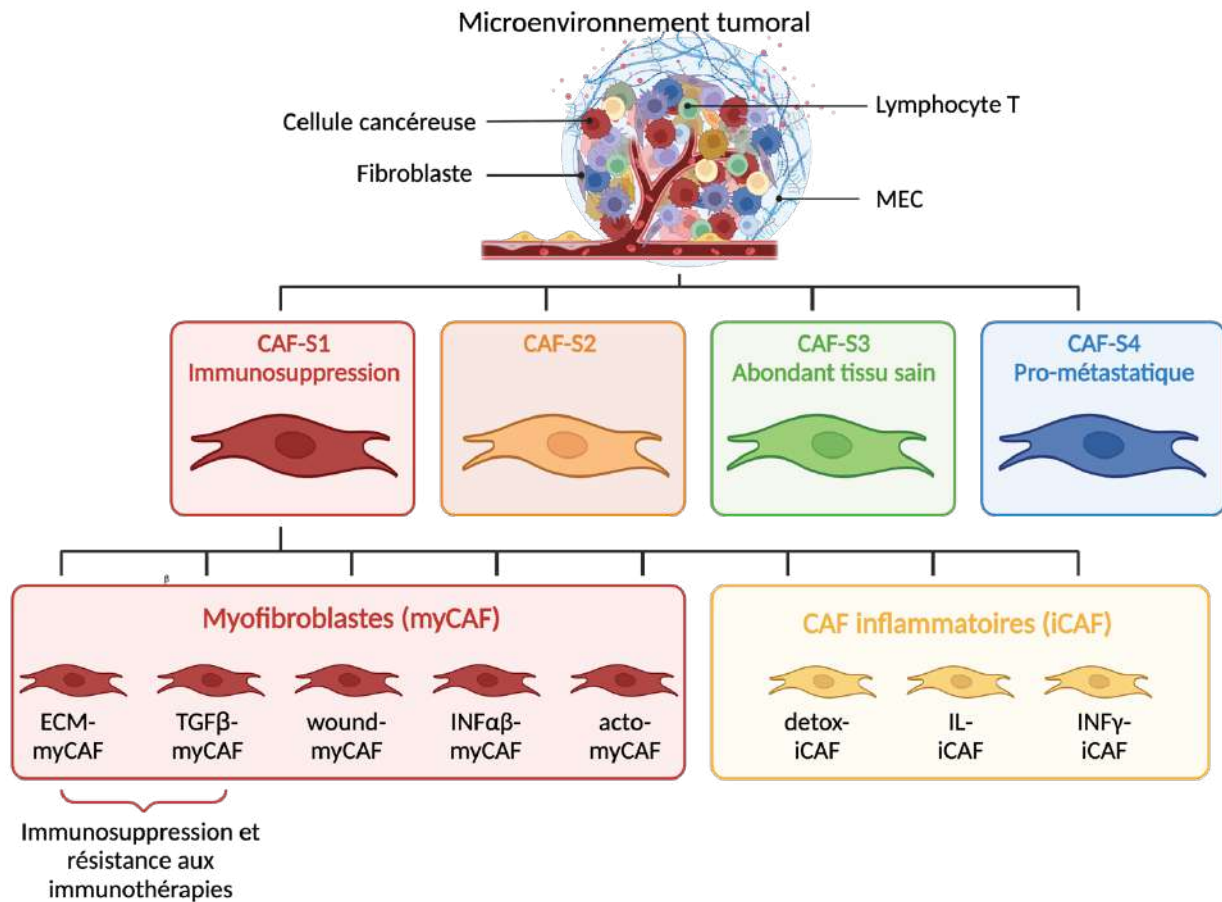


Figure 19 : Représentation schématique de l'hétérogénéité des CAFs

Les CAF représentent une population cellulaire hétérogène au sein du microenvironnement tumoral. En combinant l'analyse de six marqueurs CAF (CD29, FAP, FSP1, α SMA, PDGFR β et CAV1), quatre populations différentes de CAF (appelées CAF-S1 à CAF-S4) ont été découvertes dans les cancers du sein et de l'ovaire. De plus, l'analyse de cellules uniques permet l'identification de 8 clusters différents au sein du sous-ensemble CAF-S1 avec 3 clusters appartenant au sous-groupe iCAF et 5 clusters au sous-groupe myCAF. ECM-myCAF et TGF β -myCAF présentent tous deux une fonction immunosuppressive et sont associés à une résistance à l'immunothérapie. Adapté de (Mhaidly et Mechta-Grigoriou 2020).

c) *Rôle des CAF dans le cancer*

Les CAF sont des acteurs importants de la progression tumorale dans le microenvironnement et jouent un rôle dans la majorité des processus conduisant à la tumorigenèse. Ils contrôlent en effet la plupart, si ce ne sont toutes les « hallmarks » du cancer (Hanahan et Weinberg 2011). Ils participent à chacune des étapes de la progression tumorale, de l'initiation tumorale à la formation et l'établissement de métastases dans les organes distants du site primaire. Pour se faire, les CAF sont capables de remodeler la MEC ou de sécréter des facteurs solubles comme des cytokines ou des facteurs de croissance. Ils vont ainsi affecter directement les caractéristiques tumorales des cellules malignes ou l'action des cellules stromales avoisinantes (comme les cellules immunitaires ou endothéliales) par leur sécrétome et moduler ainsi la réponse immunitaire, l'inflammation ou encore l'angiogenèse. Leur capacité de déposer et de remodeler la MEC permet aussi de créer un environnement fibrotique favorable à l'invasion des cellules cancéreuses et à une réaction inflammatoire pro-tumorale (Lu, Weaver, et Werb 2012).

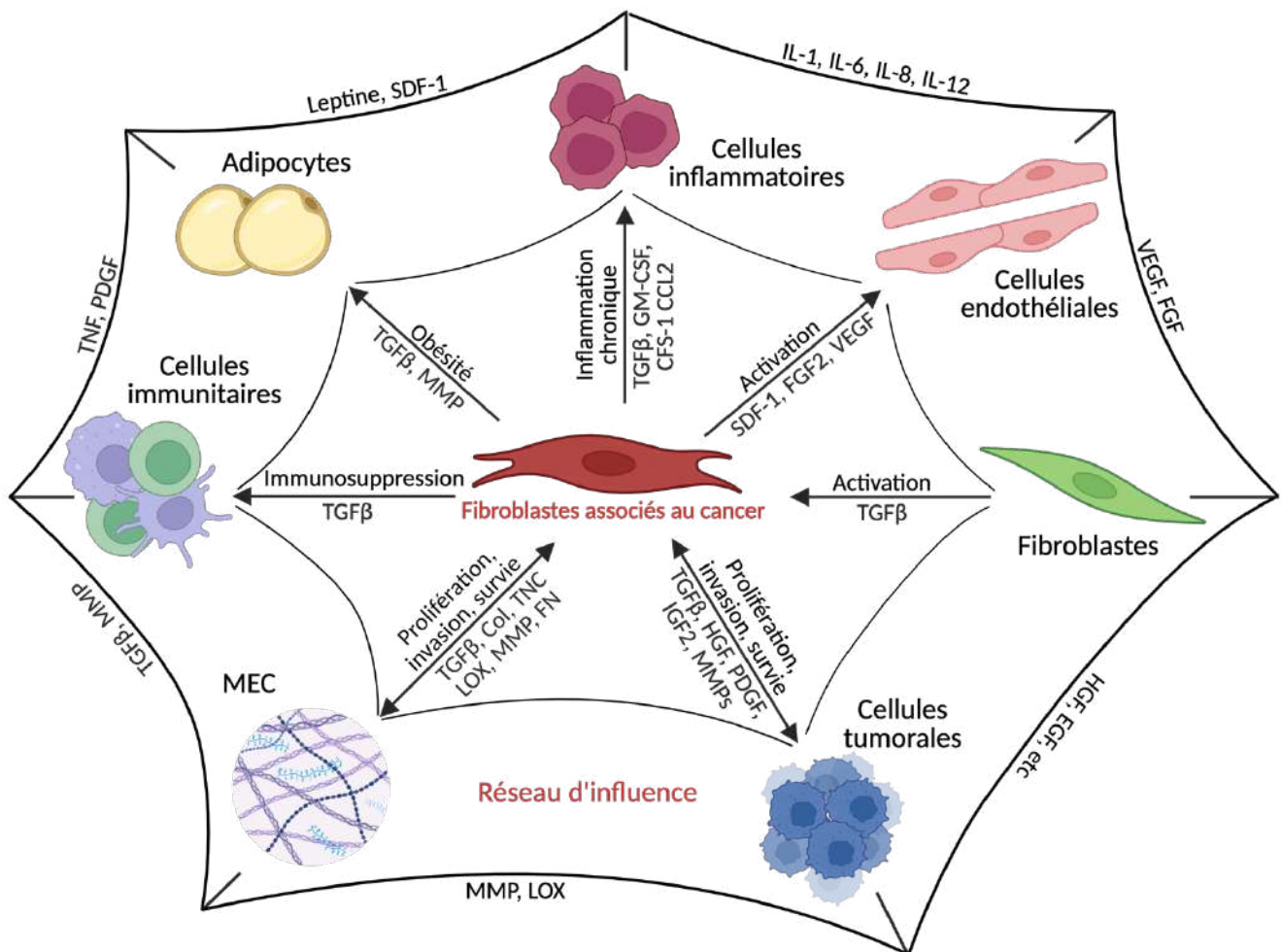


Figure 20 : Interactions des CAF avec les différentes cellules stromales et leurs rôles dans la progression tumorale

Les CAF peuvent favoriser la tumorigenèse directement par le biais de multiples mécanismes, notamment une angiogenèse accrue, une prolifération, une invasion et une inhibition de la mort des cellules tumorales. Ces effets sont médiés par l'expression et la sécrétion de nombreux facteurs de croissance, cytokines, protéases et protéines de la matrice extracellulaire, telles que SDF-1, FGF2, VEGF, TGF-β, HGF, ténascine-c, LOX et MMP. Les CAF peuvent en outre influencer indirectement la tumorigenèse par le biais d'effets sur une multitude d'autres types cellulaires, notamment les adipocytes et les cellules immunitaires. Adapté de (Brennen, Isaacs, et Denmeade 2012).

Les premières observations du rôle des CAF dans l'initiation du cancer ont été réalisées dans les années 90. En effet, la co-injection de CAF avec des cellules non cancéreuses de prostate a permis à ces dernières de former des tumeurs (Camps et al. 1990). La sécrétion d'hormones, de cytokines, de facteurs de croissance, comme l'HGF, le FGF, l'EGF, le SDF-1, le CCL5, le VEGF, l'IL-6 ou de protéases et d'enzymes matricielles comme les MMPs ou les LOXs par les CAF influence la prolifération, l'invasion et la survie des cellules tumorales (Kalluri 2016; Brennen, Isaacs, et Denmeade 2012). Les CAF peuvent aussi influencer la tumorigenèse indirectement en agissant sur différents types cellulaires, comme les adipocytes ou les cellules immunitaires, et ces signaux paracrines vont impacter la progression tumorale. La sécrétion de SDF-1 et VEGF par les CAF permet par exemple de recruter les cellules endothéliales et ainsi de favoriser l'angiogenèse (Fukumura et al. 1998; Orimo et al. 2005). Comme nous l'avons vu précédemment, les CAF peuvent aussi avoir un rôle immunomodulateur. La population de fibroblastes CAF-S1 est décrite comme étant immunosuppressive (Costa et al. 2018). La sécrétion d'IL-6 par les CAF inhibe l'activation des cellules dendritiques et des lymphocytes T (Park et al. 2004). Le TGFβ produit par les CAF peut être à l'origine d'une inhibition de la fonction des cellules inflammatoires et d'une transformation des LT en LTreg (Chen et al. 2003). De plus la

sécrétion de CCL2 entraîne un recrutement des macrophages qui favorisent le développement tumoral (Kehrl, Roberts, et al. 1986; Kehrl, Wakefield, et al. 1986).

L'invasion et la dissémination des cellules cancéreuses peuvent aussi être facilitées par les CAF et leur capacité de remodeler dynamiquement la MEC (De Wever et al. 2014). En effet, les CAF peuvent sécréter des protéases qui dégradent la MEC, ce qui aide les cellules tumorales à quitter la tumeur primaire (Kalluri et Zeisberg 2006), et peut aussi créer des chemins d'invasions pour les cellules tumorales. L'analyse d'images de l'invasion collective de co-culture entre des fibroblastes et des cellules de carcinomes montrent que le fibroblaste va toujours guider l'invasion des cellules de carcinome et que ces dernières suivent le chemin d'invasion créé par le fibroblaste (Gaggioli et al. 2007). Enfin, dans le mélanome, les MMP produites par les CAF jouent un rôle important dans l'invasion tumorale (Zhou et al. 2015). Même si les CAF sont des acteurs importants de la cancérogenèse, leur déplétion peut avoir des conséquences désastreuses sur le développement de la tumeur. En effet, l'adénocarcinome canalaire pancréatique est caractérisé par une importante fibrose due à la présence de myofibroblastes dans le stroma tumoral. Comme montré dans un modèle murin déplété en myofibroblastes α SMA+, la déplétion des CAF entraîne une augmentation des propriétés invasives des cellules cancéreuses, et favorise la TEM et le développement des cellules souches cancéreuses. Une diminution des myofibroblastes est alors associée à une plus faible survie (Özdemir et al. 2014). Ainsi, une stratégie intéressante serait de « normaliser » le stroma tumoral pour qu'il soit moins favorable au développement du cancer, notamment par le ciblage de l'organisation ou de composants de la MEC dont nous allons étudier les rôles à présent.

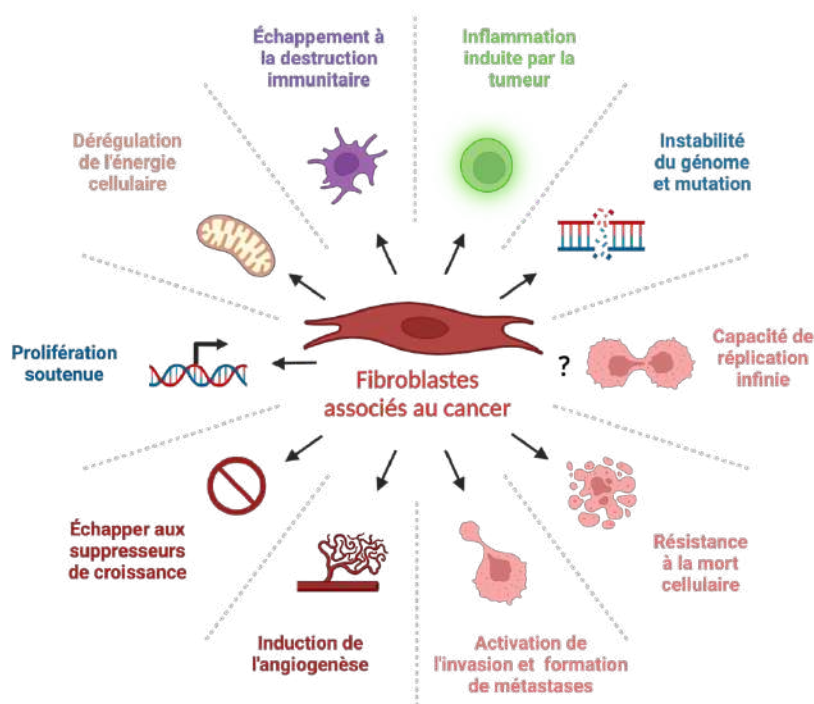


Figure 21 : Rôles des CAF dans les propriétés tumorales

Les CAFs représentent une composante essentielle de la progression tumorale, puisqu'ils contrôlent la plupart, si ce ne sont toutes les « hallmarks of cancer » (Hanahan et Weinberg 2011). Ils peuvent affecter directement les propriétés tumorales des cellules malignes adjacentes et des cellules stromales avoisinantes via leur sécrétome, en modulant ainsi l'action des cellules immunitaires et des cellules endothéliales. Ils participent ainsi à l'inflammation et l'angiogenèse tumorale. Ils ont également la capacité de déposer et de remodeler la matrice créant de ce fait un environnement fibrotique qui devient favorable à l'invasion des cellules cancéreuses et à une réaction inflammatoire pro-tumorale. Adapté de (Tommelein et al. 2015).

II. Les composants non cellulaires du microenvironnement tumoral

A. Les composants non matriciels

Nous avons vu précédemment l'importance de la sécrétion de cytokines et facteurs de croissance par les CAF dans la progression tumorale des cellules cancéreuses. Outre le contact cellule-cellule direct, la signalisation paracrine par la libération de cytokines, chimiokines, protéases, métabolites et facteurs de croissance est essentielle pour la communication entre les cellules du microenvironnement tumoral. Ces molécules sont sécrétées en réponse à un stress cellulaire ou aux caractéristiques intrinsèques des cellules cancéreuses et dérivées de plusieurs types cellulaires pour exercer des actions diverses sur les cellules cibles en se liant sur leurs récepteurs ou par remodelage de la MEC. Les facteurs de croissance au sein du microenvironnement ont été décrits pour favoriser le développement du cancer, et la formation de métastases. Ils vont permettre de maintenir une communication entre les différentes populations de cellules en se liant à leurs récepteurs spécifiques. Le VEGF est connu pour recruter les cellules endothéliales et favoriser ainsi l'angiogenèse tumorale (Carmeliet et Jain 2011). Le facteur HGF est permet l'activation de fibroblastes normaux en CAF (X. Wu et al. 2013), et PDGF est un facteur important dans la communication entre les cellules cancéreuses et les CAF (Chu et al. 2014). Dans le microenvironnement tumoral, nous retrouvons aussi de nombreuses cytokines comme les interleukines, la famille des TNF, des interférons et du TGF β qui influencent la progression tumorale en participant à la communication paracrine entre les cellules tumorales et les cellules stromales. Les cytokines vont permettre de favoriser la croissance tumorale en régulant par exemple le recrutement des cellules immunitaires (Dranoff 2004). En effet, l'IL-6 sécrétée est capable d'augmenter la survie des cellules cancéreuses par l'activation de leur voie de réparation des dommages à l'ADN (N. Kumari et al. 2016) et l'IL-35 peut par exemple permettre le recrutement des macrophages afin qu'ils créent un environnement pro-inflammatoire (Zou et al. 2016). Les métabolites produits par les CAF dans l'espace extracellulaire sont riches en énergie comme les corps cétoniques, la glutamine ou encore le lactate et participent à la croissance tumorale (Kalluri 2016). Le lactate produit par les cellules cancéreuses est d'ailleurs connu pour promouvoir la croissance tumorale en entraînant une diminution de la production d'INF γ par les lymphocytes T et ainsi en empêchant l'activation des NK (Brand et al. 2016). Enfin, la libération de vésicules extracellulaires (EV) comme les exosomes représente un autre mécanisme paracrine qui peut modifier l'environnement. Dans le mélanome, les EV peuvent éduquer les cellules pro génitrices de la moelle osseuse via le récepteur MET et ainsi favoriser la formation de métastases (Peinado et al. 2012). Au sein du microenvironnement, nous pouvons aussi retrouver les fibres nerveuses qui composent les systèmes nerveux sympathiques, et parasympathiques et participent au maintien de l'homéostasie des organes périphériques. Dans certains cancers épithéliaux, les tumeurs sont entourées de nerfs qui sont envahis de cellules tumorales, laissant alors suggérer que les fibres nerveuses représentant là encore une voie de signalisation (Magnon et al. 2013).

B. La Matrice ExtraCellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau complexe de macromolécules et représente le composant non cellulaire majeur du microenvironnement des organes et des tissus. Elle joue un rôle important dans la régulation du développement, la fonction et l'homéostasie cellulaire (Rozario et DeSimone 2010). Elle permet de fournir un support physique aux cellules et participe activement à l'établissement et au maintien de tissus et organes différenciés en régulant l'abondance des facteurs de croissance et récepteurs, le niveau d'hydratation et le pH de l'environnement. Bien que la MEC soit composée majoritairement de polysaccharides, de protéines et d'eau, elle présente une spécificité importante au tissu qu'elle entoure. Cela est dû à sa composition et sa topographie uniques qui sont générées par les signaux biochimiques et biophysiques que la MEC fournit (Naba et al. 2012). Elle représente une structure dynamique dans laquelle ses composants sont déposés, dégradés et modifiés et subit ainsi un remodelage en réponse à des stimuli environnementaux, ce qui permet de maintenir l'homéostasie et de répondre aux différents stress. En revanche, une dynamique anormale de la MEC ainsi qu'une dérégulation d'un de ses processus de maintien de l'homéostasie peut entraîner des pathologies comme la fibrose ou le cancer (Lu et al. 2011).

1. Composition de la MEC

La MEC est composée de protéines macromoléculaires qui peuvent être classées en quatre groupes : les collagènes, les protéoglycanes, les glycoprotéines et les élastines qui vont représenter la structure de la MEC. Ajouté à cela, nous retrouvons des protéines matricellulaires, des protéines associées à la MEC, des protéines régulatrices de la MEC et des facteurs sécrétés. Ces différentes familles de protéines sont ainsi regroupées en deux groupes : le « core matrisome » qui contient les protéines de structure de la MEC et le groupe « extracellular matrix associated proteins » composé des protéines associées à la MEC (Naba et al. 2012).

a) *Les macromolécules fibreuses*

L'élastine

L'élastine contribue aux caractéristiques élastiques de certains tissus et ainsi à la résistance mécanique. Cette molécule hydrophobe est organisée en fibre, et est fortement réticulée. L'élastine est constituée de plusieurs molécules de tropoélastine réticulées. On la retrouve dans les tissus qui sont dotés d'une forte résilience comme la peau, les artères ou les poumons (Debelle et Alix 1999).

Les collagènes

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes au niveau de la MEC et représentent plus de 30% de la masse protéique totale d'un organisme multicellulaire animal (Frantz, Stewart, et Weaver 2010). Ils sont principalement produits par les fibroblastes et permettent de réguler l'adhésion cellulaire et de favoriser la migration. La famille des collagènes est constituée de 28 types de collagènes différents qui sont formés par au moins 46 chaînes polypeptidiques (chaîne α) différentes. Les collagènes sont, en effet, formés de trois hélices de chaînes polypeptidiques (chaîne α) qui s'assemblent en molécules homodimérique ou hétérodimérique selon le type de collagène considéré. Ils sont alors classés en 7 groupes différents selon leur fonction, leur structure et homologie de domaine (Theocharis et al. 2016). Les collagènes fibrillaires sont le groupe le plus fréquent, et s'assemblent en triples hélices qui vont ensuite s'auto-assembler en fibrilles plus ou moins épaisses. À l'inverse, les collagènes non fibrillaires comme le collagène de type IV vont former des réseaux de maillage. Les fibroses sont caractérisées par un dépôt anormal de fibres de collagène de type I et de type III ainsi que d'une dégradation accrue de collagène de type IV dus à une augmentation de l'activité inflammatoire et de la sécrétion de cytokines comme le TGF β (Huijbers et al. 2010; Kauppila et al. 1998). La communication entre les collagènes et les cellules est médiée par des récepteurs de surfaces dont les collagènes sont les substrats. Les trois principales familles de récepteurs sont les intégrines, les DDR et les glycoprotéines VI (Leitinger et Hohenester 2007). Les collagènes ne sont pas seulement qu'un support structurel pour les tissus, ils agissent aussi comme des molécules de signalisation qui influence le comportement cellulaire. En effet, au niveau des tumeurs, les CAF vont organiser les fibrilles de collagène en feuillettes et câbles, et modifier l'alignement des fibres (Frantz, Stewart, et Weaver 2010). Cette restructuration physique du collagène va induire une rigidification importante de la MEC et avoir ainsi un effet sur certaines propriétés de la cellule cancéreuse dont l'expression de certains gènes, la survie, ou la migration des cellules (Egeblad, Rasch, et Weaver 2010a).

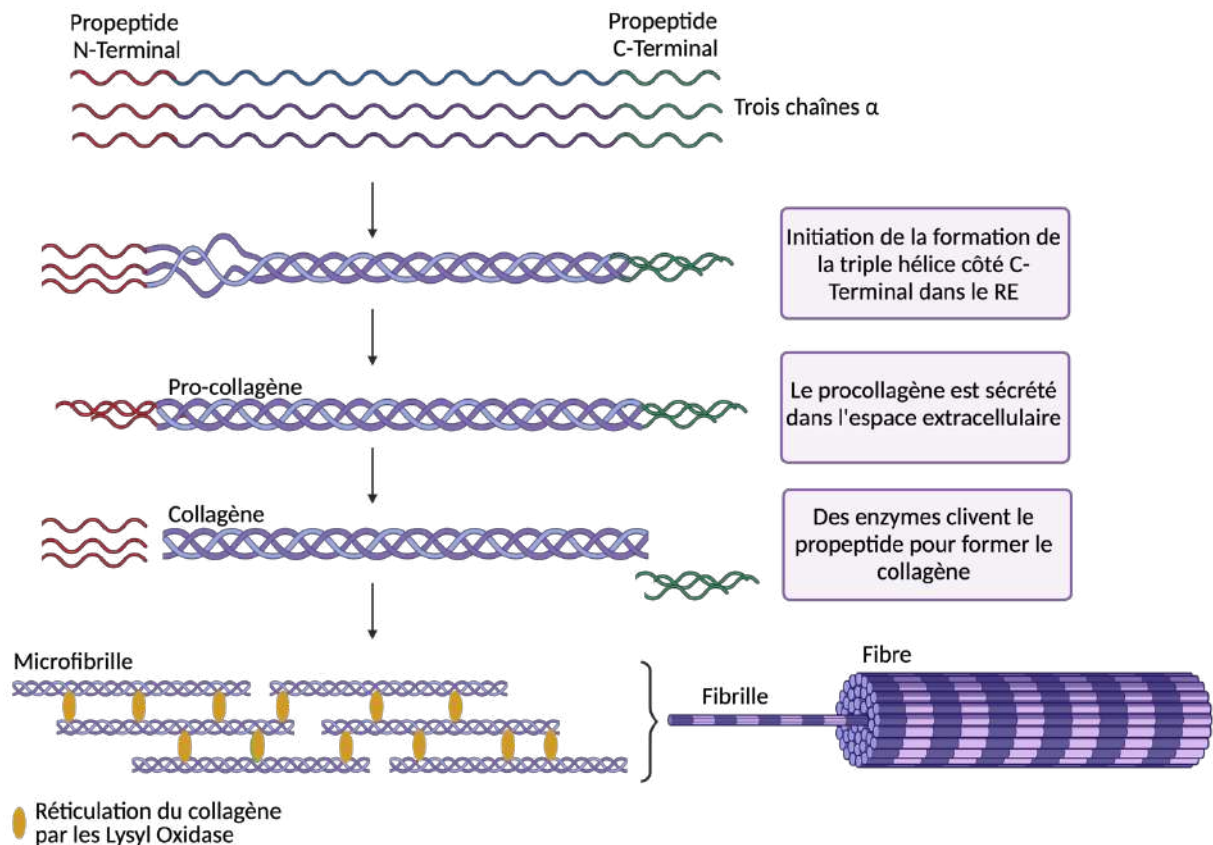


Figure 22 : Étapes de formation des fibres de collagène

Plusieurs étapes distinctes définissent l'assemblage des fibres de collagène. Après la transcription et la traduction des chaînes α du procollagène, celles-ci sont importées dans le réticulum endoplasmique rugueux et modifiées pour former du pro-collagène à triple hélice. Le pro-collagène est par la suite sécrété dans l'espace extracellulaire et clivé pour former la molécule de collagène. Les Lysyl Oxidases vont permettre une réticulation des molécules de collagène pour stabiliser et former sa structure en fibrilles qui s'assemblent par la suite en fibres. Adapté de (Mouw, Ou, et Weaver 2014).

b) Les macromolécules glycoprotéiques

Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PG) sont des molécules biologiques composées d'une protéine centrale spécifique liée à différentes chaînes polysaccharides de glycosaminoglycanes (GAG). Leur structure exacte et le nombre de chaînes sont dépendants du tissu dans lequel les PG se trouvent et sont d'ailleurs divisées en différents groupes selon leur localisation. Nous retrouvons ainsi les PG extracellulaires que l'on retrouve dans la MEC, les PG péricellulaires ou encore les PG de surface. Quatre classes de GAG différentes ont aussi été identifiées : le sulfate d'héparane, le sulfate de chondroïtine, le sulfate de kératane et l'acide hyaluronique. Grâce à leurs charges négatives, les GAG ont des molécules hydrophiles qui confèrent à la MEC un « état hydrogel » typique et permet ainsi de fournir une hydratation et une résistance à la compression (Schaefer et Schaefer 2010; L. Zhang 2010). Enfin, les PG ont la capacité de se lier à d'autres protéines matricielles et sont donc impliquées dans l'organisation de la MEC. Ces protéines jouent un rôle important dans le développement de pathologies comme les cancers, la production d'acide hyaluronique par les CAF joue en effet un rôle dans la tumorigenèse du cancer du poumon (Brichkina et al. 2016).

La fibronectine

La fibronectine fait partie de la famille des glycoprotéines qui peuvent se lier aux autres molécules de la MEC (comme le collagène), à des molécules d'adhésion cellulaire (comme les intégrines) ou à certains facteurs de croissance sécrétés pour contribuer à ce que la MEC soit un réseau cohésif de protéines. La fibronectine est une grosse protéine composée de deux sous-unités qui sont connectées de façon covalente par un pont disulfure au niveau de leur domaine C-terminal. Les deux sous-unités sont constituées de trois structures répétées nommées type I, type II et type III (Zollinger et Smith 2017). Il existe deux formes de la fibronectine, la forme plasmatique circulante, et la forme cellulaire appelée aussi « oncofœtale ». La fibronectine existe sous différentes isoformes qui sont dues à un épissage alternatif de certains domaines. Il a été montré que la fibronectine contenant le domaine III défini comme ED-A est fortement exprimée dans les myofibroblastes et dans les mélanomes primaires et métastatiques (Schwarzbauer 1991). La fibronectine est le composant le plus important de la MEC qui lui donne sa consistance. Elle sert d'intermédiaire entre les différentes protéines matricielles, mais aussi entre les cellules et la MEC. La fibronectine possède différents domaines de liaison, qui permettent à la fibronectine de se lier par exemple à des protéoglycanes, des glycosaminoglycanes ou encore des intégrines qui est le récepteur principal de la fibronectine. Elle est synthétisée par différents types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules tumorales, les macrophages ou encore les cellules endothéliales. Et il est intéressant de noter qu'il existe un lien réciproque entre le collagène et la fibronectine. Sans un dépôt de fibronectine, le collagène ne peut pas former de matrice, mais une fois que le collagène est déposé, il délimite le dépôt de fibronectine (Sottile et Hocking 2002). En condition physiologique, la fibronectine est importante pour les processus de cicatrisation ou dans la régulation des propriétés d'adhésion et migration cellulaire (Lenselink 2015). Dans le contexte tumoral, la fibronectine est impliquée dans la prolifération, la migration ou encore l'angiogenèse pour faciliter la progression cancéreuse (Rick et al. 2019). Plus précisément dans le mélanome, la fibronectine favorise la migration et l'invasion des cellules de mélanome mutées BRAFV600E (Gaggioli et al. 2007b).

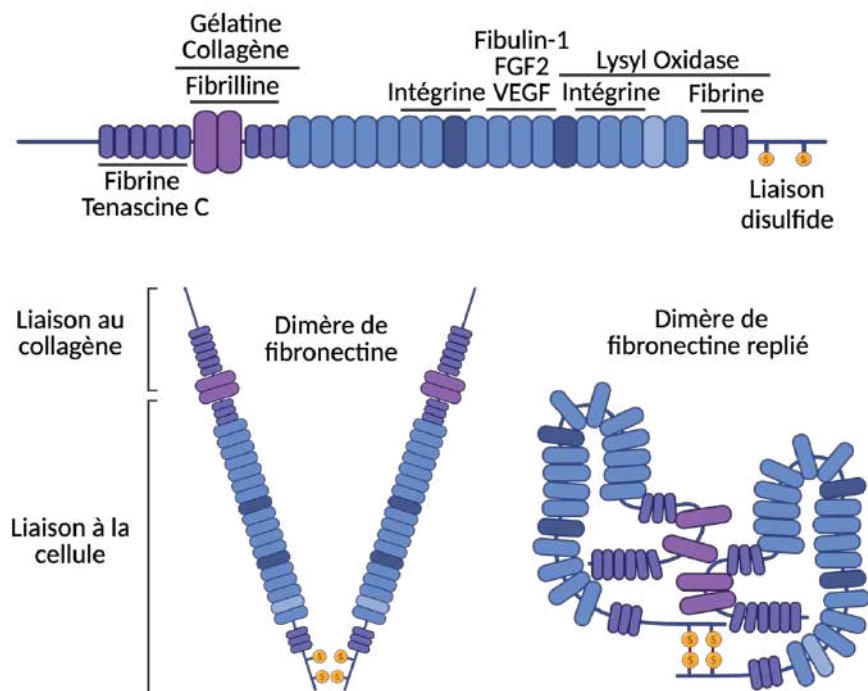


Figure 23 : Structure de la fibronectine

Schéma de la structure de la fibronectine qui est composée de deux chaînes d'acides aminés jointes par un pont disulfure proche des résidus carboxy-terminaux. Les domaines d'interaction avec d'autres protéines matricielles et les intégrines sont indiqués. Adapté de (Mouw, Ou, et Weaver 2014) et (Van Obberghen-Schilling et al. 2011).

Les laminines

La laminine est un composant abondant de la lame basale qui sépare l'épiderme du derme. Elle consiste en un hétérotrimère de trois peptides alpha, beta et gamma qui sont connectés au centre. Il existe 5 types de chaîne alpha, 3 types de chaîne beta et 3 types de chaîne gamma, ce qui conduit à la possibilité de former 16 sous-types de laminines différentes (Aumailley 2013). En plus de leurs fonctions structurales dans la MEC, ces protéines peuvent avoir une influence sur les fonctions cellulaires puisqu'elles peuvent se lier à différents récepteurs comme les intégrines, les syndécans ou encore récepteur EGFR (Theocharis et al. 2016). Elles peuvent participer à la progression tumorale, en ayant un impact sur la prolifération, la TEM, ou encore la migration cellulaire (Ishikawa et al. 2014; Patarroyo, Tryggvason, et Virtanen 2002).

c) Les protéines matricielles

Les protéines matricielles sont des protéines non structurales de la MEC qui sont impliquées dans les interactions intercellulaires ou entre les cellules et la MEC présente dans leur microenvironnement. Elles modulent ainsi certaines propriétés cellulaires, et leur expression augmente en condition pathologique (Alford et Hankenson 2006). Parmi les différentes protéines matricielles, nous pouvons retrouver les thrombospondines, l'ostéopontine, l'ostéonectine (SPARC), ou encore les ténascines.

SPARC (ou ostéonectine)

SPARC est une glycoprotéine sécrétée par de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes ou encore les cellules tumorales. Elle fait partie de la famille des protéines matri-cellulaires et contrôle l'interaction des cellules à la MEC. SPARC joue en plus un rôle important dans l'organisation biologique de la MEC par son interaction avec le collagène de type I et l'intégrine $\beta 1$. De plus, *in vivo*, les souris KO pour SPARC présentent un défaut d'assemblage de la MEC, qui est la conséquence d'une désorganisation et d'une production différente des fibres de collagène (Bradshaw et al. 2003). Les protéines matri-cellulaires peuvent aussi réguler certains processus cellulaires de façon extracellulaire ou intracellulaire. Concernant SPARC, elle peut être sécrétée par les cellules de mélanome, et agir de façon paracrine en se liant au récepteur VCAM1 des cellules endothéliales pour entraîner une perméabilité vasculaire qui aide à l'extravasation et à la dissémination des cellules tumorales (Tichet et al. 2015). Par ailleurs, l'équipe a également montré qu'en agissant de façon autocrine, SPARC favorise la prolifération et la survie des cellules de mélanome en inactivant p53 via la phosphorylation de MDM2 par AKT (Fenouille et al. 2011 et Fenouille 2011b) ainsi que la TEM et l'invasion tumorale via l'expression des facteurs de transcription SNAIL (Robert et al. 2006; Fenouille et al. 2012).

Les ténascines

Les ténascines (TN-C, TN-R, TN-W, TN-X, TN-Y) sont une famille de glycoprotéines impliquées dans le développement des organes. Elles sont fortement exprimées dans le microenvironnement tumoral, et leur sécrétion par les cellules tumorales et les fibroblastes est régulée par la voie du TGF β . Dans la fibrose, les ténascines sont impliquées dans l'inflammation et le recrutement et la différenciation des myofibroblastes (Kasprzycka, Hammarström, et Haraldsen 2015). Dans les cancers, les ténascines ont un rôle dans la survie et la formation de métastases (Midwood et al. 2016). La TN-C favorise en effet la TEM dans le cancer colorectal via sa régulation par la β -caténine (Beiter et al. 2005).

d) *Les enzymes de remodelage de la MEC*

Plusieurs enzymes sont responsables du remodelage matriciel qui a lieu dans le cadre des fibroses et des cancers. Il s'agit principalement d'enzymes qui sont impliquées dans la modification du collagène comme les métalloprotéases (MMP) ou les lysyl oxydases (LOX) qui sont anormalement exprimées dans les transformations malignes.

Les enzymes de dégradation de la MEC

Les principales enzymes de dégradation de la MEC sont les métalloprotéases (MMP) matricielles qui sont classées en 6 différents groupes : les collagénases, les stromélysines, les matrilysines, les gélatinases, les MT-MMP et les autres MMP. Nous comptons ainsi 23 MMP chez l'Homme. Ce classement est basé sur les spécificités de substrat, sur l'organisation de leurs domaines protéiques, et sur les similarités entre les différentes séquences. Par exemple, la caractéristique principale du groupe des collagénases est leur capacité de cliver les collagènes interstitiels I, II et III. Les gélatinases peuvent digérer facilement les collagènes dénaturés, et les gélatines. Elles sont d'ailleurs connues pour leur importance dans la dégradation de la lame basale, permettant ainsi l'invasion des tumeurs malignes. Les matrilysines vont quant à elles traiter les molécules de surface comme le Fas-ligand, le TNF α ou encore l'E-cadhérine (Visse et Nagase 2003). Les MMP sont produites par de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales, et les cellules tumorales, et sont capables de dégrader tous les composants de la MEC. Leur expression est induite par des cytokines ou des facteurs de croissance, par la transformation oncogénique, par le stress physique, ou encore par les interactions cellules-cellules ou cellules-matrice. Cependant, la plupart des MMP sont sécrétées sous forme de zymogènes inactifs qui sont activés protéolytiquement dans l'espace péricellulaire par des protéinases ou d'autres MMP. En effet, les cellules collaborent entre elles pour activer la cascade protéolytique après la stimulation (Vihinen et Kähäri 2002). Les cellules stromales peuvent par exemple sécréter une MMP2 inactive qui va être activée par la MMP membranaire des cellules cancéreuses (MT1-MMP) (Stahtea et al. 2007). De façon intéressante, la dégradation de certains composants matriciels par les MMP génère des fragments appelés matrikines qui sont capables de réguler des processus cellulaires par leur liaison à des récepteurs. Les matrikines sont en effet impliquées dans l'inflammation, les réponses immunitaires, l'angiogenèse, la progression tumorale et la formation de métastases puisqu'ils ont des effets sur la migration cellulaire, la chimiotaxie et la mitogenèse (Wells, Gaggari, et Blalock 2015). Enfin, il est important de noter que les MMP peuvent libérer des cytokines ou des facteurs de croissance, en plus de leur activité de dégradation. C'est le cas du TGF β qui est sécrété dans la MEC sous forme d'un complexe latent, et qui a besoin d'être clivé pour se détacher de son complexe et s'activer. La MMP9 et la MMP2 sont capables de cliver protéolytiquement le TGF β latent, ce qui est un mécanisme d'activation du TGF β très intéressant (Yu et Stamenkovic 2000).

Comme enzyme de dégradation, nous retrouvons aussi les plasmines qui sont des sérines protéases capables de dégrader certaines protéines matricielles comme les laminines, la fibronectine ou encore la fibrine, ce qui influe le remodelage de la MEC. Ces protéines sont activées par les activateurs du plasminogène, des protéases qui convertissent le plasminogène en plasmines (Duffy et O'Grady 1984; Cawston et Young 2010).

Les enzymes de réticulation de la MEC

La famille des lysyl oxydases (LOX) est la principale classe d'enzymes impliquées dans la réticulation du collagène et elle est composée de 5 différents membres LOX et LOXL1-4. Ces enzymes sont capables de modifier les propriétés biophysiques de la MEC en oxydant les résidus lysine du collagène et de l'élastine, ce qui favorise la formation de liaisons covalentes et garantit une intégrité mécanique des protéines de la MEC et une organisation en fibrilles (S. Kumari, Panda, et Pradhan 2017). La lysyl oxydase LOX est fortement exprimée dans les cancers métastatiques, et sa sécrétion par les fibroblastes activés du microenvironnement tumoral entraîne une augmentation des métastases dans le cancer du sein (Pickup et al. 2013b). Dans la fibrose, la réticulation du collagène médiée par la protéine LOX entraîne une rigidification de la MEC alors

que l'inhibition de LOX atténue la fibrogenèse et empêche la formation d'un environnement pathologique (Tjin et al. 2017).

2. Rôle de la MEC dans le cancer

Comme nous venons de le voir, la MEC est composée de nombreuses protéines fibreuses, de protéines matricellulaires, et de protéoglycans, mais ne sert pas seulement de support sur lequel les tissus s'organisent. Loin d'être un échafaudage physique inerte, la composition et l'organisation de la MEC peuvent varier dynamiquement afin de réguler ses propriétés biochimiques et biomécaniques qui possèdent un impact important sur la croissance cellulaire, la migration, l'angiogenèse, la réponse immunitaire au sein du microenvironnement (Pickup, Mouw, Weaver, 2014). La composition, la densité, l'organisation et ainsi les modifications post-traductionnelles par le clivage et la réticulation de la MEC dictent les propriétés du tissu et notamment sa plasticité, sa viscosité, son élasticité et sa rigidité. Ces signaux mécaniques sont ensuite traduits en signaux biochimiques au niveau moléculaire par un réarrangement de récepteur, une réorganisation et contraction du cytosquelette, et un remodelage de la MEC, c'est ce qu'on appelle la mécanotransduction (Martino et al. 2018). Les cellules vont en effet détecter les propriétés biomécaniques de la MEC par des récepteurs transmembranaires spécialisés comme les intégrines, les DDR ou encore les syndécans. Une fois activés, les récepteurs induisent la formation de complexes d'adhésions focales constitués de protéines comme FAK ou SRC, ce qui entraîne une contraction et un remodelage du cytosquelette d'actine aboutissant à l'activation de mécano-senseurs de la transcription comme YAP1, TAZ ou encore MRTFA (Tai, Chen, et Shen 2015). YAP1 est un coactivateur transcriptionnel de la famille des facteurs de transcription à domaine TEA (TEAD) et son homologue TAZ sont ainsi activés par la rigidité de la MEC, la tension du cytosquelette et ainsi que par le remodelage des fibres de stress (Dupont et al. 2011).

Dans le cancer, nous retrouvons souvent une desmoplasie tumorale qui est caractérisée par une inflammation chronique, une angiogenèse importante, une expansion et activation des fibroblastes et une expression accrue de protéines matricellulaires et de MEC réticulée et ainsi rigidifiée (Pickup, Mouw, Weaver, 2014). Les cancers solides développent une réponse desmoplasique dans lequel le tissu contient des expressions plus élevées de certaines protéines comme la fibronectine ou ténascine, de protéines matricellulaires, et de plus grandes quantités de collagène I réorganisé et réticulé qui permettent une rigidification du stroma tumoral (Acerbi et al. 2015). Une MEC desmoplasique est une caractéristique histologique importante retrouvée dans la plupart des cancers (Levental et al. 2009). C'est le cas par exemple du cancer du pancréas, où la fibrose est associée à une meilleure progression tumorale, et un mauvais pronostic de survie des patients (Pandol et al. 2009). A l'inverse, la fibrose peut prédisposer un tissu à un cancer, la fibrose hépatique peut conduire au développement d'un hépatocarcinome, et la fibrose pulmonaire idiopathique elle-même peut prédisposer les patients à développer un cancer des poumons et augmente ainsi le risque de développer ce cancer de 7 à 20% (Ballester, Milara, et Cortijo 2019).

Les caractéristiques du cancer décrites par Hanahan et Weinberg englobent les capacités biologiques fondamentales acquises au cours du développement tumoral, et comprennent par exemple l'immortalité répliquative, l'échappement de la suppression de croissance, un métabolisme cellulaire dérégulé, l'angiogenèse induite, l'évasion de la destruction immunitaire ou encore l'initiation de l'invasion et des métastases (Hanahan et Weinberg 2011). Il est important de noter que la MEC influe sur la majorité de ces caractéristiques (Pickup, Mouw, Weaver, 2014).

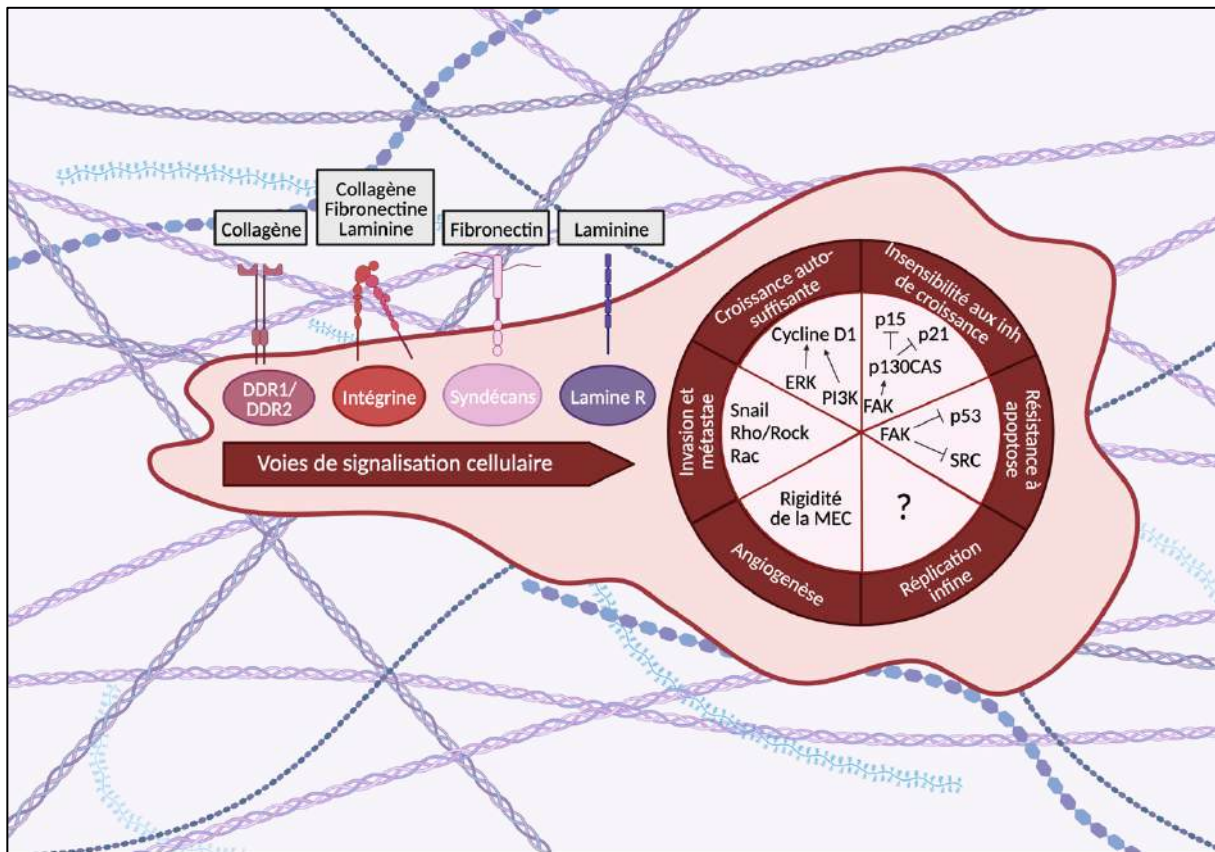


Figure 24 : Rôle de la MEC dans les propriétés tumorales

Depuis l'initiation de la tumeur à la dissémination métastatique, la MEC est capable d'influencer chacune des caractéristiques du cancer décrites dans (Hanahan et Weinberg 2011). Les molécules de la MEC dont le collagène, la fibronectine, ou encore la laminine se lient aux récepteurs de surface cellulaire comme les DDR, les intégrines, les syndécans ou encore les récepteurs de la laminine, ce qui active les voies de signalisation intracellulaires. Les signaux induits par l'adhésion de la MEC vont permettre par exemple de favoriser une croissance autosuffisante, une limitation de l'induction de l'apoptose, une amélioration des voies pro-migratoires ou encore une augmentation de l'angiogenèse. Tout au long de la tumorigenèse, la MEC s'adapte pour renforcer la progression de la maladie en favorisant ses caractéristiques principales. Adapté de (Pickup, Mouw, et Weaver 2014).

La prolifération

La MEC peut avoir un rôle important sur les propriétés prolifératives, l'évitement des suppresseurs de croissance et l'immortalité réplivative. En effet, l'adhésion à la MEC entraîne une activation de RAS qui favorise la transition G1/S du cycle cellulaire via la signalisation ERK (Schwartz et Assoian 2001). La phosphorylation de FAK dépendant de l'adhésion à la MEC entraîne aussi une activation de RAS et une activation de la voie de signalisation PI3K pour activer et favoriser la translocation de ERK et favoriser ainsi l'entrée dans le cycle cellulaire (Pylayeva et al. 2009). Plusieurs suppresseurs de tumeurs bloquent la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. La phosphorylation de SMAD et l'activation de p53 par le TGFβ induit l'expression des protéines p21 et p27, ce qui inhibe les cyclines dépendantes des kinases, et empêche la croissance cellulaire. L'interaction entre les cellules tumorales et la MEC permet de réguler la voie du TGFβ par l'induction de p130Cas et réduit ainsi la phosphorylation de SMAD et l'expression de p27 (Lee et Bae 2002; Kim et al. 2008). Enfin, la croissance tumorale est associée à l'immortalité réplivative qui s'explique par l'expression de l'enzyme télomérase qui rallonge les télomères, permettant de surmonter ainsi la senescence réplivative. De façon intéressante, les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique présentent des niveaux élevés de télomérases (Liu et al. 2007). De façon intéressante, les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique présentent des niveaux élevés de télomérases (T. Liu et al. 2007).

L'angiogenèse

Comme nous l'avons vu, l'angiogenèse est un processus crucial pour le développement tumoral puisqu'il va permettre de fournir des nutriments et l'oxygène aux cellules cancéreuses et que le système sanguin représente un conduit majeur pour la dissémination métastatique. Le système vasculaire tissulaire est étroitement régulé par des interactions dynamiques entre la MEC et les cellules endothéliales qui contrôlent ce processus. La MEC possède un rôle important dans l'angiogenèse tumorale puisqu'elle va constituer un réservoir de facteurs de croissance comme VEGF et FGF, connus pour stimuler l'angiogenèse et permettre alors aux cellules endothéliales de migrer et ainsi favoriser leur croissance et leur survie (Bonanno et al. 2000; Neve et al. 2014) La MEC peut aussi relayer des facteurs anti-angiogéniques pour restreindre ou contrecarrer les signaux pro-angiogéniques. La composition et le remodelage de la MEC permettent ainsi de maintenir l'homéostasie vasculaire au sein des tumeurs.

L'invasion et la formation de métastases

L'acquisition de propriétés invasives ainsi que la dissémination métastatique des cellules cancéreuses impliquent une série d'étapes biologiques distinctes qui sont associées à des changements spécifiques dans la composition, l'organisation et la réticulation de la MEC. Pour être considéré comme invasives, les cellules tumorales vont dans un premier temps remodeler la membrane basale qui est une MEC fine et dense composée d'un réseau de collagène IV très ordonné et réticulé, ainsi que de laminine et autres protéoglycans et glycoprotéines, pour la traverser et ainsi envahir le parenchyme (Kalluri 2003). La formation de protrusions riches en actine, appelées invadosomes, nécessitent l'adhésion des récepteurs intégrines ou DDR à la MEC et la formation de complexes d'adhésion via FAK. Les invadosomes vont diriger l'invasion cellulaire par la dégradation localisée de la MEC grâce à l'expression et l'activation de MMP (Y. Wang et McNiven 2012). Une fois le parenchyme envahi, la dissémination métastatique est favorisée par la réorganisation des fibres de collagène I en faisceaux linéarisés. Ces voies de MEC linéaires permettent la migration dirigée des cellules cancéreuses vers le système vasculaire (Miroshnikova et al. 2017; Han et al. 2016). Les cellules vont pouvoir facilement s'infiltrer dans la circulation afin de disséminer dans les autres organes. Une fois l'organe secondaire atteint, l'attachement et la survie des cellules cancéreuses dans leur nouvel environnement sont assurés par la présence d'une MEC hospitalière déjà existante ou par le remodelage de la MEC par les différents facteurs solubles que les cellules tumorales vont envoyer (Peinado et al. 2017). Le potentiel métastatique d'une cellule est favorisé par la TEM ou la transition phénotypique mésenchymale qui permet aux cellules d'acquérir des propriétés invasives. Il est intéressant de noter que cette transition peut être induite par le TGF β sécrété par les cellules stromales ou par la dégradation localisée de la MEC (Annes, Munger, et Rifkin 2003; Mousset et al. 2023). La rigidification de la MEC induit aussi la TEM et un phénotype cellulaire invasif et favorise ainsi la dissémination métastatique (Leight et al. 2012). A l'inverse, l'inhibition de la réticulation du collagène, et ainsi de la rigidité matricielle permet de diminuer la formation de métastases dans les cancers (Pickup et al. 2013a; Bondareva et al. 2009). Ainsi, la rigidification de la MEC promeut les propriétés invasives et métastatiques des cellules cancéreuses en favorisant l'adhésion et la migration cellulaire, et en régulant la plasticité cellulaire.

La réponse immunitaire

Pour empêcher la formation de tumeurs, une réponse immunitaire adaptative se met en place. Elle repose sur la capacité des LT cytotoxiques à reconnaître les antigènes présents sur les cellules transformées et à entraîner leur disparition par la mort cellulaire médiée par les LT cytotoxiques. C'est ce qu'on appelle la surveillance immunitaire. La MEC exerce un double rôle dans cette surveillance immunitaire, à la fois en compromettant ou soutenant la réponse immunitaire tumorale. D'une part, la MEC possède un rôle pro-immunogène puisqu'elle va former des « autoroutes » migratoires par ses fibres et permettre ainsi de favoriser la migration des LT vers la tumeur, en réponse notamment à des fragments de MEC chimio-attractants libérés par le clivage de la MEC par les MMP (Wells, Gaggari, et Blalock 2015). D'autre part, la MEC peut empêcher le recrutement et l'activation des LT par la liaison du collagène de type I sur les récepteurs LAIR exprimés par la majorité des cellules immunitaires (Meyaard 2008). De plus, les tumeurs présentent une

inflammation importante et cette inflammation chronique est retrouvée dans les tumeurs fibrotiques qui présentent une accumulation du dépôt de collagène et fibronectine. La MEC fibrotique influence en effet le recrutement de cellules du système immunitaire inné qui entraîne cette inflammation chronique de la tumeur (Stramer, Mori, et Martin 2007). Enfin, la rigidité de la MEC représente alors un maillage dense autour de la tumeur qui peut agir comme une « barrière » empêchant l'infiltration des cellules immunitaires. Ainsi, cibler la réticulation du collagène via l'inhibition de LOX permet d'assouplir la MEC et conduit à une meilleure infiltration des LT (H. Jiang, Hegde, et DeNardo 2017; Nicolas-Boluda et al. 2021).

3. Cibler la MEC comme nouvelle approche thérapeutique

Nous venons de voir que la MEC joue un rôle crucial dans la progression tumorale et plus précisément dans le développement de métastases. Les stratégies visant une amélioration des fibroses tumorales sont de nouvelles stratégies pouvant être envisagées afin d'améliorer l'arsenal de traitements contre le cancer. Certaines thérapies anti-fibrotiques ont été développées pour réduire la fibrose tumorale, avec notamment l'utilisation du Pirfenidone dans les cancers solides (Polydorou et al. 2017). Le médicament a montré une efficacité prometteuse dans des modèles expérimentaux de cancer du sein murin, en « normalisant » le stroma fibrotique. Cependant, cette molécule possède des effets indésirables avec notamment une production de ROS et de cytokines inflammatoires qui peuvent compromettre l'immunité tumorale. Dans notre laboratoire, nous avons repositionné un anti-fibrotique connu sous le nom de Nintedanib dans nos modèles pré-cliniques de mélanome afin de « normaliser » le réseau de MEC fibreux et améliorer l'efficacité des thérapies ciblées (Diazi et al. 2022). Dans le cancer du pancréas, la combinaison du Nintedanib et du Trametinib entraîne l'infiltration intra-tumorale de lymphocytes T cytotoxiques, et re-sensibilise les cellules cancéreuses aux immunothérapies (Falcomatà et al. 2022). Comme nous l'avons déjà abordé, le ciblage de la signalisation du collagène par l'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs DDR1 et DDR2, l'imatinib, a permis en combinaison avec les thérapies ciblées de « normaliser » le stroma fibrotique, d'augmenter l'efficacité des thérapies et de retarder les rechutes (Berestjuk et al. 2022). L'inhibiteur DDR1-IN-1 a aussi été décrit dans le mélanome cutané et entraîne une réduction de la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes (Reger de Moura et al. 2019). De façon intéressante, l'invalidation de DDR2 augmente la sensibilité au traitement anti-PD-1 et la combinaison entre le Dasatinib, un inhibiteur de DDR2, et l'anti-PD-1 entraîne une réduction de la charge tumorale (Tu et al. 2019).

Des médicaments anti-fibrotiques ciblant le TGF β ont aussi été développés comme le Fresolimumab, un anticorps qui neutralise le TGF β (Neuzillet et al. 2015). Ce traitement permet de diminuer le collagène des tissus tumoraux, et entraîne une amélioration de la réponse aux inhibiteurs des points de contrôles immunologiques en restaurant la fonction anti-tumorale des macrophages ou en augmentant l'activité de LT CD8+ tumoraux (Jieqiong Liu et al. 2012; Mariathasan et al. 2018). D'autres thérapies ciblant des protéines spécifiques de la MEC comme la tenascine ou l'acide hyaluronique ont vu le jour. L'expression de la TNC-C a été ciblée à l'aide d'un ATN-ARN qui déclenche la dégradation de l'ARNm de la TNC-C chez les patients atteints d'un glioblastome, mais la survie de ces patients n'en a été que modestement améliorée (Wyszko et al. 2008). À l'inverse, les thérapies qui ciblent et dégradent l'acide hyaluronique se sont avérées prometteuses.

Enfin, le remodelage de la MEC est nécessaire pour l'invasion des cellules cancéreuses, l'angiogenèse et la migration trans-endothéliale afin de permettre l'intravasation vasculaire. Diverses molécules ont alors été développées afin de cibler la famille des MMP et ainsi limiter le remodelage matriciel, et empêcher l'invasion cellulaire, l'angiogenèse et la formation de métastases (Vandenbroucke et Libert 2014). Le remodelage de la MEC s'accompagne de la réticulation des fibres de collagène, il n'est alors pas surprenant que LOX, la principale enzyme de réticulation du collagène, soit surexprimée dans les cancers solides fibrotiques (Erler et Weaver 2009). Des inhibiteurs des membres de la famille des lysyl oxydases ont donc été développés et testés dans différents modèles pré-cliniques et essais cliniques afin d'empêcher la réticulation du collagène, réduire la rigidification de la MEC et ainsi diminuer la formation de métastases (Levental et al. 2009; B. W. Miller et al. 2015). Nous détaillerons dans le prochain chapitre les rôles et le fonctionnement des lysyl oxydases ainsi que leur potentiel ciblage thérapeutique.

Chapitre IV : Lysyl Oxidase Like 2

I. La famille des Lysyl oxidases

A. Généralités

La famille des Lysyl Oxidase est composée de cinq différents membres : la lysyl oxidase (LOX) et quatre protéines de type lysyl oxidase (LOXL1, LOXL2, LOXL3 et LOXL4). Ce sont des enzymes dépendantes du cuivre qui catalysent une réaction de déamination de résidus lysine et hydroxylysine par oxydation afin de former des dérivés aldéhydes et ainsi assembler des ponts covalents intra et intermoléculaires dans les chaînes de collagène et d'élastine. Ce qui conduit à la réticulation de ces molécules et favorise les forces de traction, deux processus importants pour l'intégrité structurelle de nombreux tissus.

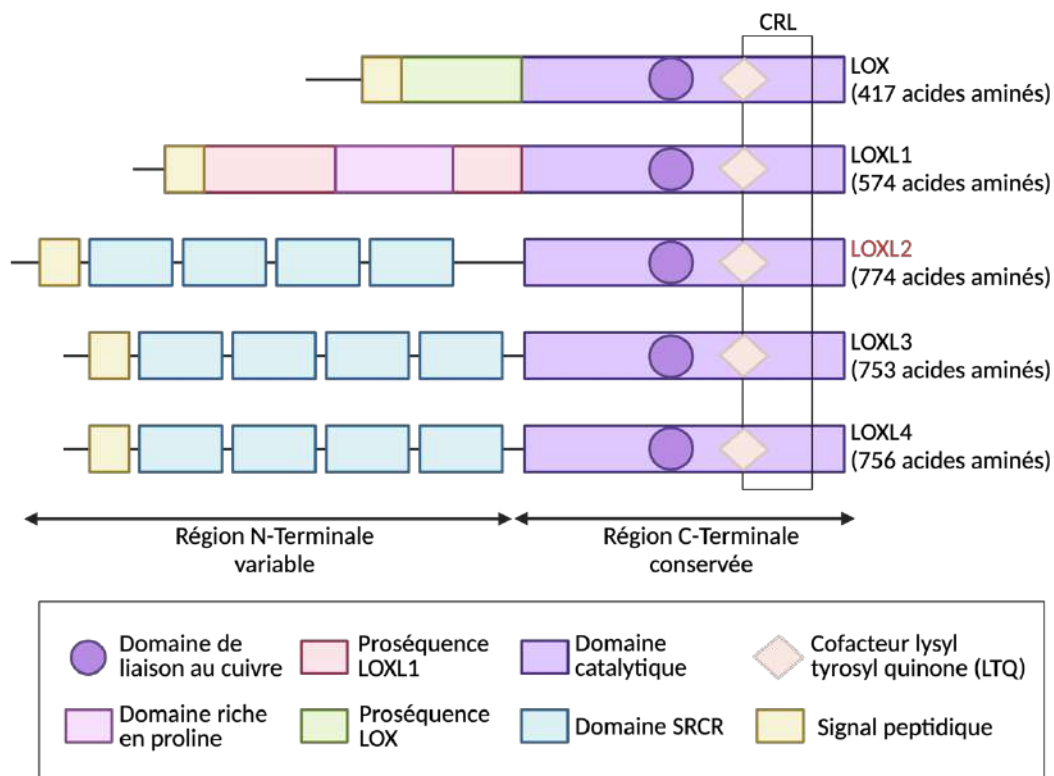


Figure 25 : Structure des membres de la famille des Lysyl Oxidases

Les enzymes de la famille LOX possèdent un domaine conservé C-terminal qui contient un site de liaison du cuivre et un cofacteur Lysyl-Tyrosyl-Quinone (LTQ) importants pour la conformation protéique et l'activité catalytique de ces enzymes. On trouve également un domaine CRL (domaine cytokine receptor like) impliqué dans la liaison de cytokines. À l'inverse, le domaine N-terminal est variable ; LOXL2, LOXL3, et LOXL4 contiennent un domaine Scavenger (SRCR) important pour l'adhésion cellulaire et l'interaction protéine-protéine alors que LOX et LOXL1 contiennent des pro-séquences qui permettent leur sécrétion. La complexité des domaines présents au niveau des structures des membres de la famille LOX reflète la diversité de leurs fonctions biologiques. Adapté de (Barker, Cox, et Erler 2012).

Concernant leur structure, les cinq membres de la famille possèdent un domaine C-terminal hautement conservé comprenant un domaine de liaison au cuivre His-X-His-X-His et un cofacteur lysyl-tyrosyl-quinone (LTQ), tous deux nécessaires à l'activité enzymatique des lysyl oxydases. L'extrémité C-terminal contient aussi un domaine de type récepteur de cytokine (CRL). En fonction de la structure N-terminale, nous pouvons diviser la famille en deux sous-groupes. Les enzymes LOX et LOXL1 présentent des pro-séquences qui permettent leur sécrétion sous forme de pro-enzymes inactives. Par la suite, la protéine morphogénétique osseuse 1 (BMP1) et les protéinases liées à la BMP1 traitent pro-LOX et pro-LOXL1 une fois qu'elles sont sécrétées, libérant ainsi les enzymes catalytiquement actives matures et les régions propeptidiques N-terminales (Uzel et al, 2001). Les enzymes LOXL2, LOXL3 et LOXL4, quant à elles, présentent quatre domaines riches en cystéine (Scavenger receptor cysteine-rich ou SRCR) impliqués dans l'adhésion cellulaire et les interactions protéine-protéine.

B. Activité enzymatique

Le domaine de liaison au cuivre et le co-facteur LTQ sont importants pour l'activité enzymatique des lysyl oxydases. Bien que le cuivre ne soit pas directement impliqué dans l'activité de ces enzymes, il permet de maintenir la conformation du cofacteur LTQ formé par la liaison covalente entre les résidus Lys314 et Tyr349.

Les lysyl oxydases entraînent la déamination des résidus lysine et hydrolysine que l'on peut retrouver sur les molécules de collagène et des résidus lysine exclusivement sur l'élastine afin de former des dérivés aldéhydes, α -aminoadipic- δ -semialdéhydes (AAS) que l'on peut appeler allysines ou hydroxyallysines (Lucero et Kagan 2006). Ces dérivés peuvent réagir avec d'autres aldéhydes adjacents pour former des aldols. Cela conduit à différentes réactions de condensation et la formation de pontages bi-, tri- ou tétra-fonctionnels dans les collagènes par exemple.

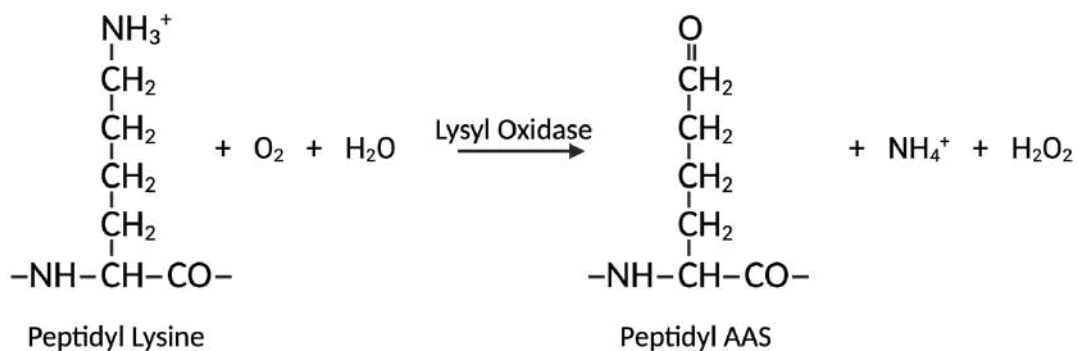


Figure 26 : Stœchiométrie de la réaction catalysée par les lysyl oxydases

Les lysyl oxydases déaminent les résidus lysines (et hydroxylysines) des collagènes et de l'élastine pour former des aldéhydes (AAS) capables de se condenser avec d'autres AAS ou des résidus lysines (et hydroxylysines), pour former des pontages covalents non réductibles. Adapté de (Lucero et Kagan 2006).

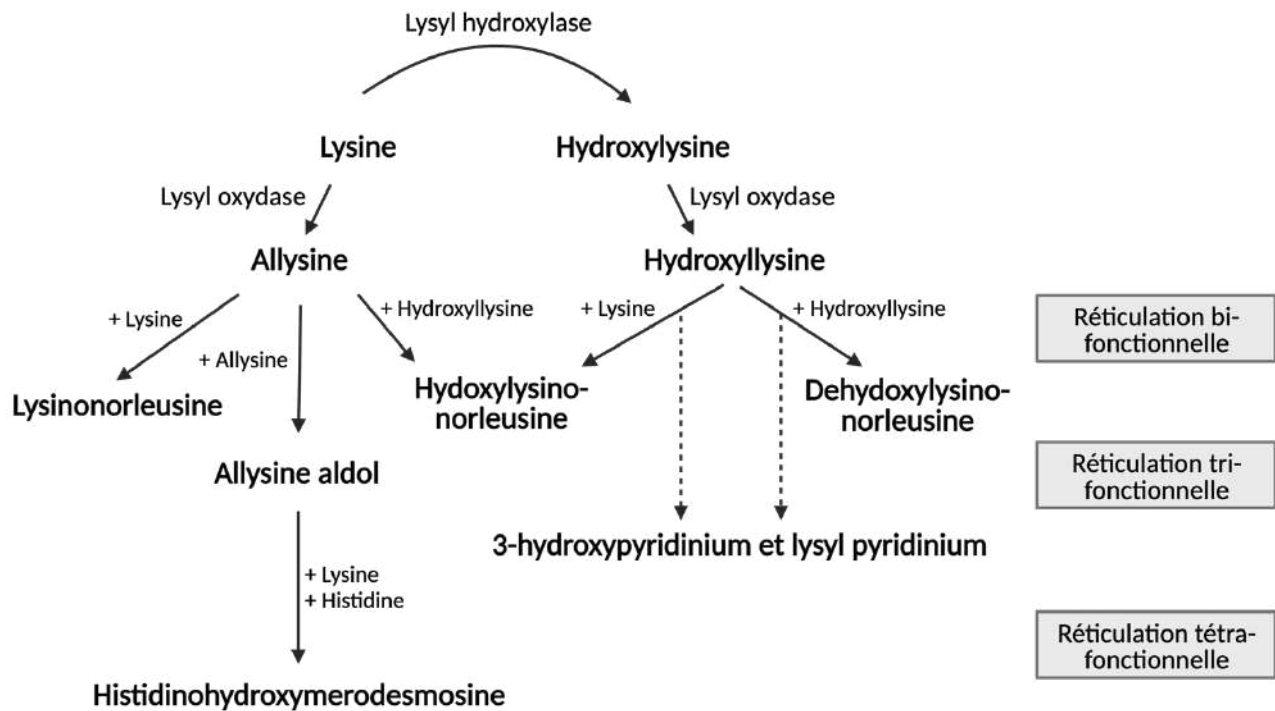


Figure 27 : La réaction de déamination par les lysyl oxydases sur les collagènes

La réaction de déamination engagée par les lysyl oxydases conduit à des réactions de condensation et la formation de pontages bi-, tri- ou tétra-fonctionnels dans les collagènes. Adapté de (Mäki, Tikkanen, et Kivirikko 2001).

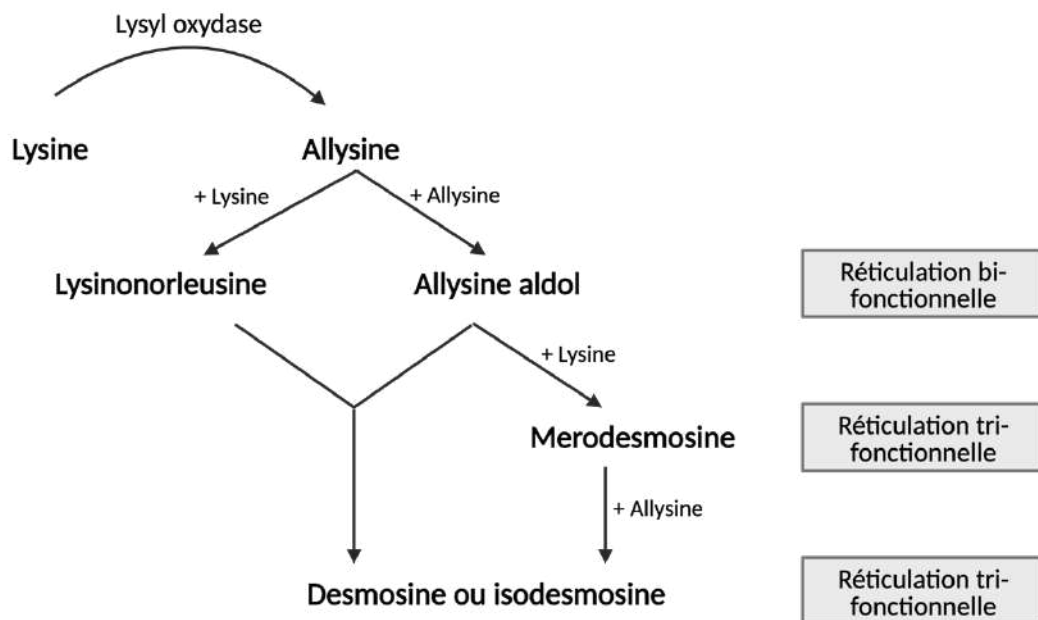


Figure 28 : La réaction de déamination par les lysyl oxydases sur l'élastine

La réaction de déamination engagée par les lysyl oxydases conduit à des réactions de condensation et la formation de pontages bi-, tri- ou tétra-fonctionnels de l'élastine. Adapté de (Mäki, Tikkanen, et Kivirikko 2001).

II. Rôles physiologique et pathologique des Lysyl Oxidases

A. Profil d'expression et rôle physiologique de la famille des Lysyl Oxidases

L'ARNm de *LOX* a été retrouvé dans de nombreux tissus humains et plus particulièrement dans l'aorte, les poumons, les reins et le pancréas. Dans l'étude de Hornstra et al, l'expression du gène *LOX* a été supprimée par mutagenèse ciblée chez la souris. Les souris *LOX*^{-/-} meurent de façon périnatale en présentant une instabilité cardiovasculaire avec rupture d'anévrismes artériels et rupture du diaphragme, ce qui est dû à une architecture de fibres élastiques fragmentées (Hornstra et al. 2003). Les souris *LOX*^{-/-} présentent des défauts d'organisation des fibres d'élastine et collagène, causant ainsi des anomalies de développement des voies aériennes (Mäki et al. 2005). Concernant *LOXL1*, son ARNm est très présent au niveau de l'aorte, du placenta, du rein, des muscles squelettiques et du pancréas. *LOXL1* joue un rôle dans la synthèse d'élastine dans l'aorte de rat adulte et le maintien de l'homéostasie des fibres élastiques dans le tractus urogénital inférieur (Greene et al. 2020).

L'expression du gène *LOXL2* a été détectée dans presque tous les tissus avec les niveaux d'ARNm les plus élevés dans les tissus reproducteurs, le placenta, l'utérus et la prostate (Saux et al. 1999). Les premiers modèles génétiques conditionnels de souris dépourvues ou surexprimant *LOXL2* ont été générés par Martin et al, en 2015. La suppression de *LOXL2* entraîne une létalité périnatale chez la moitié des souris nouvellement principalement associée à des malformations cardiaques congénitales, tandis que la surexpression de *LOXL2* déclenche la stérilité masculine en raison d'un dysfonctionnement épидидymaire causé par une désorganisation épithéliale, une fibrose et une inflammation aiguë (Martin et al. 2015).

Les niveaux d'expression les plus élevés du transcrit *LOXL3* ont été détectés dans le cœur, la rate, l'utérus, la moelle épinière et les ovaires. Son expression est aussi élevée dans les poumons, l'aorte et les artères coronaires. Deux isoformes de *LOXL3*, appelées *LOXL3*-sv1 et *LOXL3*-sv2, ont été identifiées et l'expression de *LOXL3*-sv1 est retrouvée dans le foie, le pancréas, la rate et le thymus. La génération de souris avec une invalidation conditionnelle du gène de *LOXL3* montre que les souris *LOXL3*^{-/-} meurent en période périnatale avec une anomalie craniofaciale grave et une déformation de la colonne vertébrale (Zhang et al. 2015). Ces résultats sont confirmés par une étude plus récente montrant une létalité périnatale associée à des anomalies squelettiques. De façon intéressante, la génération de souris double KO *LOXL2*^{-/-} et *LOXL3*^{-/-} révèlent une létalité embryonnaire. Les analyses génotypiques laissent suggérer que *LOXL2* et *LOXL3* sont indispensables pour le développement embryonnaire précoce jusqu'à E9.5, mais sont nécessaires pour un développement normal par la suite. Enfin, la surexpression ubiquitaire de *LOXL2* sauve ou atténue fortement la létalité associée à *LOXL3* KO (Santamaría et al. 2022).

Enfin, le dernier membre de la famille des Lysyl oxydases, *LOXL4*, a été identifié en 2001. Il présente une forte homologie avec le polypeptide *LOXC* du cartilage murin. L'ARNm de *LOXL4* est exprimé dans de nombreux tissus humains et plus spécifiquement dans le muscle squelettique, les testicules et le pancréas (Mäki, Tikkanen, et Kivirikko 2001). De plus, un modèle de souris *LOXL4*^{-/-} a été généré, afin d'étudier, si l'abrogation de *LOXL4* pouvait exagérer le développement de l'anévrisme et la dissection de l'aorte thoracique (Li et al. 2019). Les résultats suggèrent que *LOXL4* ne semble pas jouer un rôle important dans le développement de l'anévrisme aortique.

B. Rôle pathologique des membres de la famille des Lysyl Oxidases

Le premier rôle des lysyl oxydases décrit dans le cancer concernait un rôle anti-tumoral de *LOX* majoritairement porté par son pro-peptide. En effet, bien que le gène *LOX* ne soit pas un suppresseur de tumeur, la *LOX*-PP clivée fonctionne comme un suppresseur de tumeur. Deux études ont mis en évidence un polymorphisme nucléotidique unique G473A (rs1800449) entraînant une substitution Arg158Gln dans une région hautement conservée de *LOX*-PP (Kaneda et al. 2004; Min et al. 2009). Cette substitution altère profondément la capacité de *LOX*-PP à inhiber le phénotype invasif et la formation de tumeurs par les cellules

cancéreuses du sein dans un modèle de xénotransplante. Plus précisément, LOX-PP permet d'inhiber la TEM des cellules cancéreuses du sein *in vitro*. De plus, le propeptide LOX permet d'inhiber certaines voies de signalisation indispensables pour le développement tumoral. LOX-PP réduit notamment la croissance des cellules cancéreuses de la prostate en interférant avec la liaison du FGF-2 aux protéoglycanes de sulfate d'héparane et/ou aux FGFR, et ainsi en inhibant la signalisation dépendante du FGF-2. LOX-PP serait aussi impliqué dans la signalisation FAK. Ainsi, Zhao et al, ont montré un autre mécanisme d'action de la suppression tumorale consistant à bloquer la signalisation et la migration cellulaires stimulées par la fibronectine (Zhao et al. 2009). Enfin, LOX-PP a aussi été montré comme étant impliqué dans les voies de réparation à l'ADN par son interaction avec le régulateur de réparation de l'ADN nucléaire MRE11 (Bais et al. 2015).

Contrairement à son propeptide, l'enzyme mature LOX est connue pour favoriser le développement tumoral. Une première étude a révélé une expression plus importante de la lysyl oxydase LOX observée uniquement dans les cellules cancéreuses de sein avec un phénotype hautement invasif/métastatique mais pas dans les cellules cancéreuses de sein faiblement invasives. La déplétion ou l'inhibition de LOX a alors permis de diminuer l'activité invasive de ces cellules alors que sa surexpression a démontré une augmentation des capacités invasives des cellules de cancer du sein. Cette étude indique aussi une corrélation entre la surexpression de LOX et le potentiel invasif/métastatique dans les lignées cellulaires tumorales prostatiques de rat et les lignées cellulaires de mélanome cutané et uvéal humain (Kirschmann et al. 2002). Par la suite, la fonction pro-tumorale de LOX sera étendue à d'autres cancers comme le cancer colorectal, du col de l'utérus, de l'ovaire, du poumon, gastrique et du rein à cellules claires.

Comme dit précédemment, le rôle principal des membres de la famille des lysyl oxydases est de permettre l'assemblage et une réticulation des fibres de collagène. Au niveau extracellulaire, la réticulation du collagène par LOX est impliquée dans la création d'un microenvironnement fibrotique favorisant la croissance métastatique (Cox et al. 2013). Dans le cancer du sein, réduire la réticulation du collagène permet de réduire la fibrose, de diminuer les plaques d'adhérences focales et l'activité de PI3K afin de réduire l'incidence des tumeurs (Levental et al. 2009). Dans le cancer colorectal, Barker et al, ont confirmé que l'activité de LOX augmente la rigidité des tumeurs, et entraîne l'activation de la voie de signalisation FAK. Ainsi, LOX permet de favoriser l'invasion et la métastase, via l'activation de la voie intégrine $\beta 1$ /FAK/SRC (Barker et al. 2011). Cette équipe de recherche a, par ailleurs, démontré l'importance de LOX dans l'angiogenèse dans plusieurs modèles de cancer colorectal. LOX active la voie AKT par la stimulation du récepteur PDGF et ainsi permettre la sécrétion de VEGF, ce qui est essentiel pour stimuler les cellules endothéliales et l'angiogenèse.

Comme le rôle extracellulaire de LOX dans l'assemblage de la MEC est bien exploré, certains travaux se sont intéressés à un rôle intracellulaire de LOX. En effet, Liu et al, ont montré de façon originale une localisation nucléaire de LOX associée à un mauvais pronostic de survie des patients atteints d'un cancer colorectal (Liu et al. 2016). Son implication dans la TEM a été démontrée via une stimulation de la transcription du facteur Twist1 (El-Haïbi et al, 2012). Enfin, LOX est capable de se lier au promoteur de SNAI2 et ainsi de réduire la sécrétion de TIMP4 conduisant à l'invasion et à la migration cellulaire, ou encore à l'angiogenèse (Boufraquech et al. 2016).

En ce qui concerne les autres membres de la famille des lysyl oxydases, LOXL3 a d'abord été décrit en 2017 comme étant un frein à la prolifération cellulaire. Son action consiste à se lier au facteur de transition STAT3 et à catalyser une réaction de déacétylation. Cette réaction perturbe alors la dimérisation de STAT3, empêche son activité transcriptionnelle et limite la prolifération cellulaire (Ma et al, 2017). LOXL3 joue également un rôle important dans la survie des cellules de mélanome humain et le maintien de l'intégrité génomique (Santamaría et al. 2018). Plus précisément, LOXL3 contribue à la progression du mélanome en modulant la transition phénotypique via les facteurs de transcription Snai1 et Prrx1 (Vázquez-Naharro et al. 2022).

Des études récentes ont révélé un rôle de LOXL1 encore difficile à décrypter dans les cancers. La forte expression de LOXL1 retrouvée dans les cholangiocarcinomes intra-hépatiques favorise la prolifération cellulaire, les métastases et l'angiogenèse via l'axe LOXL1-FBLN5/ $\alpha\beta 3$ intégrine/FAK-MAPK, conférant ainsi un rôle pro-tumoral à la protéine LOXL1. De façon opposée, LOXL1 a été décrit comme pouvant inhiber l'activité transcriptionnelle de YAP en augmentant la phosphorylation de MST1/2, et ainsi empêcher la

croissance tumorale, l'invasion et les propriétés métastatiques des cellules de cancer colorectal (Hu et al. 2020).

Enfin, il a été récemment montré que le facteur de transcription ZEB1 entraîne une expression importante des protéines LOXL1 et LOXL4, ce qui joue un rôle crucial dans les propriétés invasives des cellules de cancer du sein. LOXL4 est d'ailleurs connu pour promouvoir la prolifération et les capacités métastatiques du cancer gastrique, et du carcinome hépatocellulaire. Le rôle de LOXL4 dans ce dernier cancer a été décrit comme étant intracellulaire et non extracellulaire en activant la voie FAK/SRC (Li et al. 2019). D'autres données mettent en évidence la contribution de LOXL4 dans la progression tumorale et le développement métastatique des cancers du sein (S. K. Choi et al. 2017; Yin et al. 2020) du cancer du poumon (Zhang et al. 2019) ou du carcinome épidermoïde du larynx (Ren et al. 2022). De plus, LOXL4 conduit à l'hépatocarcinogénèse en favorisant un microenvironnement immunosuppresseur via l'infiltration de macrophages dans le foie, accélérant ainsi la croissance tumorale (Tan et al. 2022).

III. LOXL2 et cancer

A. Régulation de LOXL2

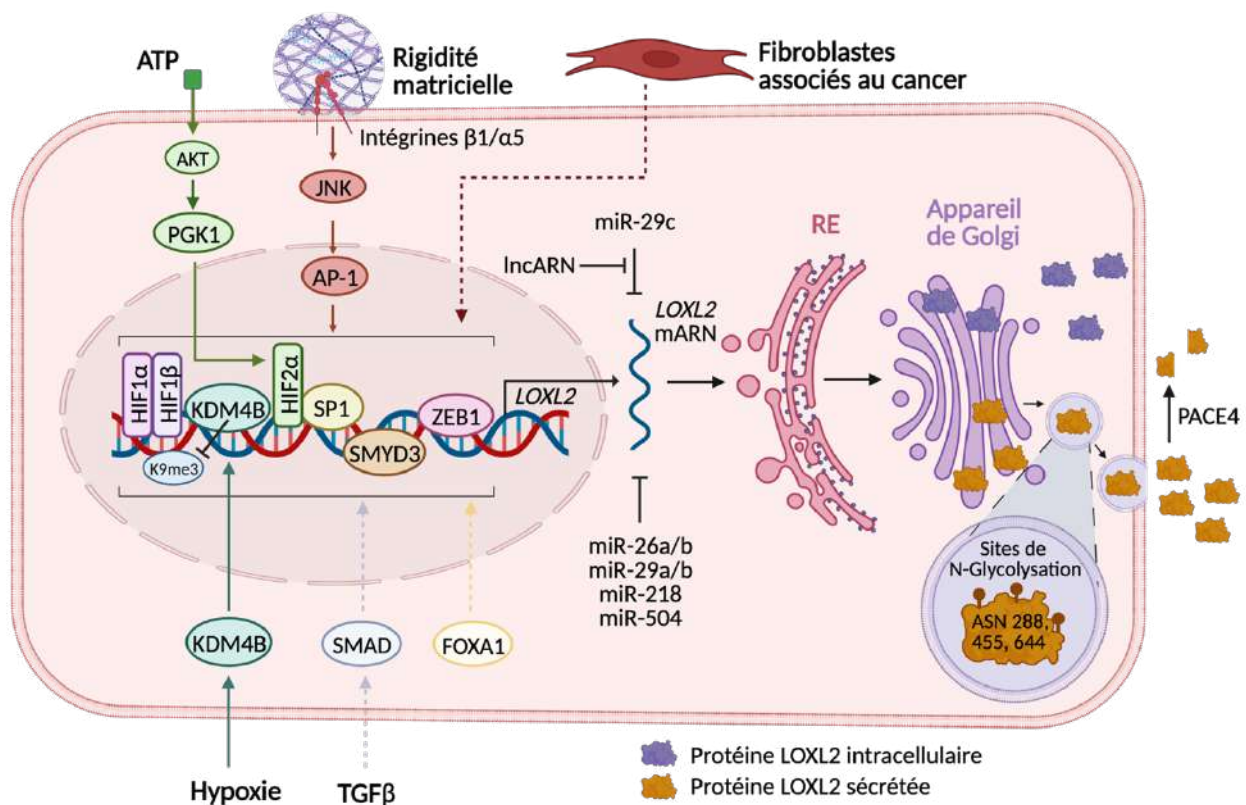


Figure 29 : Régulation de LOXL2

Ce schéma illustre les différentes voies qui régulent l'expression de LOXL2. Au niveau transcriptionnel, le gène LOXL2 est par exemple régulé par la voie TGFβ/SMAD4, la voie ATP/AKT/PGK1/HIF2α, la voie MEC/Integrinβ1/α5/C-Jun/AP1 et la voie Hypoxie/KDM4B. La transcription de LOXL2 peut être régulée par plusieurs facteurs de transcription et enzymes modifiant les histones comme HIF1α, HIF2α, SP1, ZEB1, SMYD3, KDM48. Au niveau post-transcriptionnel les miR-29a/b/c, miR-26a/b, miR-218 et miR-504, peuvent également moduler les niveaux d'ARNm de LOXL2. Au niveau post-traductionnel, la protéine LOXL2 sécrétée (orange) est modifiée par N-glycosylation aux sites Asn288, Asn455 et Asn644, alors que la protéine LOXL2 intracellulaire (violette) ne l'est pas. Adapté de (Wen, Xu, et Li 2020).

1. Régulation transcriptionnelle

Comme nous l'avons abordé, de nombreux stress et signaux du micro-environnement sont favorables à la progression tumorale. Il est intéressant de noter que certains d'entre eux permettent une régulation transcriptionnelle de *LOXL2*. Dans le carcinome hépatocellulaire, l'hypoxie via HIF1 α et le facteur TGF β activent la transcription de *LOXL2*, permettant de réorganiser le cytosquelette et de modifier la niche métastatique (Wong et al. 2014). Ezzoukhry et al, ont confirmé à leur tour que le TGF β peut réguler la transcription de *LOXL2* de façon dépendante de Smad4 dans le même cancer (Ezzoukhry et al. 2016). La relation entre *LOXL2* et le TGF β est aussi retrouvée au sein des cellules du microenvironnement tumoral. En effet, le traitement au TGF β d'une lignée cellulaire de fibroblastes pulmonaires murins conduit à une augmentation de l'expression nucléaire de *LOXL2*. Enfin, la déplétion de *LOXL2* entraîne une inhibition de la transition fibroblaste-myofibroblaste (FMT) induite par le TGF β 1 (Matsuo et al. 2021).

L'hypoxie est l'un des facteurs les plus déterminants dans la régulation transcriptionnelle de *LOXL2* dans la cellule cancéreuse. De nombreuses études transcriptomiques ont désigné *LOX* comme l'une des cibles les plus régulées par l'hypoxie et le promoteur de *LOX* s'est avéré être une cible directe du facteur de transcription HIF1 α . Schietke et al, ont par ailleurs confirmé cette observation et ont caractérisé *LOXL2* comme cible transcriptionnelle directe de HIF1 α . Ils ont montré que le promoteur de *LOXL2* contient trois sites de réponse à l'hypoxie HRE putatifs dont le premier semble fonctionnel (Schietke et al. 2010). Dans le cancer du sein, l'histone méthylase contenant la protéine 2C (JMJD2C) diminue la triméthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 9 ce qui permet d'améliorer la liaison de HIF1 α aux HRE et active la transcription de plusieurs cibles, dont *LOXL2* (Luo et al. 2012). De la même façon, l'histone méthylase KDM4B est abondamment exprimée en condition hypoxique et méthyle H3K9me3 afin de favoriser l'expression de certaines protéines notamment impliquées dans les métastases, dont *LOXL2* (Wilson et al. 2017). Dans le carcinome hépatocellulaire, la régulation de *LOXL2* par HIF1 α en hypoxie permet d'induire la TEM, la migration et l'invasion des cellules ainsi que la capacité de mimétisme vasculaire (Wang et al. 2017). De façon intéressante, la transcription de *LOXL2* n'est pas uniquement dépendante de HIF α . En 2019, Yang et al, ont révélé que l'expression de *LOXL2* est aussi régulée par HIF2 α . Ils ont démontré que l'ATP connu pour être accumulé au niveau des sites tumoraux, régule la signalisation du facteur HIF2 α via la voie AKT/PKG1. HIF2 α va alors induire la transcription de certaines protéines comme *LOXL2* et MMP9 qui ont un rôle dans l'invasion du cancer du sein, et d'autres comme SNAIL impliquée dans la TEM (Yang et al. 2019).

La caractérisation de la région promotrice de *LOXL2* a révélé que le gène *LOXL2* contient une boîte GC et d'autres sites de liaison de facteurs de transcription putatifs comme SP1, NF- κ B, ou GATA-2. Dans le cancer colorectal, *LOXL2* est, en effet, activé par le facteur de transcription SP1 (Liu et al. 2020). D'autres études ont démontré le lien entre *LOXL2* et SP1 dans le cancer. Dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique, SP1 module la TEM et est impliqué dans l'invasion tumorale et dans la migration des cellules via la régulation de *LOXL2* (Kim et al. 2019). Plus récemment, la déubiquitineuse ZRANB1 permet la stabilisation de SP1 et une régulation de *LOXL2* favorisant les métastases dans le carcinome hépatocellulaire (Li et al. 2021). Au niveau transcriptionnel, *LOXL2* est aussi contrôlé par le facteur de transcription ZEB1. Des tests d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont démontré la liaison directe de ZEB1 au promoteur de *LOXL2* (Peng et al. 2017). Ce lien a été confirmé par Wang et al, en 2021 qui ont mis en évidence que ZEB1 favorise la transcription de *LOXL2* par liaison directe à son promoteur, et induit ainsi une invasion accrue des cellules cancéreuses colorectales (Wang et al. 2021).

2. Régulation post transcriptionnelle

L'épissage alternatif est un mécanisme qui permet à différents produits protéiques d'être produit à partir d'un gène lorsque différentes combinaisons d'introns ou exons vont être retirées du transcrit. Cet épissage peut être aléatoire ou contrôlé afin d'agir comme un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle. Concernant *LOXL2*, une nouvelle isoforme a été mise en évidence en 2014 (Lv et al. 2014). L'isoforme *LOXL2 Δ e13* est dépourvue d'exon 3, présente un décalage du cadre de lecture, aboutissant alors à une protéine tronquée. Celle-ci possède un rôle important dans la progression tumorale. Elle favorise l'invasion

des cellules de carcinome épidermoïde de l'œsophage via l'induction de l'expression de MAPK8 (Wu, Lv, et al. 2014). La même équipe a permis de révéler un deuxième variant d'épissage, LOXL2 Δ 72 dans lequel 72 nucléotides sont manquants dans l'exon 5 (Wu, Zou, et al. 2014). LOXL2 Δ 72 a une activité enzymatique fortement réduite et n'est plus sécrétée. Cependant, cette isoforme favorise la migration et l'invasion du carcinome épidermoïde de l'œsophage par la régulation de CCL28 (Zou et al. 2016). Plus récemment, le variant LOXL2 Δ e13 a été décrit, dans un contexte différent, induisant une perte de tissu adipeux chez la souris en affectant l'homéostasie du microbiote intestinal et le métabolisme lipidique multi-tissulaire (Chen et al. 2022). Enfin, un nouveau variant d'épissage contenant 120 pb en plus entre les exons canoniques 1 et 2 a été identifié dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou HPV négatif. Ce variant peut favoriser la progression de ce cancer par l'activation de la voie FAK/AKT (Chao Liu et al. 2020).

Les microARN (miARN) sont des régulateurs post-transcriptionnels permettant l'extinction d'un gène. En effet, leur rôle principal est de réprimer l'expression génique en s'hybridant par complémentarité de séquence à leurs ARN cibles. Dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou, trois miARN suppresseurs de tumeurs, miR-26a/b, miR-29a/b/c et miR-218 contrôlent directement l'expression de LOXL2 et entraînent une inhibition des capacités invasives et métastatiques médiées par LOXL2. Ces observations ont été par ailleurs confirmées dans le cancer de la prostate (Fukumoto et al. 2016; Kato et al. 2017). De nombreuses études ont conforté le lien entre miR-29 plus précisément et LOXL2, notamment dans le carcinome rénal (Nishikawa et al. 2015), le cancer pancréatique (Dey et al. 2020) et la fibrose pulmonaire idiopathique (Kamikawaji et al. 2016). Dans le cancer du poumon non à petites cellules, Ye et al, montre aussi que le miR-504 inhibe la prolifération et l'invasion en ciblant LOXL2 (Ye et al. 2018).

Plus récemment, de nombreuses études ont révélé que les long ARN non codants (lncARN) sont impliqués dans la régulation génique bien qu'ils ne puissent être traduits en protéine, et ainsi avoir un rôle important dans la progression de certains cancers. En effet, les lncARN peuvent entrer en compétition avec les miRNA et réguler ainsi leur activité. Ces ARN compétitifs agissent comme des « éponges » moléculaires pour un miARN et dé-réprimer ainsi les gènes cibles du miARN. En 2021, Zheng et al, ont montré le rôle de lncARN LINC01347 dans le cancer colorectal. Ce lncARN participe à la régulation de LOXL2 en « épongeant » le miR-328-5p et permet ainsi la prolifération cellulaire et la résistance à la chimiothérapie (Zheng et al. 2021). En 2022, trois autres études ont démontré la régulation de LOXL2 par des lncARN. Dans le cancer du col de l'utérus, le lncARN KCNQ1OT1 régule l'expression de LOXL2 en « épongeant » le miR-1270, ce qui favorise la progression de ce cancer via la voie PI3K/AKT (L. Jiang et al. 2022). Le lncCARMN est impliqué dans la progression du carcinome hépatocellulaire via l'axe miR-192-5p/LOXL2 (Wang et al. 2022). Enfin, le lncARN HCP5 a été décrit comme promouvant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules d'ostéosarcome via l'axe miR-29b-3p-LOXL2 (Tan et al. 2022).

3. Régulation post-translationnelle :

Nous avons peu d'informations concernant la régulation post-translationnelle de LOXL2. Cependant, quelques études montrent un rôle important de la glycosylation de LOXL2. Xu et al, ont d'abord montré en 2013 que la protéine LOXL2 humaine recombinante produite dans des cellules de drosophile S2 présente trois sites de N-glycosylation, à savoir Asn-288 (dans le deuxième domaine SRCR), Asn-455 (dans le quatrième domaine SRCR) et Asn-644 (dans le domaine catalytique) (Xu et al. 2013). Les sites Asn-455 et Asn-644 étant essentiels à la stabilité et la sécrétion de LOXL2. L'impact de ces glycanes sur la sécrétion de LOXL2 est aussi confirmé dans les cellules humaines embryonnaires de rein, et les cellules de cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-23 (Moon et al. 2013a; Go et al. 2018). Enfin, dans le rhabdomyosarcome alvéolaire, une forte expression, N-glycosylation et sécrétion de LOXL2 ont été décrites. L'inhibition de la N-glycosylation par la tunicamycine, empêche ainsi la sécrétion de LOXL2, confirmant que la N-glycosylation est essentielle à sa sécrétion. De plus, la génération d'un mutant non sécrété de LOXL2 par mutation des sites de glycosylation, a montré que la protéine LOXL2 intracellulaire est suffisante pour augmenter la migration et l'invasion cellulaire dans ce cancer (Almacellas-Rabaiget et al. 2020a).

Nous avons vu précédemment que la protéine LOX est catalytiquement active lorsque la protéine BMP-1 clive le pro-domaine LOX entre les résidus Gly168 et Asp169. Or, le site de clivage BMP-1 n'est pas conservé entre les différents membres de la famille des lysyl oxydases. Okada et al, ont néanmoins mis en évidence que LOXL2 subit un traitement protéolytique lors de sa sécrétion entre les deuxièmes et troisièmes domaines SRCR. Par un criblage d'inhibiteurs et des études de mutagenèse dirigée, ils ont conclu que PACE4 est la principale protéase qui agit sur LOXL2 extracellulaire (Okada et al. 2018).

B. Rôle de LOXL2 dans la progression tumorale

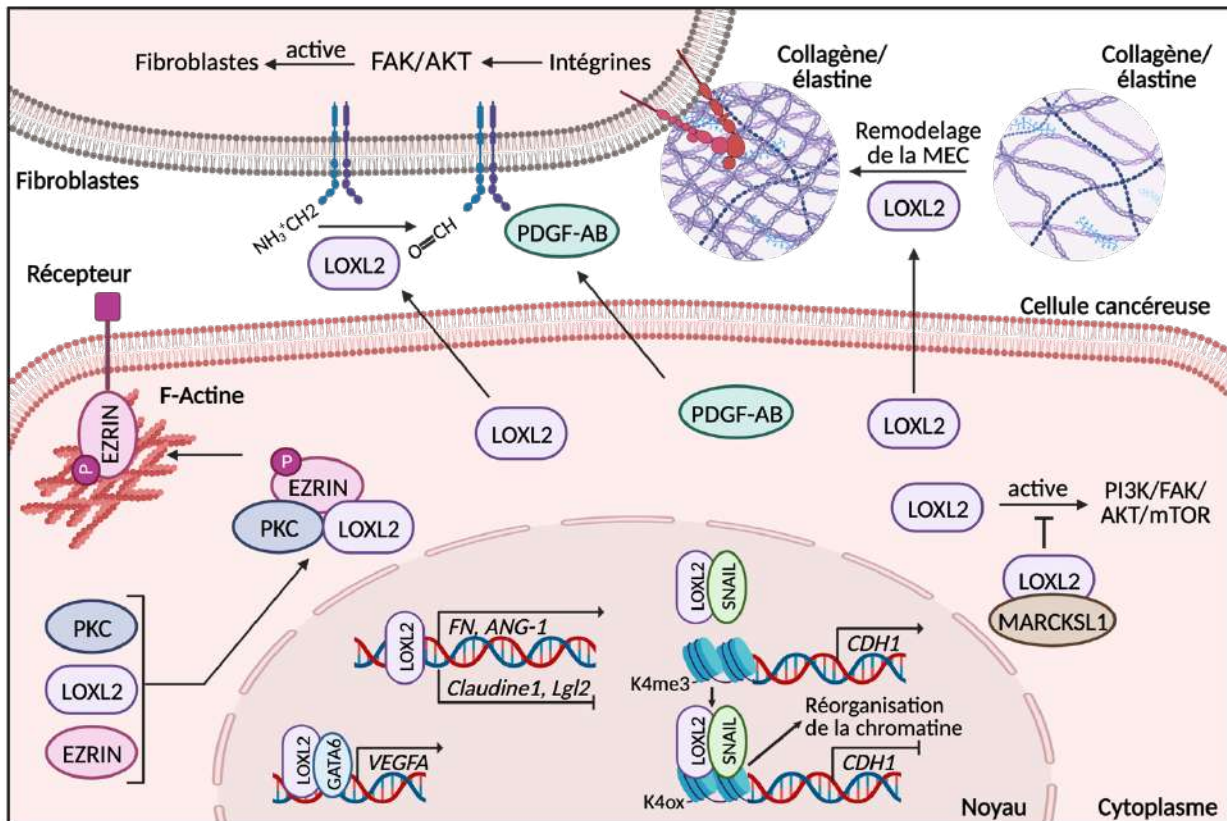


Figure 30 : Effecteurs en aval de LOXL2 dans le cancer

Au niveau extracellulaire, l'enzyme LOXL2 est capable d'oxyder le collagène et l'élastine de la matrice extracellulaire et le récepteur PDGFR β . Dans le cytoplasme, nous retrouvons différents effecteurs comme EZRIN ou MARCKSL1. Enfin, dans le noyau, LOXL2 interagit avec des facteurs de transcription tels que SNAIL et GATA6 pour affecter la transcription de gènes en aval comme CDH1, Claudine1, Lgl2, ou encore FN. Adapté de (Wen, Xu, et Li 2020).

1. Le développement de la tumeur primaire

Les communications entre les cellules cancéreuses et leur micro-environnement sont cruciales et influencent l'évolution tumorale de son initiation jusqu'à la formation de métastases. L'organisation et les propriétés biophysiques de la MEC conduisent à l'activation de différentes voies de signalisation modulant le phénotype cellulaire. Un tissu mammaire dense représente par exemple l'un des risques les plus importants de développer un cancer du sein (McCormack et dos Santos Silva 2006), et est caractérisé par une cellularité épithéliale et stromale accrue et par une augmentation significative du dépôt de collagène fibrillaire. Dans un modèle de souris transgénique qui présente une augmentation du collagène stromal dans le tissu mammaire de souris, la densité accrue de collagène entraîne une augmentation significative de la formation

de tumeurs d'environ trois fois, favorisant ainsi l'initiation tumorale (Provenzano et al. 2008). De plus, la réticulation du collagène par les lysyl oxydases accroît la rigidité de la MEC, ce qui favorise l'activation des adhésions focales et de la voie PI3K et ainsi la transformation maligne (Levental et al. 2009).

Enfin, une étude a montré que LOXL2 participe à l'initiation tumorale, en permettant aux cellules d'échapper à la sénescence induite par le stress oncogénique. En effet, cette sénescence permet de bloquer la prolifération cellulaire et ainsi protège de la tumorigenèse. Dans un modèle *in vivo* d'adénocarcinome canalaire pancréatique agressif, l'augmentation de l'activité de la lysyl oxydase accélère l'échappement à la sénescence, tandis que son inhibition stabilise la sénescence, retarde la tumorigenèse et augmente ainsi la survie des souris. Ce mécanisme repose sur la régulation de la voie FAK par l'activité de LOX/LOXL2 (Wiel et al. 2013).

2. La prolifération

Peu d'études montrent un rôle de LOXL2 dans la prolifération cellulaire. Dans le cancer colorectal, la déplétion stable de LOXL2 diminue la prolifération en entraînant un arrêt de cycle *in vitro*, et freine la croissance tumorale *in vivo* (Cui et al. 2018). En s'intéressant au rôle de la protéine MARCKSL1 dans le carcinome mammaire, Kim et al, ont mis en évidence une interaction physique entre MARCKSL1 et LOXL2 par des tests d'interaction par double hybride dans la levure et de co-immunoprécipitations. Les auteurs ont ensuite observé que LOXL2 active la croissance cellulaire en inhibant l'apoptose induite par MARCKSL1, et montré que LOXL2 active la phosphorylation des composants de la cascade de signalisation FAK/AKT/mTOR (Kim et al. 2014).

3. L'angiogenèse tumorale

Nous avons précédemment abordé la régulation de LOXL2 par l'hypoxie. Dans des conditions hypoxiques, les tumeurs vont pallier le manque d'oxygène par le développement de leur vascularisation. En effet, la germination de nouveaux vaisseaux est initiée par la stimulation des cellules endothéliales par différents signaux comme l'hypoxie et est associée à un remodelage important de la matrice extracellulaire vasculaire. L'expression de LOXL2 est retrouvée dans les néovaisseaux et accumulée dans la MEC endothéliale. L'enzyme LOXL2 est impliquée dans l'assemblage du réseau de collagène IV dans la membrane basale vasculaire, et est ainsi nécessaire pour la formation de capillaires *in vitro* et *in vivo* chez le poisson zèbre (Bignon et al. 2011) (Bignon et al, 2011). Enfin, l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre LOXL2 permet de diminuer la capacité à former des capillaires sanguins des cellules endothéliales *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo* de façon dépendante de l'activité catalytique de l'enzyme (Zaffryar-Eilot et al. 2013).

Une autre étude a montré que LOXL2 joue un rôle dans l'angiogenèse indépendamment de son activité catalytique. Les auteurs ont mis en évidence ce rôle par la modulation de la transition endothélio-mésenchymateuse. La déplétion de LOXL2 entraîne une diminution de la germination angiogénique associée à une diminution de marqueurs mésenchymateux et une augmentation de marqueurs endothéliaux comme PECAM-1 and VE-cadhérine (de Jong et al. 2019). D'autres mécanismes décrivant le rôle de LOXL2 dans l'angiogenèse ont été proposés. Par exemple, l'interaction entre LOXL2 et GATA6 permet l'induction de VEGFA pour favoriser l'angiogenèse dans le cholangiocarcinome (Peng et al. 2019).

4. La transition épithélio-mésenchymateuse

Comme nous l'avons vu précédemment, la TEM est un événement clé de la progression tumorale des tumeurs épithéliales, permettant l'acquisition de propriétés invasives et favorisant ainsi la dissémination des cellules. Une étape importante de la TEM est la perte d'expression de la protéine d'adhérence épithéliale E-Cadhérine au profit de certains marqueurs mésenchymateux comme la vimentine. Plusieurs facteurs de transcription sont des inducteurs de la TEM et permettent ainsi de réprimer le gène de l'E-cadhérine (*CDH1*) dont les membres des familles SNAIL, bHLH et ZEB. En 2005, Peinado et al, ont montré que certains membres

de la famille des lysyl oxydases (dont LOXL2) peuvent interagir et coopérer avec SNAIL pour réprimer l'expression de l'E-cadhérine. De plus, la surexpression de LOXL2 est suffisante pour induire la TEM (Peinado et al. 2005). Concernant le mécanisme, la stabilité de SNAIL est contrôlée par la phosphorylation dépendante de GSK3 β et son ubiquitination/dégradation. LOXL2 semble atténuer la dégradation de SNAIL dépendante de GSK3 β par son interaction avec SNAIL (Peinado et al. 2005). De façon intéressante, les mutants catalytiquement inactifs de LOXL2 sont toujours capables d'interagir avec SNAIL pour réprimer l'E-cadhérine, montrant ainsi que le rôle de LOXL2 dans la stabilité de SNAIL et la TEM est indépendant de son activité enzymatique (Cuevas et al. 2014). Récemment, l'implication de LOXL2 dans la TEM a été mise en évidence dans le cancer colorectal, le cancer du col de l'utérus et l'adénocarcinome du pancréas, où l'on retrouve une augmentation de l'E-cadhérine, et une perte d'expression de certains marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, SNAIL ou encore la N-cadhérine suite à la déplétion de LOXL2 (Kim et al. 2019; Park et al. 2017; Tian et al. 2019). Enfin, Moon et al, montrent dans le cancer du sein que LOXL2 est présent dans le noyau cellulaire afin de stabiliser le facteur de transcription SNAIL et induit ainsi la TEM via une diminution de l'expression de l'E-cadhérine, l'occludine, et le récepteur aux oestrogènes et une augmentation de l'expression de la vimentine, fibronectine, et MT1-MMP (Moon et al. 2013b).

5. La migration et l'invasion

En réponse à certains signaux et stress comme l'hypoxie, les cellules tumorales peuvent effectuer une TEM ou une transition vers un phénotype de type mésenchymal dans le cas des cellules de mélanome. Cela leur permet de devenir plus agressives et d'acquérir des capacités migratoires et invasives importantes. De par son rôle dans la TEM, LOXL2 est impliqué dans l'invasion des cellules de carcinome (Kim et al. 2019; Moon et al. 2013b). De nombreuses études se sont intéressées au rôle intracellulaire de LOXL2 dans l'invasion des cellules cancéreuses d'origine épithéliale et ont montré que LOXL2 favorise la migration tumorale. En effet, l'expression de LOXL2 dans des cellules non invasives de cancer du sein est suffisante pour permettre d'accroître leurs capacités migratoires (Hollosi et al. 2009). Nous retrouvons aussi d'autres études montrant que LOXL2 est impliqué dans la motilité, la migration et l'invasion des cancers du sein, et sa déplétion entraîne une diminution de la phosphorylation de FAK et SRC (Ahn et al. 2013). Enfin, LOXL2 a été impliqué dans la migration et l'invasion des cellules de carcinome rénal à cellules claires (Hase et al. 2014).

LOXL2 est aussi connu pour altérer la migration et l'invasion des cellules en agissant sur l'architecture cellulaire. Moreno-Bueno et al, ont montré que la déplétion de LOXL2 entraîne une diminution du caractère invasif et de la motilité des cellules de carcinome mammaire. Ces effets sur les capacités migratoires des cellules sont dus à l'implication de LOXL2 dans l'organisation des jonctions serrées et des complexes de polarité cellulaire en réprimant les promoteurs de *Claudin1* et *Lgl2* indépendamment de son activité enzymatique (Moreno-Bueno et al. 2011).

En 2016, une première étude montrant le rôle de la méthyltransférase SMYD3 dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de carcinome épidermoïde de l'œsophage (ESCC), a identifié LOXL2 et EZRIN comme étant deux protéines dont la transcription et la traduction sont activées par SMYD3 (Zhu et al. 2016). LOXL2 a par la suite été décrit comme se liant à plusieurs protéines cytoplasmiques de liaison à l'actine indépendamment de son activité catalytique. Son interaction avec la protéine EZRIN favorise alors sa phosphorylation et permet ainsi une invasion accrue des cellules de ESCC (Zhan et al. 2019).

Comme nous l'avons vu, l'alignement et la rigidité matricielle est un signal important pouvant altérer le phénotype des cellules cancéreuses et favoriser leur migration et invasion (Egeblad, Rasch, et Weaver 2010b). Il a d'ailleurs été montré que l'inhibition de LOXL2 extracellulaire par un anticorps bloquant altère l'organisation et la densité de la MEC interférant ainsi avec les capacités d'adhésion et d'invasion des cellules cancéreuses du sein (Grossman et al. 2016). De plus, l'expression de LOXL2 est retrouvée dans les lignées cellulaires hautement invasives et sa déplétion altère alors leurs capacités invasives. Au niveau mécanistique, LOXL2 sécrétée induit l'invasion des cellules tumorales gastriques exclusivement via la voie SRC/FAK (Peng et al. 2009). Plus récemment, certaines études ont montré que le microenvironnement tumoral des cancers du sein est riche en cytokines proinflammatoires dont l'oncostatin M (OSM). Le traitement des cellules de

carcinome canalaire invasif à l'OSM entraîne une activation de la transcription de *LOXL2* et permet ainsi l'augmentation de la sécrétion de LOXL2 enzymatiquement active. La présence de LOXL2 sécrétée favorise la réticulation du collagène de type I, ce qui conduit à un alignement significatif des fibres de collagène, et une capacité d'invasion accrue des cellules tumorales (Dinca et al. 2021).

6. La niche pré-métastatique et métastases

En plus du rôle de LOXL2 sur la progression tumorale et son implication dans l'acquisition et le maintien de propriétés invasives, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle de LOXL2 dans la formation de métastases (Peng et al. 2009; Moreno-Bueno et al. 2011). Plus précisément, la forte mortalité des patients atteints de cancer est attribuée au potentiel métastatique des cellules cancéreuses. Dans le cancer du sein, l'analyse de données de puces à ADN a mis en évidence une corrélation entre une forte expression de LOXL2 et les métastases cancéreuses. L'inhibition génétique, pharmacologique ou médiée par des anticorps dirigés contre LOXL2 conduit à une diminution significative de la formation de métastases à distance dans les modèles orthotopiques transgéniques, immunocompétents ou immunodéprimés du cancer du sein sans réduire la croissance tumorale primaire. De plus, LOXL2 semble réguler l'expression et l'activité des protéines extracellulaires TIMP1 et MMP9 favorisant ainsi l'invasion cellulaire (Barker et al. 2011).

De nombreuses études ont permis de mieux comprendre les mécanismes métastatiques des tumeurs solides bien que l'influence de la tumeur primaire sur l'organe cible est encore peu décrite. Le concept de « hallmarks of metastasis » a été, en effet, introduit en 2019 montrant une acquisition de quatre caractéristiques : la motilité et l'invasion, la capacité de moduler le microenvironnement local et le site secondaire, la plasticité, et la capacité de coloniser les tissus secondaires (Welch et Hurst 2019). L'hypothèse d'une niche métastatique indique que certains facteurs solubles et exosomes libérés par la tumeur primaire entrent dans la circulation sanguine et atteignent un organe distant afin d'y induire un environnement permissif (Psaila et Lyden 2009; Kaplan, Rafii, et Lyden 2006; Peinado et al. 2017). La niche métastatique permet ainsi de favoriser l'adhérence et la colonisation des cellules tumorales disséminées. Au cours du développement de la niche métastatique, on peut retrouver certaines altérations comme le remodelage matriciel, le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC), ou encore l'inflammation. La famille des lysyl oxydases est impliquée dans la formation de cette niche métastatique. En effet, les cellules tumorales primaires hypoxiques sécrètent la protéine LOX qui s'accumule sur les sites métastatiques et réticule par la suite le collagène IV permettant le recrutement et l'adhésion des cellules myéloïdes CD11b+. L'adhésion des cellules CD11b+ à la matrice réticulée augmente l'activité MMP-2 et entraîne un recrutement accru des BMDC. Ainsi, la formation de la niche pré-métastatique dépendante de LOX améliore la croissance métastatique (Erler et al. 2009). En réponse à la rigidité matricielle, la voie de signalisation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ /JNK/c-JUN permet de réguler l'expression de LOXL2 dans les cellules de carcinome hépatocellulaire. La sécrétion de LOXL2 entraîne la production de fibronectine et l'expression de MMP9 et CXCL12 par les fibroblastes pulmonaires afin de faciliter le recrutement de BMDC et ainsi de permettre la formation de la niche pré métastatique (Wu et al. 2018). La même équipe a approfondi cette étude grâce à des modèles *in vivo*. L'injection dans la veine caudale de milieu conditionné de cellules de carcinome hépatocellulaire surexprimant LOXL2 a mis une évidence un recrutement accru de BMDC pulmonaires et un remodelage important de la matrice pulmonaire, contribuant ainsi à la formation d'une niche pré-métastatique au poumon. Ils ont ensuite utilisé un modèle de xénogreffe et n'ont vu aucun impact de la surexpression de LOXL2 sur la croissance tumorale. Cependant, le nombre plus élevé de lésions métastatiques, ainsi que le recrutement plus important de BMDC indique que la formation de la niche médiée par LOXL2 favorise l'apparition de métastases pulmonaires dans le carcinome hépatocellulaire. Enfin, ils ont mis en évidence que LOXL2 entraîne un remodelage matriciel important, ce qui permet ainsi une adhésion plus importante des cellules de carcinome, et l'expression de la chimiokine CXCL2 bénéfique pour le tropisme pulmonaire (S. Wu et al. 2018; Wong et al. 2014). LOXL2 est également un facteur important de la métastase pulmonaire du cancer du sein. Cet effet est indépendant de la réticulation et de la rigidité de la MEC au niveau de la tumeur primaire ou des métastases mais dépend de la régulation post traductionnelle du facteur de transcription SNAIL dans les cellules cancéreuses et de la capacité de LOXL2 à favoriser l'expression de cytokines et le

recrutement de cellules myéloïdes immatures vers les organes distants, facilitant ainsi la formation d'une niche pré-métastatique au poumon. (Salvador et al. 2017).

7. Résistance au traitement

Quelques études montrent un rôle de LOXL2 dans la résistance aux traitements anti-cancéreux dépendant de son activité enzymatique de biogenèse des fibres de collagène. En effet, le stroma tumoral et la MEC contribuent à l'agressivité des cellules tumorales et limitent l'efficacité des traitements. Le développement de stratégies de ciblage du remodelage matriciel afin d'améliorer l'efficacité des thérapies a fait l'objet de nombreux travaux. Dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique, une activité accrue de LOXL2 favorise une résistance importante à la gemcitabine. Dans ce cas, cette résistance est due à une diminution de la diffusion intra-tumorale de la chimiothérapie qui s'explique par une augmentation du collagène fibrillaire causée par l'activité de réticulation du collagène de la protéine LOXL2 (Le Calvé et al. 2016; Schütze et al. 2015). L'utilisation d'un inhibiteur pan-lysyl oxidase, le PXS-5505 diminue la desmoplasie et la rigidité induite par la chimiothérapie et renforce son efficacité (Chitty et al. 2023). Dans le cancer du sein, LOXL2 a été décrit comme pouvant entraîner une oxydation de l'histone 3 sur la lysine 4. Le ciblage de LOXL2 entraîne alors une diminution de H3K4ox, permet une décompression de la chromatine et une activité plus importante de la réponse aux dommages à l'ADN. Cela améliore ainsi la chimiosensibilité des cellules de cancer du sein triple négatif (Cebrià-Costa et al. 2020). Enfin, plusieurs études montrent la contribution de LOXL2 dans la résistance à la chimiothérapie 5-FU du cancer colorectal et du cancer du foie par différents mécanismes. Gong et al, ont montré qu'un environnement riche en collagène peut influencer la distribution de l'oxygène et ainsi augmenter la signalisation de l'hypoxie connue pour réguler l'expression de LOXL2, capable de remodeler la MEC. La surexpression de LOXL2 conduit à une résistance face aux traitements au 5-FU en activant l'axe de signalisation ITGA5/FAK/PI3K/ROCK1 (Gong et al. 2022). Comme nous l'avons vu précédemment, les miARN sont impliqués dans la régulation de LOXL2. Ainsi, dans le cancer colorectal, un mécanisme de résistance au 5-FU par l'axe LINC01347/miR-328/LOXL2 a été identifié (Zheng et al. 2021). LOXL2 peut également altérer la sensibilité au 5-FU par la voie de signalisation Hedgehog/BCL2 (Qiu et al. 2022).

De plus, plusieurs études ont mis en évidence le rôle du remodelage du microenvironnement dans la résistance aux immunothérapies. En effet, la MEC peut former une barrière empêchant l'infiltration des LT. L'étude de Nicolas-Boluda et al, montre que la rigidité tumorale est corrélée à la réticulation de la MEC et la croissance tumorale, et inversement corrélée à la migration des LT dans plusieurs modèles de cancer. Ainsi, le ciblage du remodelage de la MEC par l'inhibition de la lysyl oxidase LOX avec du BAPN réduit la rigidité tumorale, favorise la migration des LT et augmente ainsi l'efficacité thérapeutique du blocage de PD-1 (Nicolas-Boluda et al. 2021). Une seconde étude montre que les tumeurs pulmonaires résistantes au blocage de PD-1/PD-L1 ont un dépôt de collagène plus élevé qui entraîne une immunosuppression tumorale. Celle-ci est caractérisée par une diminution des LT CD8+ intratumoraux et une augmentation de la population de LT CD8+ épuisés TIM3+. La stratégie des auteurs pour empêcher ce dépôt de collagène est alors de cibler l'enzyme de réticulation LOXL2 cette fois ci, par de l'acide ellagique. Ainsi, la suppression de LOXL2 sensibilise les tumeurs pulmonaires au blocage de PD-L1 (Peng et al. 2020).

C. LOXL2 en tant que cible thérapeutique

LOXL2 est impliquée dans de nombreux processus favorisant la progression tumorale vers un phénotype agressif et représente un marqueur de mauvais pronostic de survie pour les patients (Peinado et al. 2008; Ninomiya et al. 2018; Hase et al. 2014; Tanaka et al. 2018). Le ciblage de LOXL2 apparaît donc comme une nouvelle approche thérapeutique cohérente dans différents cancers. Pour se faire, les études se sont multipliées afin de développer des inhibiteurs spécifiques de LOXL2.

Le β -Aminopropionitrile (β -APN ou BAPN) est le premier inhibiteur bien caractérisé. Il cible cependant de manière non spécifique et irréversible la famille pan-LOX en se liant de manière covalente au site actif des

enzymes de la famille LOX (Tang, Trackman, et Kagan 1983). Cet inhibiteur a montré des effets anti-tumoraux *in vitro* et *in vivo*, notamment une diminution des capacités de migration et d'invasion dans le cancer du col de l'utérus (X. Yang et al. 2013), une inhibition de l'expression et de l'activité des métalloprotéases 2 et 9 (Lei Zhao et al. 2019), une diminution de la croissance tumorale (Matsuoka et al. 2020) ou encore une meilleure réponse à l'immunothérapie anti-PD-1, en particulier dans le mélanome (Nicolas-Boluda et al. 2021).

De manière indirecte, le ciblage de la famille LOX peut se faire par des chélateurs de cuivre qui ciblent l'activité catalytique de LOX en se liant au cuivre, épuisant ainsi les ressources de cuivre utilisables par les LOX. Il existe le tétrathiomolybdate qui a été décrit comme pouvant réduire les fibroses pulmonaires et la réticulation du collagène et la D-pénicillamine. Celle-ci a d'abord été décrite comme un inhibiteur de LOXL2 qui permet de réduire les métastases pulmonaires (Barker et al. 2011). Cependant, les chélateurs de cuivre ne sont pas spécifiques de LOXL2 et n'apparaissent pas comme une stratégie de traitement prometteuse étant donné que les ions cuivre sont importants pour de nombreux processus biologiques et réactions enzymatiques.

La structure du β -APN a permis de développer différentes petites molécules capables de cibler certains membres de la famille des LOX plus ou moins spécifiquement. Deux générations de petites molécules inhibitrices de LOXL2 ont été générées : PXS-S1A et PXS-S2A. Le PXS-S1A affiche une activité et une sélectivité pour LOX et LOXL2 semblable au β -APN, mais des modifications structurelles ont facilement été apportées. Le PXS-S2A est ainsi un inhibiteur puissant et hautement sélectif de LOXL2. L'efficacité de ces inhibiteurs a été testée tout d'abord *in vitro* par différents tests qui ont mis en évidence que les composés PXS inhibent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de cancer du sein triple négatif. De plus, le ciblage de LOX/LOXL2 par ces inhibiteurs, *in vivo*, est capable de retarder la croissance tumorale et de réduire la charge métastatique (Chang et al. 2017). Le PAT-1251 est une petite molécule inhibitrice hautement spécifique de LOXL2 est le premier composé à entrer en développement clinique (Rowbottom et al. 2017). Leung *et al.*, ont à leur tour développé un inhibiteur de LOX à base d'aminométhyléthiophène (AMT), le CCT365623. Ces inhibiteurs sont spécifiques de LOX/LOXL2 et entraînent une diminution de la croissance tumorale et des métastases pulmonaires dans un modèle murin de cancer du sein (Leung et al. 2019). Enfin, Schilter *et al.*, décrivent le développement d'un inhibiteur double LOXL2/LOXL3 à action rapide et irréversible : le PXS-5153A. Cet inhibiteur est capable *in vitro* de diminuer l'oxydation du collagène médiée par LOXL2 et ainsi sa réticulation. Dans un modèle de fibrose hépatique, l'inhibition de l'activité enzymatique de LOXL2/3 améliore la fonction hépatique et réduit la sévérité de la maladie en diminuant la réticulation du collagène (Schilter et al. 2019). En 2023, le petit inhibiteur PXS-5505 a montré son efficacité dans des modèles KPC et PDX dans les cancers du pancréas. Il s'agit du premier inhibiteur pan-LOX de sa catégorie qui permet de bloquer la réticulation du collagène médié par les CAFs, et de diminuer l'invasion des cellules cancéreuses de pancréas. Son utilisation *in vivo* en combinaison avec la gemcitabine améliore la survie des souris, réduit les métastases et améliore la réponse des métastases établies à la chimiothérapie. L'utilisation d'un petit inhibiteur ciblant la famille des LOX pourrait alors avoir une meilleure efficacité en clinique, étant donné les rôles redondants des différents membres de la famille des Lysyl Oxidases (Chitty et al. 2023).

En tant que stratégie d'inhibition de LOXL2, nous retrouvons aussi l'anticorps GS-6624 dont la version humanisée a été développée. Il s'agit du Simtuzumab qui inhibe LOXL2 extracellulaire de manière non-compétitive en se liant au quatrième domaine SRCR de la protéine. L'inhibition de LOXL2 par cet anticorps a des effets bénéfiques sur les fibroses et le cancer avec notamment une réduction de métastases dans des modèles pré-cliniques (Barker et al. 2011; Ikenaga et al. 2017; Rodriguez et al. 2010). Un anticorps dirigé contre le site actif de la protéine LOXL2, le GS341 a également été développé. Cet anticorps modifie alors l'orientation et l'épaisseur des fibres de collagène, ce qui perturbe fortement la prolifération, l'adhésion, l'invasion, la migration des cellules cancéreuses ainsi que la croissance tumorale *in vivo* (Grossman et al. 2016).

Concernant les essais cliniques, l'anticorps Simtuzumab a atteint la phase II dans plusieurs pathologies fibrotiques notamment la fibrose pulmonaire idiopathique, la fibrose hépatique, ou encore la myélofibrose. En oncologie, le Simtuzumab a été associé à la gemcitabine pour les patients atteints de cancer du pancréas (Benson et al. 2017). Bien que cet anticorps ait été bien toléré par les patients, les essais cliniques ont été arrêtés faute d'efficacité (Muir et al. 2019; Harrison et al. 2018). Comme abordé ci-dessus, le rôle

intracellulaire de LOXL2 est important pour la progression tumorale et bloquer uniquement son activité extracellulaire de réticulation du collagène n'est pas suffisant pour lutter contre les cancers métastatiques. C'est la raison pour laquelle des études exploratoires et approfondies sur LOXL2 et les mécanismes impliqués dans son action pro-invasive sont encore nécessaires, afin d'évaluer le potentiel de LOXL2 comme cible thérapeutique utilisable et efficace en clinique.

Contexte et objectifs de la thèse

Le mélanome cutané est un cancer de la peau d'origine non-épithéliale, agressif de par son extrême plasticité et son potentiel métastatique. Aujourd'hui de nouveaux traitements sont proposés comme les thérapies moléculaires ciblant l'oncogène BRAFV600E. Cependant, ces traitements sont limités à des sous-groupes de patients et les rechutes sont fréquentes. Tout au long du développement métastatique, la cellule cancéreuse fait preuve d'une importante plasticité phénotypique. On distingue différentes sous-populations cellulaires ayant des profils transcriptionnels associés à des comportements phénotypiques distincts. Les cellules de mélanome oscillent majoritairement entre une sous-population cellulaire mélanocytaire proliférative et une sous-population dédifférenciée de type mésenchymale, invasive et faiblement proliférative. Cette hétérogénéité intra-tumorale est marquée par une différence dans l'expression du facteur de transcription du lignage mélanocytaire MITF. Les cellules qui expriment MITF (*MITF^{high}*) sont prolifératives et dépourvues de capacités invasives. À l'inverse, les cellules *MITF^{low}* sont dédifférenciées, peu prolifératives, mais particulièrement invasives et expriment les marqueurs mésenchymateux comme SNAIL, ZEB1, la fibronectine ou de résistance thérapeutique comme AXL (Rambow, Marine, et Goding 2019). Ce processus dynamique appelé transition ou « switch » phénotypique rend compte des capacités uniques d'adaptation et de plasticité des cellules tumorales face aux signaux du microenvironnement et aux traitements anti-cancéreux. La transition vers un phénotype mésenchymateux invasif *MITF^{low}/AXL^{high}* représente un processus majeur de résistance non-génétique aux inhibiteurs de BRAF BRAFV600E et MEK (BRAFi/MEKi) (Hugo et al. 2015b; Girard et al. 2020; Diazi et al. 2022).

L'évolution des mélanomes est influencée par des altérations de leur microenvironnement au sein des niches tumorales. Les cellules stromales dont les CAF et les cellules tumorales sécrètent et remodelent la MEC constituant un réseau fibrillaire ayant des propriétés physico-chimiques propices à la progression tumorale et la chimiorésistance (Popovic et Tartare-Deckert 2022). Les travaux du laboratoire ont établi un lien original entre les propriétés mécaniques de la MEC et la résistance aux thérapies ciblées dans les mélanomes mutés BRAF (Girard et al. 2020; Berestjuk et al. 2022). De plus, nous avons observé une accumulation de LOXL2, une enzyme d'assemblage et de rigidité du collagène, dans la matrice produite par les cellules de mélanome dédifférenciées ayant acquises une résistance à la thérapie ciblée. LOXL2 est un membre de la famille des protéines LOX qui contrôlent la réticulation des fibres de collagène. En plus de son rôle conventionnel dans l'échafaudage du collagène, LOXL2 joue un rôle dans la TEM dans plusieurs carcinomes, dont les cancers du sein, principalement par son interaction avec SNAIL dans le noyau des cellules tumorales. Cependant, son rôle dans le comportement et la biologie des mélanomes n'est pas connu (Cano, Santamaría, et Moreno-Bueno 2012). Mon projet de thèse visait à étudier le rôle de cette enzyme dans la transition phénotypique mésenchymateuse et la résistance thérapeutique des cellules de mélanome ainsi que dans les propriétés physico-chimiques de la MEC au sein du microenvironnement tumoral. Mes résultats s'articulent autour de deux axes :

1) Rôle de LOXL2 produit par les cellules tumorales dans les propriétés mésenchymateuses des cellules de mélanome dédifférenciées.

2) Rôle de LOXL2 produit par les fibroblastes du microenvironnement dans l'assemblage de la matrice et sur le comportement des cellules de mélanome.

Résultats

Article 1 : The Lysyl OXidase Like 2 (LOXL2) plays a critical role in extracellular matrix remodeling and invasive properties of dedifferentiated mesenchymal melanoma cells

The Lysyl OXidase Like protein 2 (LOXL2) plays a critical role in extracellular matrix remodeling and invasive properties of dedifferentiated mesenchymal melanoma cells

Alexandrine CARMINATI^{1,2}, Christophe GIRARD^{1,2}, Pierric BIBER^{1,2}, Mira KAHIL^{1,2}, Margaux LECACHEUR^{1,2}, Océane BOUVET^{1,2}, Serena DIAZZI^{1,2}, Mehdi KHALED³, Grégory MICHEL¹, Luc CAMOIN⁴, Stéphane AUDEBERT⁴, Sophie TARTARE-DECKERT^{1,2*} and Marcel DECKERT^{1,2*}

¹ Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France

² Equipe labellisée Ligue contre la Cancer, Nice, France

³ INSERM U1186, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, Villejuif, France

⁴ Université Aix-Marseille, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille, France

Running title: LOXL2 and melanoma

Keywords: melanoma, phenotypic plasticity, LOXL2, extracellular matrix, invasion, metastasis

Corresponding Authors: Sophie Tartare-Deckert tartare@unice.fr and Marcel Deckert deckert@unice.fr, Inserm UMR1065/C3M, 151 Route de Ginestière BP2 3194, F-06204 Nice cedex 3, France.

*equal contribution

ABSTRACT

Cutaneous melanoma is a highly malignant and invasive skin cancer with a non-epithelial origin. Despite successful therapies targeting the BRAFV600E oncogenic pathway or immune checkpoints, resistances invariably followed by metastatic relapse occur. Upon microenvironment and therapeutic pressures, melanoma cells can switch from a melanocytic state to dedifferentiated states associated with increased expression of receptors tyrosine kinases, mesenchymal or neural crest stem cell-like markers. Such adaptive plasticity was described as a driver of non-genetic resistance to targeted therapies (TT). We previously reported that mesenchymal-like TT-resistant melanoma cells produce an abundant extracellular matrix (ECM) enriched in LOXL2, an enzyme responsible for collagen cross-linking. In addition to promote ECM stiffening and tumor progression, LOXL2 is known to drive metastasis through regulation of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in some carcinomas. However, its role in melanoma biology remains poorly explored. Here, we demonstrated that LOXL2 is preferentially expressed by dedifferentiated melanoma cell subsets and that its expression is associated with a poor prognosis in melanoma. Consistently, LOXL2 is induced by hypoxia or TT as well as by the genetic silencing of the melanoma cell plasticity transcription factor MITF, signals known to promote cellular transition to a poorly differentiated mesenchymal phenotype. Additional analyses showed that elevated levels of LOXL2 in mesenchymal-like cells are maintained by the EMT transcription factor ZEB1. Using RNAi approaches, we revealed that LOXL2 contributes in a cell-autonomous manner to focal adhesion formation and mesenchymal cell morphology as well as TT-induced myofibroblast-like ECM remodeling activity. Notably, LOXL2 is required for melanoma cell migration, invasion and lung metastasis. Mechanistically, comparative proteomic analysis identified the plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2)/SERPINB2 as a potential effector of LOXL2-mediated cell migration and contractile properties. Together, these findings reveal the critical contribution of LOXL2 in the functional properties of the mesenchymal dedifferentiated population of melanoma cells, and define a novel mechanism driving melanoma cell invasive behavior and metastatic disease.

INTRODUCTION

Cutaneous melanoma is a very aggressive cancer with poor prognosis in advanced stages. Melanoma is a non-epithelial tumor that develops from the malignant transformation of neural crest-derived melanocytes, the pigmented cells of the epidermis and recognized as one of the cancer types with the highest propensity to metastasize¹. Melanoma progression is based on the accumulation of (epi)genetic alterations affecting tumor cell survival, proliferation and invasive abilities. The majority of cutaneous melanomas results from oncogenic mutations that lead to constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, with driver mutations in the *BRAF* or *NRAS* gene being the most common². BRAFV600E/K mutations found in more than 50% of human melanomas led to the development of selective inhibitors of mutant BRAF proteins (BRAF inhibitors, BRAFi), which are used clinically in combination with MEK inhibitors (MEKi) for treating advanced melanomas³. For patients who do not carry a BRAF mutation or who have relapsed after targeted therapies (TT), therapeutic options involving antibodies against immune checkpoints can be proposed. However, a majority of patients do not respond, and many escape these treatments due to acquired resistance involving secondary genomic alterations or non-genetic phenotypic reprogramming mechanisms⁴⁻⁶.

Throughout disease progression, melanoma cells display remarkable plasticity creating a high degree of intratumoral heterogeneity⁷. During the invasive phase of tumor development, melanoma cells reactivate an embryonic transdifferentiation program, similar to epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). Melanoma cells undergoing EMT-like process express mesenchymal markers such as N-cadherin, fibronectin and SPARC⁸. This tumor program contributes to the emergence of invasive cells with increased survival capabilities^{9,10} and involves transcriptional regulators, such as members of the SNAIL, ZEB or TWIST families. These factors coordinate mesenchymal-like transition and are key players in tumor cell plasticity¹¹. Recent studies have identified melanoma cell subpopulations that are classified according to their differentiation state and transcriptional signature^{12,13}. Herein we will refer to two main melanoma cell subpopulations: "melanocytic" and "dedifferentiated" cells¹⁴. This phenotypic and functional heterogeneity is marked by a difference in the expression of the melanocytic lineage transcription factor MITF (Microphthalmia-associated transcription factor). Cells expressing MITF (MITF^{high}) are proliferative and lack invasive capabilities. Conversely, dedifferentiated MITF^{low} cells are minimally proliferative but highly invasive, and express mesenchymal, neural crest stem cell-like or resistance markers such as AXL^{7,15,16}. Remarkably, MITF^{high} cells can switch to an invasive MITF^{low} phenotype and vice versa. This dynamic process accounts for the adaptive and plasticity capabilities of melanoma cells. The phenotypic transition to a dedifferentiated cellular state is induced by signals from the tumor microenvironment, such as hypoxia or inflammation¹⁷, but also

by therapies themselves, including the combination of BRAFi and MEKi treatments¹². In this context, the acquisition of dedifferentiated MITF^{low} phenotypes has been described as a non-genetic process of escape and resistance to TT^{7,18,19}. This state of treatment-resistant mesenchymal cells is associated with overexpression of receptor tyrosine kinases (RTK) such as AXL or PDGFR β , upregulation of the miR-143/-145 cluster and activation of alternative survival pathways including the PI3K/AKT or YAP pathways, as well as increased cell invasiveness and metastasis formation^{18,20-22}.

Tumor cells evolve in a complex and dynamic ecosystem composed of stromal cells such as cancer-associated fibroblasts (CAF) and the extracellular matrix (ECM). The ECM, which is mainly produced and remodeled by fibroblasts, is composed of collagens, proteoglycans, glycoproteins and matricellular proteins²³. Tumors are characterized by abnormal ECM deposition. The increased deposition and organization of collagen fibers in tumors leads to increased stiffness compared to normal tissue²³. The lysyl oxidase (LOX) family, which includes five copper-dependent amine oxidases (LOX and LOXL1-4), catalyzes the covalent cross-link of collagen and elastin molecules to form structured and aligned fibers within the ECM. The increase in tumor stiffness is in part attributed to an increase in their expression and activity. LOX family enzymes are also involved in the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and tumor progression through extracellular and intracellular actions²⁴⁻²⁶. Consequently, higher LOX- or LOXL-expression is associated with a poor prognosis in several cancers²⁷. LOXL3 is overexpressed in cutaneous melanoma, where it contributes to tumor cell survival and phenotypic plasticity by regulating the expression of SNAIL1 and PRRX1 EMT transcription factors^{28,29}. Our previous studies have established a novel link between ECM stiffness and resistance to TT in BRAF-mutated melanoma and shown that melanoma cells adapt and resist to BRAFi/MEKi through biomechanical reprogramming involving acquisition of myofibroblast/CAF-like features leading to elevated expression of ECM proteins including LOXL2, collagen remodeling and tumor stiffening^{21,22}. LOXL2 was shown to contribute to tumor progression in different tumors of epithelial origin due to its collagen cross-linking and intracellular functions, but its role in melanoma behavior is not known. In this study, we establish an original link between LOXL2 expression, melanoma cell phenotypic diversity and ECM remodeling. We provide experimental evidence that expression of LOXL2 is linked to the mesenchymal MITF^{low} dedifferentiated tumor cell state harboring innate or acquired resistance to TT and also reveal that, in addition to its conventional role in collagen remodeling and cross-linking, LOXL2 exerts a tumor cell-autonomous pro-invasive and metastatic actions in melanoma.

Results

LOXL2 expression is associated with dedifferentiated melanoma cell states and mesenchymal resistance to targeted therapy

Phenotype switching has been described as a non-genetic process of resistance to TT in BRAF-mutant melanoma cells. By switching from a melanocytic proliferative $MITF^{high}/AXL^{low}$ phenotype to a dedifferentiated $MITF^{low}/AXL^{high}$ invasive phenotype, cells acquire resistance to BRAFi^{19,20}. This RTK-driven mesenchymal resistance is accompanied by acquisition of myofibroblast/CAF features and ECM remodeling activities^{21,22}. Using mass spectrometry analysis of the ECM produced by BRAFi-sensitive versus mesenchymal BRAFi-resistant melanoma cells, LOXL2 was found enriched in the matrisome derived from M238R dedifferentiated drug-resistant cells compared to M238P melanocytic parental cells²² (Figure 1A). In contrast, none of the other LOX family members were found enriched in M238R-derived ECM. We further validated the link between LOXL2 expression and acquired mesenchymal resistance to TT. qPCR and immunoblot analyses on isogenic pairs of parental and resistant cells showed a higher LOXL2 expression in M229R, M238R and SKMel28R AXL^{high} BRAFi-resistant cell lines compared to parental counterparts. Interestingly, we did not observe an increased expression of LOXL2 in M249R cells that display a genetic acquired resistance independent of phenotype switching (Figure 1B, C).

We next evaluated mRNA and protein levels of LOXL2 in a collection of therapy naïve melanoma cell lines and patient-derived short-term melanoma cultures according to their differentiation cell state markers MITF and AXL (Figure 1D, E and Supplementary Figure S1A). These expression analyses confirmed that LOXL2 is specifically found in melanoma cells with a predominant $MITF^{low}/AXL^{high}$ dedifferentiated profile. For other LOX family members, only undetectable (*LOXL1*) or non-significantly different (*LOX*, *LOXL3* and *LOXL4*) expression levels between melanocytic and dedifferentiated melanoma cells were observed (Figure 1D). Consistently, *in silico* analyses of gene expression datasets of the melanoma differentiation signature showed that *LOXL2* levels were increased in the undifferentiated (U) and neural crest-like (NC) cell subpopulations, the two dedifferentiated cell phenotypes described by Tsoi et al. (2018) (Figure 1F)³⁰. On the contrary, *LOXL2* is barely expressed in melanocytic and intermediate phenotypes. Higher *LOXL2* expression was also detected in the Hoek's invasive transcriptome signature of melanoma cells (Supplementary Figure S1B)^{19,31}. Given these observations, we checked *LOXL2* expression in gene expression public database within the Mannheim cohort (GSE62526) and revealed that high expression of *LOXL2* is associated with low expression of *MITF* (Figure 1G). Spearman's correlation analysis of the *MITF*, *AXL*, *ZEB1* and *LOXL2* mRNA expression also confirmed that *LOXL2* expression is inversely associated with *MITF* and positively associated with

expression of the mesenchymal markers *AXL* and *ZEB1* (Figure 1H). To confirm the potential link between LOXL2 expression and transition to poorly differentiated cell states, we performed a siRNA-mediated knockdown of MITF in melanocytic 501Mel and SKMel28P cells. Figure 1I indicates that depletion of MITF led to an increase in LOXL2 expression. Conversely, siRNA-mediated knockdown of the EMT regulatory transcription factor ZEB1 strongly decreased LOXL2 protein levels in dedifferentiated 1205Lu and BRAFi-resistant M238R cells (Figure 1J) without affecting AXL levels (Supplementary Figure S1C, D). Of note, depletion of AXL in 1205Lu or M238R cells had no effect on LOXL2 or ZEB1 expression (Supplementary Figure S1C, D). Finally, the analysis of the skin melanoma TCGA atlas database revealed that high *LOXL2* expression is significantly associated with shorter overall survival in melanoma patients (Figure 1K). Collectively, our findings identify LOXL2 as a novel candidate marker for the dedifferentiated and aggressive cell state of human mesenchymal melanoma cells.

Hypoxic conditions induce LOXL2 expression in melanocytic melanoma cells

Emerging data indicate that microenvironmental signals including hypoxia induce phenotypic transition toward a MITF^{low} invasive melanoma cell state. In addition, LOX family members are regulated by low oxygen conditions^{16,32,33}. Therefore, we next asked whether LOXL2 is upregulated upon exposure of melanocytic melanoma cells to a hypoxic challenge. We first treated melanoma cells with cobalt chloride (CoCl₂), a hypoxia mimetic that inhibits prolyl hydroxylases and consequently stabilizes hypoxia inducible factor 1 (HIF1 α) expression. As expected, treatment of M238P and SKMel28P melanoma cells with CoCl₂, led to increased expression of HIF1 α that is accompanied by an increase in LOXL2 protein expression (Figure 2A). Hypoxia-induced LOXL2 expression was further confirmed by exposing melanocytic cell lines to a hypoxic environment (1% of oxygen). The increase in LOXL2 appeared after 24 hours of hypoxia and lasted for at least 72 hours (Figure 2B). As we previously reported¹⁶, hypoxia induces melanoma cell dedifferentiation towards a less differentiated phenotype, as evidenced by the decreased expression of melanocytic markers such as MITF and SOX10 and increased expression of mesenchymal markers such as FN1 and AXL, and the neural crest stem cell-like marker NGFR (Figure 2C, D). Taken together, these results indicate that the acquisition of a dedifferentiated phenotype observed upon hypoxia is associated with increased LOXL2 expression in melanoma cells.

LOXL2 is upregulated during adaptive responses to oncogenic BRAFV600E pathway inhibition through the PI3K/AKT pathway

Adaptive and acquired resistance to TT is associated with RTK overexpression and activation of survival pathways such as the PI3K/AKT pathway. To determine whether LOXL2 levels are controlled by the

PI3K/AKT pathway in dedifferentiated human melanoma cells we used a pan-AKT inhibitor (MK2206) and a PI3K inhibitor (GDC0941). Figure 3A shows that inhibition of this pathway decreases LOXL2 protein expression in both therapy-naïve 1205Lu and BRAFi resistant M238R and SKMel28R dedifferentiated melanoma cells, suggesting that basal levels of LOXL2 are maintained by the PI3K/AKT in these cells. Similar regulation of LOXL2 levels by the PI3K/AKT pathway was observed following the early adaptation of BRAFV600E-mutated melanoma cells to the combined BRAFi and MEKi treatment. The two drugs in combination significantly increased LOXL2 expression in both melanocytic M238P and dedifferentiated 1205Lu melanoma cells (Figure 3B). Notably, upregulation of LOXL2 was reversed when the BRAFi/MEKi treatment was combined with the PI3K inhibitor GDC0941 (Figure 3B) or the pan-AKT inhibitor MK2206 (Figure 3C), or in AKT-depleted 1205Lu cells (Figure 3D). These results indicate that activation of the PI3K/AKT pathway induced by oncogenic BRAF inhibition drives LOXL2 expression in melanoma cells.

We have recently shown that the anti-fibrotic drug Nintedanib/BIBF1120 enhances the efficacy of MAPK-targeted therapy in preclinical models of melanoma²¹. BIBF1120 is a tyrosine kinase inhibitor that targets PDGFR β , FGFR and VEGFR. We examined the impact of BIBF1120 on LOXL2 expression in the context of early adaptation to BRAFi/MEKi in BRAF-mutant melanoma cells. Immunoblot analysis shows that BIBF1120 abolished AKT activation and strongly reduced LOXL2 upregulation induced by the BRAFi/MEKi cocktail. Together these findings suggest that activation of the RTK/PI3K/AKT pathway induced by oncogenic BRAF inhibition promotes LOXL2 expression in melanoma cells.

LOXL2 regulates actin cytoskeleton dynamics and confers contractile and ECM remodeling properties to dedifferentiated melanoma cells

Dedifferentiated melanoma cells display several mesenchymal properties and are characterized by a flattened spindle-shaped morphology with an increase number of stress fibers and focal adhesions^{20-22,34}. Since LOXL2 has previously been shown to promote cytoskeletal reorganization through EZRIN phosphorylation³⁵, we analyzed the contribution of LOXL2 to cytoskeleton dynamics. Using two different non-overlapping LOXL2-targeting siRNA (siLOXL2#1 and siLOXL2#2), we showed that LOXL2 knockdown, which strongly reduced LOXL2 expression (Supplementary Figure S2A), decreased cell area and increased cell circularity in dedifferentiated 1205Lu cells as shown by F-actin staining (Figure 4A). These changes were associated with a decreased number of focal adhesions as revealed by phospho-Paxillin staining (Figure 4B). Lentivirus-mediated stable knockdown of LOXL2 using two different shRNA (shLOXL2#1 and shLOXL2#2) reproduced the decreased in cell area and number of focal adhesions observed upon transient transfection (Figure 4C, D). The efficiency of stable LOXL2 knockdown was assessed by immunoblotting protein lysates from infected shCt and shLOXL2 1205Lu

cells (Supplementary Figure S2B). Of note, stable LOXL2 knockdown had no significant effect on 1205Lu cell proliferation (Supplementary Figure S2C).

Our previous work showed that early adaptation to BRAFV600E-targeted therapy or acquisition of a dedifferentiated mesenchymal TT-resistant phenotype are associated with the increased expression of typical CAF markers and myofibroblast-associated features such as ROCK-dependent actomyosin contractility and force-mediated ECM remodeling²². To assess the role of LOXL2 in dedifferentiated melanoma cell contractility we performed collagen gel contraction assay. siRNA-mediated depletion of LOXL2 reduced their ability to contract collagen gel in response to BRAFi (Figure 5A,B). Since increased cellular forces participate to ECM fiber organization, we next investigated the role of LOXL2 in the capacity of dedifferentiated melanoma cells to produce and remodel ECM upon oncogenic BRAF inhibition. Cell-derived 3D ECM were generated, denuded of cells, and the fibronectin network was analyzed by immunofluorescence staining. Exposure of 1205Lu melanoma cells to BRAFi resulted in increased production and organization of fibronectin fibers that was impaired by siRNA-mediated depletion of LOXL2 (Figure 5C). Some intracellular biological effects of LOXL2 are thought to be independent of its enzyme activity³⁶. To assess whether LOXL2-mediated ECM deposition and assembly by melanoma cells depends on its lysyl oxidase activity, we used the dual LOXL2/LOXL3 enzymatic inhibitor PXS-5153A³⁷. Inhibition of LOXL2 activity reduced the ability of 1205Lu cells to deposit a fibronectin network in response to BRAFV600E inhibition (Figure 5C), indicating that the enzymatic activity of LOXL2 is required to mediate its effect on ECM deposition and remodeling by mesenchymal dedifferentiated melanoma cells.

LOXL2 contributes to melanoma tumor cell migration, invasion and metastasis

We next investigated the role of LOXL2 in migration and invasive behavior of dedifferentiated mesenchymal melanoma cells. Using siRNA mediated LOXL2 knockdown, we analyzed 1205Lu, M238R and SKMel28R cell motility by time-lapse video microscopy. Individual cell tracking showed that LOXL2-depleted cells had shorter displacements and displayed decreased cell random motility compared to control cells (Figure 6A). Similar observations were obtained following stable knockdown of LOXL2 in 1205Lu melanoma cells (Figure 6B). Migration of melanoma cells was further examined using Boyden chamber assays. We found that transient or stable LOXL2 depletion strongly reduced the chemotactic migration of melanoma cells towards serum compared to control cells (Figure 6C, D). In contrast to loss of LOXL2 expression, addition of the LOXL2/LOXL3 inhibitor PXS-5153A had no significant effect on cell migration (Figure 6E). This observation suggests that the enzymatic activity of LOXL2 is not required for LOXL2-mediated melanoma cell migration.

Given our observations, we then evaluated the role of LOXL2 in melanoma cell invasion *in vitro*. Using matrigel invasion assays, we showed that siRNA-mediated depletion of LOXL2 decreased the invasive properties of dedifferentiated melanoma cell lines 1205Lu, M238R and SKMel28R (Figure 7A). Stable LOXL2 knockdown also decreased the number of invasive cells in the modified Boyden chamber assay (Figure 7B). In addition, depletion of LOXL2 significantly decreased melanoma cell invasiveness when grown as spheroids in a 3D collagen matrix (Figure 7C). Collectively, these results indicate that LOXL2 is required for invasiveness of dedifferentiated MITF^{low} melanoma cells. Importantly, our observations also highlight the role of LOXL2 in the migration and invasive features acquired by therapy-resistant mesenchymal melanoma cells.

To confirm these observations *in vivo*, we used an experimental lung metastasis assay using bioluminescent melanoma cells. The plasmid we used to generate stable LOXL2-depleted 1205Lu melanoma cell line contains a luciferase reporter, which enables monitoring of tumor cell extravasation and lung colonization *in vivo* by bioluminescence imaging (BLI). Control or shLOXL2 1205Lu melanoma cells were injected into the tail vein of nude mice. BLI recorded 15 min post injection confirmed that control and LOXL2-depleted cells reached the lungs with the same efficacy. BLI measurements were then performed every 7 days for 56 days until the end of the experiment. Mice injected with shRNA control 1205Lu cells started to show detectable luciferase activity in the lungs 4 weeks post injection that kept increasing up to the end of the experiment at 8 weeks whereas mice injected with shLOXL2 cells showed a drastic suppression in lung colonization as indicated by the lack of bioluminescent emission in the lung region up to 8 weeks after injection (Figure 7D). Consistently, *ex vivo* BLI measurement at the endpoint of the assay revealed no detectable metastatic foci in the lung of mice injected with LOXL2 knockdowned cells (Figure 7E). Altogether, these data provide evidence that LOXL2 has an important role in promoting melanoma cell invasion and metastasis.

LOXL2/PAI-2 axis promotes dedifferentiated melanoma cell migration and contractility

We next wished to identify the signaling pathways involved in LOXL2-mediated melanoma cell mesenchymal behavior. Using quantitative proteomics, several proteins with either increased or decreased expression were identified in LOXL2 stable knockdown cells compared to control cells. Among these proteins, we identified the plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2)/SERPINB2 being the most downregulated protein upon LOXL2 knockdown (Figure 8A). PAI-2 is a the serine proteinase inhibitor of the serpin superfamily implicated in cell migration and ECM remodeling^{38,39}. Consistently, pathways enrichment analysis revealed that ECM organization was one of the pathways most affected

by LOXL2 depletion in melanoma (Figure 8B). In contrast, LOXL2 knockdown increased several pathways related to interferon signaling and antigen processing (Figure 8B). Western Blot analysis confirmed that PAI-2 was downregulated upon LOXL2 stable or transient depletion in 1205lu and M238R cells (Figure 8C, D). Importantly, LOXL2 knockdown resulted in PAI-2 downregulation not only at the protein, but also at the mRNA level (Figure 8E). Next, to investigate the role of PAI-2 in LOXL2-mediated cellular effects, we performed loss-of-function experiments using PAI-2 siRNA in dedifferentiated melanoma cells. Migratory ability of transiently transfected dedifferentiated cells was tested using Boyden chamber assay. PAI-2 knockdown inhibited the chemotactic migration of both therapy-naïve (1205Lu) and drug-resistant (SKMel28R and M238R) melanoma cell lines towards serum compared to control cells (Figure 8F). Experiments on 1205Lu cells depleted for PAI-2 by siRNA showed that overexpression of LOXL2 with adenoviral particles was ineffective to restore migration of PAI-2 silenced cells (Figure 8G). Finally, knockdown of PAI-2 impaired BRAFi-induced cell contractility of 1205Lu cells (Figure 8H), another hallmark of dedifferentiated mesenchymal melanoma cells.

Discussion

Melanoma cell classification has evolved throughout recent years in different cell subtypes according to their differentiation status. Upon tumor microenvironment stresses and signals, melanoma cells can switch back and forth between different phenotypic states characterized by the expression of specific markers and their abilities to proliferate, survive, metastasize and resist to treatments. The acquisition of a dedifferentiated phenotype has been described as a non-genetic process of escape from targeted therapies. We recently showed that melanoma dedifferentiated cells can adapt to targeted therapies through a feed-forward mechanosignaling loop leading to the production and the remodeling of a drug-protective ECM. Using a comparative mass spectrometry approach to characterize 3D matrices produced by BRAFi-sensitive versus resistant melanoma cells, we revealed that drug-resistant melanoma cells assembled a matrix enriched in ECM glycoproteins, collagens, proteoglycans and collagen-modifying enzymes such as LOXL2²². Beyond affecting the extracellular environment, recent studies have reported a critical intracellular role for LOXL2, such as oxidation and deacetylation activities to regulate gene expression and tumor progression^{40,41}. In our study, we described a tumor cell-autonomous mechanism in which LOXL2 acts as a marker of dedifferentiated cells that promotes tumor cell invasion and metastasis.

In silico analysis of public databases showed that LOXL2 is specifically expressed in undifferentiated and neural-crest cell like populations characterized by MITF^{low} and AXL^{high} expression, invasive and drug-resistant properties. We confirmed the expression of LOXL2 in dedifferentiated melanoma cell lines and short-term derived cultures, as well as in melanoma cells that have acquired mesenchymal non-genetic resistance to TT²². We have also shown in another study that LOXL2 is found up-regulated in melanoma PDXs that have acquired TT-resistance associated with a mesenchymal myofibroblast-like phenotype²¹. Interestingly, MITF depletion leads to LOXL2 upregulation in melanocytic MITF^{high} melanoma cells suggesting that MITF negatively regulates LOXL2 expression in differentiated melanoma cells. This notion is further supported by the observation that LOXL2 levels increased under hypoxic conditions together with the acquisition of a dedifferentiated mesenchymal phenotype and the decrease of melanocytic markers MITF and SOX10. Hypoxia is known to induce a phenotypic switch toward an aggressive and dedifferentiated state and we have shown that a hypoxic microenvironment is able to decrease MITF expression in melanoma through an HIF1 α -dependent transcriptional mechanism¹⁶. However, the exact mechanisms, by which MITF controls LOXL2 levels in melanoma cells remains unknown. On the opposite, LOXL2 expression was downregulated in dedifferentiated melanoma cells upon ZEB1 depletion. ZEB1 is an important driver of melanoma cell plasticity, involved in the acquisition of a dedifferentiated phenotype, drug adaptation and phenotypic resistance to

MAPKi⁴². Recent studies revealed a transcriptional regulation of *LOXL2* by ZEB1 in colorectal cancer invasion⁴³. A direct binding of ZEB1 to the *LOXL2* promoter was identified by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays in multiple epithelial and mesenchymal cell lines^{43,44}. This supports the notion that *LOXL2* is a transcriptional target of ZEB1, potentially mediating certain effects of this EMT transcription factor in melanoma cells.

Melanomas escape oncogenic BRAF targeting via RTK-mediated activation of alternative survival pathways including the PI3K/AKT pathway and up-regulation of the miR-143/-145 cluster^{19–22,45}. Early adaptation to TT leads to *LOXL2* upregulation in melanoma cells, an event that could be reversed with PI3K/AKT and RTK inhibitors. In a previous work, we demonstrated that the miR-143/-145 cluster mediates the phenotypic transition toward a drug-resistant dedifferentiated mesenchymal-like state by targeting Fascin actin-bundling protein 1 (FSCN1)²¹. Transient and stable overexpression of the two miRNAs showed increased expression of *LOXL2* whereas miRNAs inhibition decreased *LOXL2* levels and even prevented *LOXL2* induction upon BRAF/MEK inhibition. Accordingly, BRAFi-resistant M238R cells overexpressing FSCN1 decreased *LOXL2* expression²¹. Together, our past and present observations suggest that *LOXL2* represents a novel identity marker of the aggressive and dedifferentiated melanoma cell subtype.

Phenotypic switching toward a dedifferentiated mesenchymal state confers to melanoma cells higher invasive abilities and resistance to treatment. In addition, oncogenic BRAF inhibition induces myofibroblast-like contractile properties, deposition and remodeling of an ECM network that promotes resistance to TT²². Here we show that *LOXL2* is critical to some, but not all functional properties of the dedifferentiated melanoma cell population. *LOXL2* participates to actin cytoskeleton reorganization, cell motility, migration, invasion *in vitro* and metastasis *in vivo*. *LOXL2* also regulates the ability of dedifferentiated melanoma cells to deposit and remodel ECM upon treatment to BRAFi. Other studies attributed to *LOXL2* a similar cell autonomous role in cancer cell invasion^{46–48}. For example, *LOXL2* downregulation in colorectal cancer cells impaired the invasive and migratory ability of these cells⁴⁶. Also, *LOXL2*-induced EZRIN phosphorylation has been shown to participate to cytoskeletal reorganization, tumor cell invasion and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC)³⁵. Stable knockdown of *LOXL2* strongly reduced lung colonization in a breast cancer mouse model⁴¹. Hypoxic conditions have been implicated in collagen deposition and alignment through lysyl oxidases including *LOXL2*^{49,50} and LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for enhanced metastasis⁵¹. It would be therefore interesting to assess whether hypoxia can promote melanoma cell invasiveness via *LOXL2* induction. Importantly, pharmacological inhibition of *LOXL2* had no effect on melanoma cell migration, suggesting that *LOXL2*-mediated melanoma cell migration does not depend

on its enzyme activity. However, depletion of LOXL2 or its inhibition by the dual LOXL2/LOXL3 inhibitor PXS-5153A impairs the assembly of fibronectin matrix by TT-treated dedifferentiated melanoma cells, highlighting the complex role of LOXL2 in melanoma biology either as a lysyl oxidase or as a scaffold protein. Studies in ESCC and rhabdomyosarcoma have also shown that LOXL2 promoted migration or EMT independently of its catalytic activity^{36,52}. Additional experiments such as invasion assays with LOXL2 catalytic inactive mutants are nevertheless required to better understand how LOXL2 functions in melanoma. In contrast, LOXL2 seems dispensable to acquired resistance to TT (not shown) and to the early anti-proliferative response of dedifferentiated melanoma cells to the BRAFi/MEKi cocktail (Supplementary Figure S2D). However, the role of LOXL2 in melanoma drug response remains to be fully investigated. We recently found that melanoma cells cultured on CAF-derived matrices adapt to BRAFV600 pathway inhibition by turning on a drug resistant pathway that is initiated by the collagen receptors DDR1 and DDR2, in a process called matrix-mediated drug resistance (MMDR)⁴⁵. In line with these findings, it would be important to examine the non-cell autonomous function of LOXL2 in CAF and more precisely on their ability to deposit ECM and mediate MMDR *in vitro* and *in vivo*.

Proteomics analysis revealed that several proteins implicated in ECM remodeling are downregulated upon LOXL2 stable knockdown. We confirmed PAI-2/SERPINB2 as a LOXL2 target that impairs melanoma cell migration and contractility. PAI-2/SERPINB2 is a the serine proteinase inhibitor of the serpin superfamily implicated in cell survival, cell differentiation, inflammation, immunity, cell adhesion, migration, and ECM remodeling in diseases including cancer^{38,39}. PAI-2 is associated with tumorigenesis, invasion and metastasis and has a protumorigenic or antitumorigenic role depending on the cancer type⁵³. In breast cancer, miR-200c/141 cluster overexpression upregulated PAI-2 in triple negative breast cancer cell lines and siRNA-mediated PAI-2 knockdown decreased lung metastasis⁵⁴. Brain metastatic cells from lung and breast cancers expressed high levels of PAI-2 protein in order to prevent plasmin generation and its metastatic suppressive effect³⁹. Since LOXL2 promotes melanoma metastasis, we need to check if PAI-2 phenocopies these effects and assess whether PAI-2 could be used as a new therapeutic target in melanoma management.

Finally, recent studies have underlined mechanisms that may link ECM remodeling and immune checkpoint blockade (ICB) therapies in several cancers including melanoma⁵⁵. Several ECM genes were enriched in anti-PD1 nonresponding patients including LOXL2⁵⁶ and reversion of tumor stiffening by the LOX inhibitor BAPN improved T cell infiltration and anti-PD-1 treatment⁵⁷. Interferon- γ signaling drives clinical response to ICB in melanoma⁵⁸. In this context, the impact of LOXL2 targeting in resistance to immunotherapy should be investigated in line with our observation that LOXL2

knockdown leads to upregulation of pathways related to interferon signaling and antigen processing in melanoma cells (Figure 8B).

In conclusion, LOXL2 is known for its non-cell autonomous conventional role in collagen cross-linking and ECM remodeling. In addition to that, our study reveals that LOXL2 has a critical tumor cell-autonomous role in functional hallmarks of the mesenchymal dedifferentiated population of melanoma cells, including ECM remodeling, invasion and metastasis, thus defining a novel targetable mechanism driving melanoma metastatic disease.

Materials and Methods

Cell culture and reagents. Human melanoma cell lines were obtained and maintained as previously described^{22,59–61}. Isogenic pairs of BRAFi-sensitive (P) and BRAFi-resistant (R) cells (M229, M238, M249) were provided by R.S. Lo²⁰ and described in Girard et al. 2020²². Short-term cultures of patient melanoma cells were kindly provided by J.C. Marine and are described elsewhere^{14,62}. Melanoma cells were cultured in DMEM medium with 7% fetal calf serum (SVF, Hyclone) and 1% and maintained at 37°C in 5% CO₂. For hypoxia, cells were transferred to an InvivoO₂ hypoxic workstation (Baker Ruskinn Global, Bridgend, UK) set at 37°C, 5% CO₂ and 1% O₂.

Culture reagents were purchased from Thermo Fisher Scientific. BRAFi (PLX4032 Vemurafenib, GSK2118436 Dabrafenib), MEKi (GSK1120212 Trametinib, GDC-0973/RG7420, Cobimetinib), GDC-0941, MK-2206, LY29002 and Nintedanib (BIBF1120) were obtained from Selleckem. An equal amount of DMSO was used as the vehicle control. Collagen I (#354249) used for coating wells and plates and 3D applications was obtained from Corning. Matrigel (#E1270) and all other reagents were obtained from Sigma-Aldrich unless otherwise stated. Adenoviruses expressing LOXL2 or carrying a vector with an empty expression cassette, used as a control, were purchased from TEBU. Adenoviruses were amplified as previously described^{59,63}. Information on antibodies used in this study is provided in Appendix Table S1.

RNAi studies. For transient RNAi transfection, cells were seeded on a culture dish and then transfected 24 h later with 50nM siRNA targeting LOXL2, MITF, ZEB1, AXL, AKT1/2/3, PAI-2, or luciferase (non-targeting control) diluted in serum-free medium containing 5µM RNAi MAX (Thermo Fisher Scientific). Cells were then incubated at 37°C and 5% CO₂ for the indicated time post transfection.

To generate stable LOXL2 knockdown cells, two shLOXL2 sequences or a non-targeting shRNA sequence (directed against the Renilla luciferase mRNA) were cloned into a pSGEP Luc-PuroR lentiviral vector. Lentiviral particles were produced as follow. HEK293FT cells were seeded and transfected with 5ng of VSV-G plasmid, 10ng of pCMV 8.91 plasmid and 10ng of shLOXL2 or shRenilla plasmid diluted in optiMEM medium containing jetPEI DNA transfection reagent (Polyplus transfection). The medium containing the viral particles produced by HEK293FT was collected, centrifuged at 3,000 rpm for 5 min, filtered and put in contact with the 1205lu cells 24 h after seeding. Stably depleted cells were then selected with 1µg/ml puromycin. Information on siRNA and shRNA used in this study is provided in Appendix Table S3.

Western blot. Cells were cold lysed in stop buffer (50mM TrisHCl, 150mM NaCl, 0.25% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 1mM EDTA) + protease and phosphatase inhibitors (Thermo Scientific). The lysates were centrifuged for 15 min at 13,300 rpm at 4°C. After colorimetric assay (DC protein assay-Biorad), 20µg of total proteins were taken up in Laemmli buffer (Thermofisher), denatured 5 min at 95°C, separated on polyacrylamide gel and then transferred to a PVDF membrane (Polyvinylidene Fluoride, Amersham Biosciences). After staining with ponceau red, the membranes were saturated for 1 h at room temperature in saturation buffer (5% BSA, 1mM EDTA, 500mM NaCl, 10mM Tris pH 7.4) and incubated with primary antibodies at 4°C overnight. The next day, the membranes were rinsed in wash buffer (10mM Tris-HCl-pH7.5, 500mM NaCl, 0.1% Tween 20), incubated for 1 h at room temperature with peroxidase-coupled secondary antibodies (HRP) and then after further washes, revealed by chemiluminescence (ECL, Amersham Biosciences).

Total RNA extraction, reverse transcription and qPCR. Total RNAs were extracted using the NucleoSpin RNA Plus kit according to the supplier's recommendations (Macherey-Nagel). The amount of extracted RNA was measured using Nanodrop (Thermo scientific). 1µg of RNA was reverse transcribed using the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Real-time amplification of amplicons corresponding to different target genes was followed on the Step One thermocycler (Applied Biosystems) by incorporation of SYBR Green® (Applied Biosystems). Melting curve analysis was used to verify the specificity of the generated amplicons. The sequence of the sense and antisense primers used for each gene is given in the table below. The relative amount of each target was determined based on the expression of housekeeping genes using the $\Delta\Delta C_t$ method. Information on primers used in this study is provided in Appendix Table S2.

Immunofluorescence. Cells were seeded on collagen-coated coverslips for 72 h. After undergoing the different transfections or treatments indicated, the cells were rinsed with 1X PBS, fixed in PFA and incubated in 1X PBS + 0.3% Triton + 5% Goat Serum for 1h. The coverslips were then incubated with the primary antibody overnight at 4°C in a humidity chamber. The next day, they were rinsed and then labeled with a secondary antibody and fluorochrome-coupled phalloidin for 1 h at room temperature in the dark. The nuclei were then labeled with Hoechst and the coverslips were mounted on slides with mounting medium (Thermo Fisher Scientific). Images were taken with a full-field fluorescence microscope (Leica DM5500B or Leica DMI6000, 40X) or a Spinning Disk Field Scanning Confocal System (Nikon CSU, 20X). Quantification of cell area, or number of focal adhesions was performed using Fiji software (ImageJ).

Time-lapse videomicroscopy. Cells were labeled with Hoechst for 15 min and their migration was followed by real-time microscopy, in a 37°C chamber with 5% CO₂ for 24 h taking 1 image every 10 min, with an inverted full field fluorescence microscope (Leica DMI6000, 5X). Cell displacement was analyzed and quantified using the TrackMate plugin, a semi-automated plugin for Fiji software (ImageJ)⁶⁴.

Boyden chamber assay. Migration and invasion were studied in Boyden chamber (6.5mm diameter, 8µm porosity, Corning). The inserts were equilibrated for 1 h at 37°C in SVF-free medium. For invasion, the inserts were previously covered with a layer of Matrigel[®] overnight at 4°C. Cells were seeded for 3 days and transfected or treated as indicated, and then dissociated, resuspended in medium without SVF and incubated for 30 min at 37°C. 100,000 cells were placed in the upper chamber and medium with 10% SVF in the lower chamber. After 24 h, the cells that passed through the filter were fixed with PFA and then labeled with Hoechst. Quantification of cells was performed using Fiji software (ImageJ) by counting the number of cells in 4 different fields photographed with a full-field fluorescence microscope (Evos, 4X).

Spheroids 3D invasion assay. Melanoma spheroids were generated using the hanging droplets technique as described⁶¹ and embedded into a type 1 collagen matrix in growth medium. Tumor cell invasion was monitored for 72 h, visualized by phase contrast microscopy and area of invasion was measured using Fiji software (ImageJ).

In vivo experimentation. All experiments requiring mice were performed in compliance with the institutional animal care and local animal ethics committees (CIEPAL-Azur agreement NCE/2018-509). For experimental lung metastasis assays, 5-week-old female nude mice (Janvier) were intravenously injected with 1205Lu Luc+ cells (1x10⁶) that were transduced with non-targeting shRNA lentivirus (shCTRL) or LOXL2 targeting shRNA lentivirus (shLOXL2) expressing a luciferase reporter gene. Images were recorded using a photon imager (Bioimager Optima, Biospace) on mice injected intraperitoneally with 50mg/kg D-luciferin (PerkinElmer). Lung metastasis was monitored and quantified using BLI⁶¹.

Mass spectrometry analysis. shLOXL2 and shCtrl cells were subjected to mass spectrometry analysis as described before^{22,45}. Samples were reconstituted in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 2% acetonitrile and analyzed using liquid chromatography (LC)–tandem mass spectrometry (MS/MS) in an LTQ-Orbitrap-Velos (Thermo Electron, Bremen, Germany) online with a nanoLC Ultimate 3000 chromatography system (Dionex). Protein identification and estimation of abundance were determined using raw LC Orbitrap MS data that were processed using the MASCOT search engine (version 2.4.1). Spectra were searched against a SwissProt Human database.

Cell contraction assay. 15,000 melanoma cells were embedded in 30µl of collagen I/Matrigel and seeded on a glass bottom 96-well plate (MatTek). Once the gel was set (1 h at 37°C), cells were maintained in DMEM 10% FBS with or without indicated drugs. Gel contraction was monitored at day 3. The gel area was measured using ImageJ software and the percentage of contraction was calculated using the formula $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter}) / \text{well diameter}$ as described²².

Generation of cell-derived ECM. 3D de-cellularized ECM were generated as previously described⁴⁵. Briefly, gelatin-coated culture dishes were seeded with cells and cultured for 8 days in complete medium, supplemented with 50 µg/ml ascorbic acid every 48 h. Cell cultures were then washed with PBS and matrices were denuded following a 2 min treatment with pre-warmed extraction buffer (PBS 0.5% Triton X-100, 20µM NH₄OH). Matrices were then gently washed several times with PBS, fixed with PFA and stained with fibronectin or collagen antibodies to perform immunofluorescence assay.

Proliferation assay. Real-time analysis of cell growth was carried out using the IncuCyte™ ZOOM imaging system (Essen Bioscience). Cells were seeded in triplicate in complete medium (15,000 cells/well in 12-well plates) and treated with the indicated drugs. Phase contrast images were taken every 2h over a 3-day period (9 images per well at x10 magnification). Cell proliferation was quantified by analyzing the confluence of the cells over time and growth curves were generated using the GraphPad Prism 8 software. Results were normalized to time 0.

Analysis of gene expression from public databases. Publicly available gene expression data sets of human melanoma cell lines were used to analyze *LOXL2* levels according to cell phenotypes (GSE80829) or according to *MITF* expression (GSE62526). Normalized data were analyzed using GraphPad Prism software. Spearman's correlation between *LOXL2* levels and either *MITF*, *ZEB1* or *AXL* was assessed across the Mannheim melanoma cohort (GSE4843). Survival data from the skin melanoma TCGA database were retrieved using ProteinAtlas (<https://www.proteinatlas.org/>).

Statistical Analysis. Statistical analyses were performed with Prism software (GraphPad). Results represent the mean ± standard deviation of triplicates. Depending on the experiment, statistical tests such as ANOVA (with Bonferroni correction), Mann-Whitney or Kruskal-Wallis were performed. Data represent biological replicates (n) and are depicted as mean values ± SEM as indicated in the figure legends.

References

1. Schadendorf, D., van Akkooi, A.C.J., Berking, C., Griewank, K.G., Gutzmer, R., Hauschild, A., Stang, A., Roesch, A., and Ugurel, S. (2018). Melanoma. *Lancet* 392, 971–984. 10.1016/S0140-6736(18)31559-9.
2. Cancer Genome Atlas Network (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161, 1681–1696. 10.1016/j.cell.2015.05.044.
3. Flaherty, K.T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L.V., Hassel, J.C., Rutkowski, P., Mohr, P., et al. (2012). Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. *New England Journal of Medicine* 367, 107–114. 10.1056/NEJMoa1203421.
4. Eggermont, A.M.M., Spatz, A., and Robert, C. (2014). Cutaneous melanoma. *Lancet* 383, 816–827. 10.1016/S0140-6736(13)60802-8.
5. Kemper, K., de Goeje, P.L., Peeper, D.S., and van Amerongen, R. (2014). Phenotype switching: tumor cell plasticity as a resistance mechanism and target for therapy. *Cancer Res* 74, 5937–5941. 10.1158/0008-5472.CAN-14-1174.
6. Marine, J.-C., Dawson, S.-J., and Dawson, M.A. (2020). Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat Rev Cancer* 20, 743–756. 10.1038/s41568-020-00302-4.
7. Arozarena, I., and Wellbrock, C. (2019). Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer* 19, 377–391. 10.1038/s41568-019-0154-4.
8. Robert, G., Gaggioli, C., Bailet, O., Chavey, C., Abbe, P., Aberdam, E., Sabatié, E., Cano, A., Garcia de Herreros, A., Ballotti, R., et al. (2006). SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 66, 7516–7523. 10.1158/0008-5472.CAN-05-3189.
9. Gupta, P.B., Kuperwasser, C., Brunet, J.-P., Ramaswamy, S., Kuo, W.-L., Gray, J.W., Naber, S.P., and Weinberg, R.A. (2005). The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* 37, 1047–1054. 10.1038/ng1634.
10. Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A., and Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* 166, 21–45. 10.1016/j.cell.2016.06.028.
11. Tulchinsky, E., Pringle, J.H., Caramel, J., and Ansieau, S. (2014). Plasticity of melanoma and EMT-TF reprogramming. *Oncotarget* 5, 1–2. 10.18632/oncotarget.1662.
12. Rambow, F., Rogiers, A., Marin-Bejar, O., Aibar, S., Femel, J., Dewaele, M., Karras, P., Brown, D., Chang, Y.H., Debiec-Rychter, M., et al. (2018). Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* 174, 843-855.e19. 10.1016/j.cell.2018.06.025.
13. Marin-Bejar, O., Rogiers, A., Dewaele, M., Femel, J., Karras, P., Pozniak, J., Bervoets, G., Van Raemdonck, N., Pedri, D., Swings, T., et al. (2021). Evolutionary predictability of genetic versus nongenetic resistance to anticancer drugs in melanoma. *Cancer Cell* 39, 1135-1149.e8. 10.1016/j.ccell.2021.05.015.
14. Verfaillie, A., Imrichova, H., Atak, Z.K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., Christiaens, V., Svetlichnyy, D., Luciani, F., Van den Mooter, L., et al. (2015). Decoding the regulatory landscape of

- melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun* 6, 6683. 10.1038/ncomms7683.
15. Fenouille, N., Tichet, M., Dufies, M., Pottier, A., Mogha, A., Soo, J.K., Rocchi, S., Mallavialle, A., Galibert, M.-D., Khammari, A., et al. (2012). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One* 7, e40378. 10.1371/journal.pone.0040378.
 16. Cheli, Y., Giuliano, S., Fenouille, N., Allegra, M., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Lacour, J.-P., Tartare-Deckert, S., Bertolotto, C., et al. (2012). Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene* 31, 2461–2470. 10.1038/onc.2011.425.
 17. Hölzel, M., and Tüting, T. (2016). Inflammation-Induced Plasticity in Melanoma Therapy and Metastasis. *Trends Immunol* 37, 364–374. 10.1016/j.it.2016.03.009.
 18. Rambow, F., Marine, J.-C., and Goding, C.R. (2019). Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev* 33, 1295–1318. 10.1101/gad.329771.119.
 19. Müller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., Kong, X., Possik, P.A., Cornelissen-Steijger, P.D.M., Geukes Foppen, M.H., et al. (2014). Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 5, 5712. 10.1038/ncomms6712.
 20. Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.-K., Attar, N., Sazegar, H., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973–977. 10.1038/nature09626.
 21. Diazzi, S., Baeri, A., Fassy, J., Lecacheur, M., Marin-Bejar, O., Girard, C.A., Lefevre, L., Lacoux, C., Irondelle, M., Mounier, C., et al. (2022). Blockade of the pro-fibrotic reaction mediated by the miR-143/-145 cluster enhances the responses to targeted therapy in melanoma. *EMBO Mol Med* 14, e15295. 10.15252/emmm.202115295.
 22. Girard, C., Lecacheur, M., Jouira, R.B., Berestjuk, I., Diazzi, S., Prod'Homme, V., Mallavialle, A., Larbret, F., Gesson, M., Schaub, S., et al. (2020). A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma. *Cancer Research* 80, 1927. 10.1158/0008-5472.CAN-19-2914.
 23. Mw, P., Jk, M., and Vm, W. (2014). x. *EMBO reports* 15. 10.15252/embr.201439246.
 24. Peinado, H., Del Carmen Iglesias-de la Cruz, M., Olmeda, D., Csiszar, K., Fong, K.S.K., Vega, S., Nieto, M.A., Cano, A., and Portillo, F. (2005). A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J* 24, 3446–3458. 10.1038/sj.emboj.7600781.
 25. Barker, H.E., Cox, T.R., and Emler, J.T. (2012). The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 540–552. 10.1038/nrc3319.
 26. Millanes-Romero, A., Herranz, N., Perrera, V., Iturbide, A., Loubat-Casanovas, J., Gil, J., Jenuwein, T., García de Herreros, A., and Peiró, S. (2013). Regulation of heterochromatin transcription by Snail1/LOXL2 during epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell* 52, 746–757. 10.1016/j.molcel.2013.10.015.
 27. Cano, A., Eraso, P., Mazón, M.J., and Portillo, F. (2023). LOXL2 in Cancer: A Two-Decade Perspective. *Int J Mol Sci* 24, 14405. 10.3390/ijms241814405.

28. Santamaría, P.G., Floristán, A., Fontanals-Cirera, B., Vázquez-Naharro, A., Santos, V., Morales, S., Yuste, L., Peinado, H., García-Gómez, A., Portillo, F., et al. (2018). Lysyl oxidase-like 3 is required for melanoma cell survival by maintaining genomic stability. *Cell Death Differ* 25, 935–950. 10.1038/s41418-017-0030-2.
29. Vázquez-Naharro, A., Bustos-Tauler, J., Floristán, A., Yuste, L., Oltra, S.S., Vinyals, A., Moreno-Bueno, G., Fabra, À., Portillo, F., Cano, A., et al. (2022). Loxl3 Promotes Melanoma Progression and Dissemination Influencing Cell Plasticity and Survival. *Cancers (Basel)* 14, 1200. 10.3390/cancers14051200.
30. Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K.M., Lay, J., Wong, D.J.L., Atefi, M., Shirazi, R., Wang, X., et al. (2018). Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* 33, 890-904.e5. 10.1016/j.ccell.2018.03.017.
31. Widmer, D.S., Cheng, P.F., Eichhoff, O.M., Belloni, B.C., Zipser, M.C., Schlegel, N.C., Javelaud, D., Mauviel, A., Dummer, R., and Hoek, K.S. (2012). Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res* 25, 343–353. 10.1111/j.1755-148X.2012.00986.x.
32. Schietke, R., Warnecke, C., Wacker, I., Schödel, J., Mole, D.R., Campean, V., Amann, K., Goppelt-Struebe, M., Behrens, J., Eckardt, K.-U., et al. (2010). The Lysyl Oxidases LOX and LOXL2 Are Necessary and Sufficient to Repress E-cadherin in Hypoxia. *J Biol Chem* 285, 6658–6669. 10.1074/jbc.M109.042424.
33. Miller, B.W., Morton, J.P., Pinese, M., Saturno, G., Jamieson, N.B., McGhee, E., Timpson, P., Leach, J., McGarry, L., Shanks, E., et al. (2015). Targeting the LOX/hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy. *EMBO Mol Med* 7, 1063–1076. 10.15252/emmm.201404827.
34. Misek, S., Appleton, K., Dexheimer, T., Lisabeth, E., Lo, R., Larsen, S., Gallo, K., and Neubig, R. (2020). Rho-mediated signaling promotes BRAF inhibitor resistance in de-differentiated melanoma cells. *Oncogene* 39, 1466–1483. 10.1038/s41388-019-1074-1.
35. Zhan, X.-H., Jiao, J.-W., Zhang, H.-F., Xu, X.-E., He, J.-Z., Li, R.-L., Zou, H.-Y., Wu, Z.-Y., Wang, S.-H., Wu, J.-Y., et al. (2019). LOXL2 Upregulates Phosphorylation of Ezrin to Promote Cytoskeletal Reorganization and Tumor Cell Invasion. *Cancer Res* 79, 4951–4964. 10.1158/0008-5472.CAN-19-0860.
36. Cuevas, E.P., Moreno-Bueno, G., Canesin, G., Santos, V., Portillo, F., and Cano, A. (2014). LOXL2 catalytically inactive mutants mediate epithelial-to-mesenchymal transition. *Biol Open* 3, 129–137. 10.1242/bio.20146841.
37. Schilter, H., Findlay, A.D., Perryman, L., Yow, T.T., Moses, J., Zahoor, A., Turner, C.I., Deodhar, M., Foot, J.S., Zhou, W., et al. (2019). The lysyl oxidase like 2/3 enzymatic inhibitor, PXS-5153A, reduces crosslinks and ameliorates fibrosis. *J Cell Mol Med* 23, 1759–1770. 10.1111/jcmm.14074.
38. Medcalf, R.L., and Stasinopoulos, S.J. (2005). The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *FEBS J* 272, 4858–4867. 10.1111/j.1742-4658.2005.04879.x.

39. Valiente, M., Obenauf, A.C., Jin, X., Chen, Q., Zhang, X.H.-F., Lee, D.J., Chaft, J.E., Kris, M.G., Huse, J.T., Brogi, E., et al. (2014). Serpins Promote Cancer Cell Survival and Vascular Cooption in Brain Metastasis. *Cell* 156, 1002–1016. 10.1016/j.cell.2014.01.040.
40. Cano, A., Santamaría, P.G., and Moreno-Bueno, G. (2012). LOXL2 in epithelial cell plasticity and tumor progression. *Future Oncol* 8, 1095–1108. 10.2217/fon.12.105.
41. Moreno-Bueno, G., Salvador, F., Martín, A., Floristán, A., Cuevas, E.P., Santos, V., Montes, A., Morales, S., Castilla, M.A., Rojo-Sebastián, A., et al. (2011). Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas. *EMBO Molecular Medicine* 3, 528–544. 10.1002/emmm.201100156.
42. Richard, G., Dalle, S., Monet, M.-A., Ligier, M., Boespflug, A., Pommier, R.M., de la Fouchardière, A., Perier-Muzet, M., Depaepe, L., Barnault, R., et al. (2016). ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors. *EMBO Mol Med* 8, 1143–1161. 10.15252/emmm.201505971.
43. Wang, F., Sun, G., Peng, C., Chen, J., Quan, J., Wu, C., Lian, X., Tang, W., and Xiang, D. (2021). ZEB1 promotes colorectal cancer cell invasion and disease progression by enhanced LOXL2 transcription. *Int J Clin Exp Pathol* 14, 9–23.
44. Peng, D.H., Ungewiss, C., Tong, P., Byers, L.A., Wang, J., Canales, J.R., Villalobos, P.A., Uraoka, N., Mino, B., Behrens, C., et al. (2017). ZEB1 induces LOXL2-mediated collagen stabilization and deposition in the extracellular matrix to drive lung cancer invasion and metastasis. *Oncogene* 36, 1925–1938. 10.1038/onc.2016.358.
45. Berestjuk, I., Lecacheur, M., Carminati, A., Diazi, S., Rovera, C., Prod'homme, V., Ohanna, M., Popovic, A., Mallavialle, A., Larbret, F., et al. (2022). Targeting Discoidin Domain Receptors DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated tumor cell adaptation and tolerance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *EMBO Mol Med* 14, e11814. 10.15252/emmm.201911814.
46. Hase, H., Jingushi, K., Ueda, Y., Kitae, K., Egawa, H., Ohshio, I., Kawakami, R., Kashiwagi, Y., Tsukada, Y., Kobayashi, T., et al. (2014). LOXL2 status correlates with tumor stage and regulates integrin levels to promote tumor progression in ccRCC. *Mol Cancer Res* 12, 1807–1817. 10.1158/1541-7786.MCR-14-0233.
47. Moon, H.-J., Finney, J., Xu, L., Moore, D., Welch, D.R., and Mure, M. (2013). MCF-7 cells expressing nuclear associated lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) exhibit an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) phenotype and are highly invasive in vitro. *J Biol Chem* 288, 30000–30008. 10.1074/jbc.C113.502310.
48. Hollosi, P., Yakushiji, J.K., Fong, K.S.K., Csiszar, K., and Fong, S.F.T. (2009). Lysyl oxidase-like 2 promotes migration in noninvasive breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Int J Cancer* 125, 318–327. 10.1002/ijc.24308.
49. Gilkes, D., Bajpai, S., Wong, C.C.-L., Chaturvedi, P., Hubbi, M.E., Wirtz, D., and Semenza, G.L. (2013). Procollagen Lysyl Hydroxylase 2 is Essential for Hypoxia-Induced Breast Cancer Metastasis. *Mol Cancer Res* 11, 456–466. 10.1158/1541-7786.MCR-12-0629.
50. Kim, I., Choi, S., Yoo, S., Lee, M., and Kim, I.-S. (2022). Cancer-Associated Fibroblasts in the Hypoxic Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)* 14, 3321. 10.3390/cancers14143321.

51. Cox, T.R., Bird, D., Baker, A.-M., Barker, H.E., Ho, M.W.-Y., Lang, G., and Erler, J.T. (2013). LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res* 73, 1721–1732. 10.1158/0008-5472.CAN-12-2233.
52. Almacellas-Rabaiget, O., Monaco, P., Huertas-Martinez, J., García-Monclús, S., Chicón-Bosch, M., Maqueda-Marcos, S., Fabra-Heredia, I., Herrero-Martín, D., Rello-Varona, S., de Alava, E., et al. (2020). LOXL2 promotes oncogenic progression in alveolar rhabdomyosarcoma independently of its catalytic activity. *Cancer Letters* 474, 1–14. 10.1016/j.canlet.2019.12.040.
53. Croucher, D.R., Saunders, D.N., Lobov, S., and Ranson, M. (2008). Revisiting the biological roles of PAI2 (SERPINB2) in cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 535–545. 10.1038/nrc2400.
54. Jin, T., Suk Kim, H., Ki Choi, S., Hye Hwang, E., Woo, J., Suk Ryu, H., Kim, K., Moon, A., and Kyung Moon, W. (2017). microRNA-200c/141 upregulates SerpinB2 to promote breast cancer cell metastasis and reduce patient survival. *Oncotarget* 8, 32769–32782. 10.18632/oncotarget.15680.
55. Diazzi, S., Tartare-Deckert, S., and Deckert, M. (2023). The mechanical phenotypic plasticity of melanoma cell: an emerging driver of therapy cross-resistance. *Oncogenesis* 12, 7. 10.1038/s41389-023-00452-8.
56. Hugo, W., Shi, H., Sun, L., Piva, M., Song, C., Kong, X., Moriceau, G., Hong, A., Dahlman, K.B., Johnson, D.B., et al. (2015). Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell* 162, 1271–1285. 10.1016/j.cell.2015.07.061.
57. Nicolas-Boluda, A., Vaquero, J., Vimeux, L., Guilbert, T., Barrin, S., Kantari-Mimoun, C., Ponzo, M., Renault, G., Deptula, P., Pogoda, K., et al. Tumor stiffening reversion through collagen crosslinking inhibition improves T cell migration and anti-PD-1 treatment. *eLife* 10, e58688. 10.7554/eLife.58688.
58. Grasso, C.S., Tsoi, J., Onyshchenko, M., Abril-Rodriguez, G., Ross-Macdonald, P., Wind-Rotolo, M., Champhekar, A., Medina, E., Torrejon, D.Y., Shin, D.S., et al. (2020). Conserved Interferon- γ Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer Cell* 38, 500-515.e3. 10.1016/j.ccell.2020.08.005.
59. Tichet, M., Prod'Homme, V., Fenouille, N., Ambrosetti, D., Mallavialle, A., Cerezo, M., Ohanna, M., Audebert, S., Rocchi, S., Giacchero, D., et al. (2015). Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat Commun* 6, 6993. 10.1038/ncomms7993.
60. Didier, R., Mallavialle, A., Ben Jouira, R., Domdom, M.A., Tichet, M., Auberger, P., Luciano, F., Ohanna, M., Tartare-Deckert, S., and Deckert, M. (2018). Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Mol Cancer Ther* 17, 1416–1429. 10.1158/1535-7163.MCT-17-0919.
61. Rathore, M., Girard, C., Ohanna, M., Tichet, M., Ben Jouira, R., Garcia, E., Larbret, F., Gesson, M., Audebert, S., Lacour, J.-P., et al. (2019). Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF- κ B signaling pathway. *Oncogene* 38, 5873–5889. 10.1038/s41388-019-0848-9.
62. Wouters, J., Kalender-Atak, Z., Minnoye, L., Spanier, K.I., De Waegeneer, M., Bravo González-Blas, C., Mauduit, D., Davie, K., Hulselmans, G., Najem, A., et al. (2020). Robust gene expression programs underlie recurrent cell states and phenotype switching in melanoma. *Nat Cell Biol* 22, 986–998. 10.1038/s41556-020-0547-3.

63. Gaggioli, C., Deckert, M., Robert, G., Abbe, P., Batoz, M., Ehrenguber, M.U., Ortonne, J.-P., Ballotti, R., and Tartare-Deckert, S. (2005). HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene* *24*, 1423–1433. [10.1038/sj.onc.1208318](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208318).
64. Tinevez, J.-Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G.M., Reynolds, G.D., Laplantine, E., Bednarek, S.Y., Shorte, S.L., and Eliceiri, K.W. (2017). TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* *115*, 80–90. [10.1016/j.ymeth.2016.09.016](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.09.016).

FIGURE 1

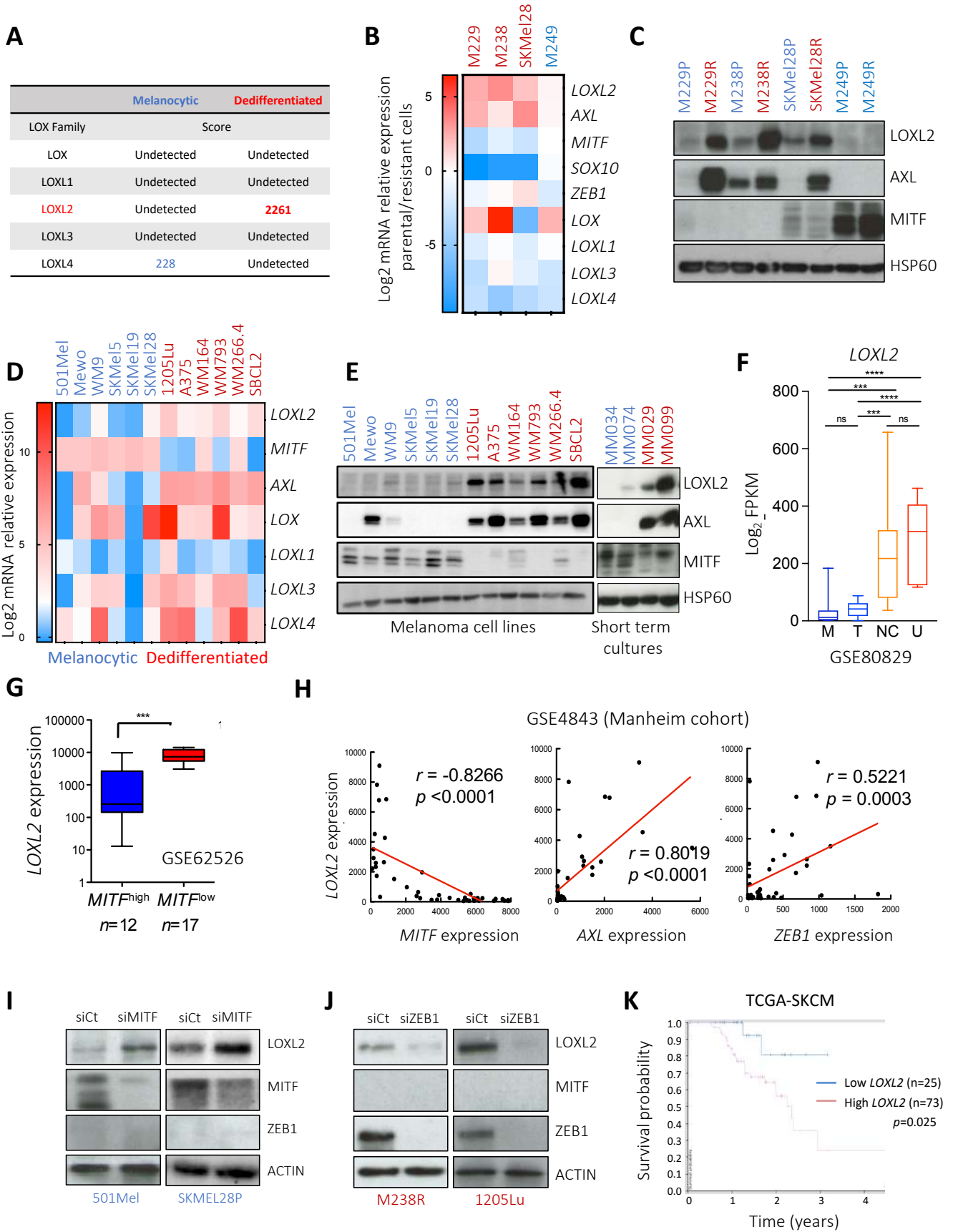


Figure 1. LOXL2 expression is associated with a dedifferentiated $MITF^{low}$ phenotype and BRAFi mesenchymal resistance. (A) Lysyl Oxidase family members identified by mass spectrometry in melanoma-derived ECM produced by M238P cell line and its BRAFi-resistant mesenchymal isogenic derivative M238R. (B) Heatmap showing mRNA expression of *LOX* family members and phenotype markers in melanoma pair of parental vs BRAFi-resistant cell lines. (C) Immunoblot analysis of lysates from the same cell lines. HSP60 as loading control. (D) Heatmap showing mRNA expression of *LOX* family members and phenotype markers in melanoma cell lines according to their phenotype (melanocytic vs dedifferentiated). (E) Immunoblot analysis of lysates from melanocytic vs dedifferentiated cell lines. (F) Box and whisker plots showing *LOXL2* gene expression in 4 different subtypes of melanoma cells (U, un/dedifferentiated, n = 10; NC, neural crest-like, n = 14; T, transitory, n = 12; and M, melanocytic, n = 17) (GSE80829). (G) *LOXL2* mRNA expression in melanoma cell lines based on high ($MITF^{high}$) or low ($MITF^{low}$) levels of *MITF* expression (GSE62526). (H) Spearman's correlation analysis of *MITF*, *AXL*, *ZEB1* and *LOXL2* expression across the Mannheim melanoma cohort (GSE4843). (I) Melanocytic cells were transfected with siCTRL or siMITF for 3 days. Total cell lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies against *LOXL2*, *MITF* and *ZEB1*. ACTIN as loading control. (J) Dedifferentiated cells were transfected with siCTRL or siZEB1 for 3 days. Expression of *LOXL2*, *MITF* and *ZEB1* was examined by immunoblotting. ACTIN, loading control. (K) Kaplan–Meier survival curves for melanoma patients with low or high *LOXL2* expression. Data were retrieved from the skin melanoma TCGA database (SKCM-TCGA) using the Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org) ($P= 0.025$, logrank test).

FIGURE 2

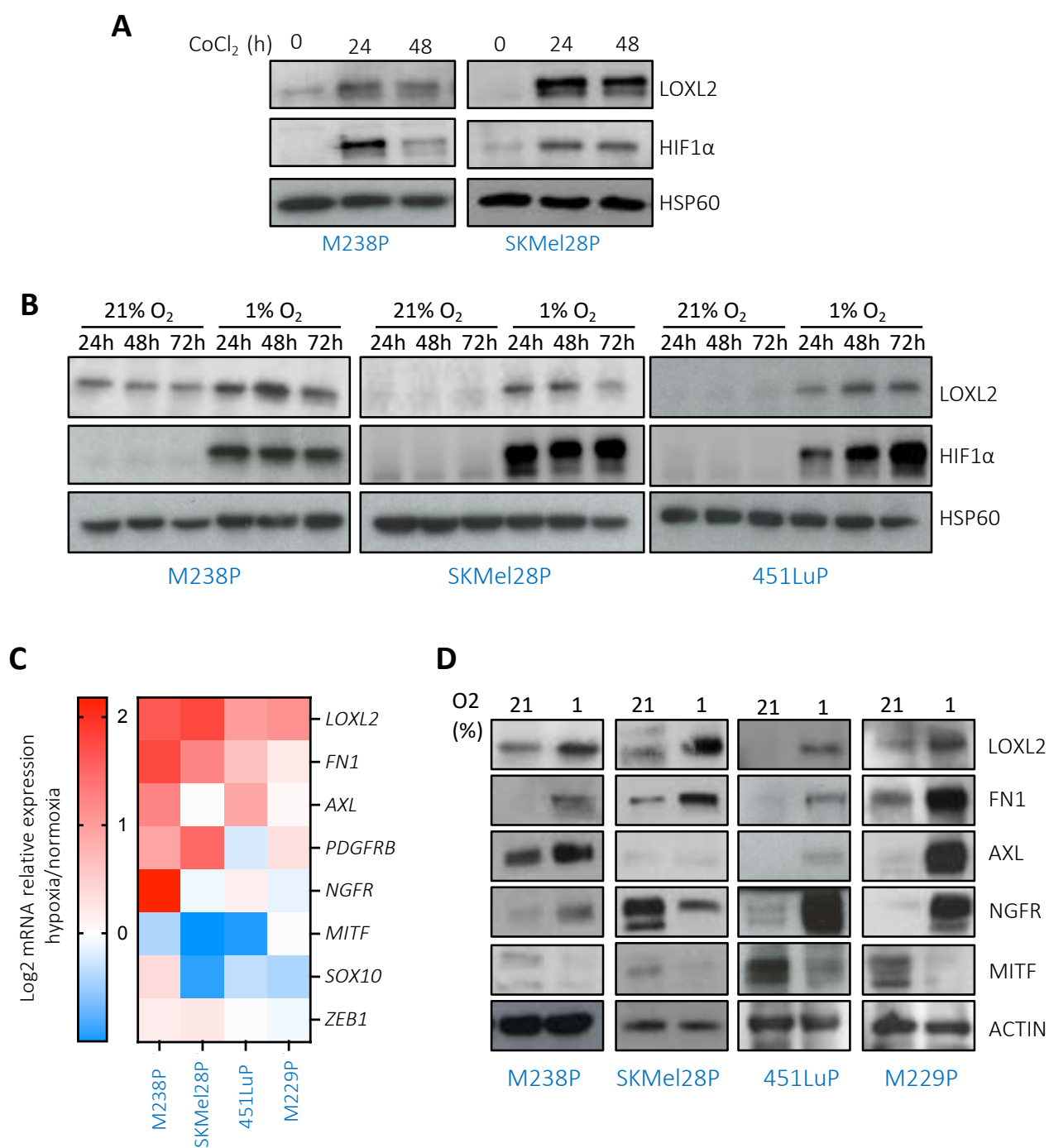


Figure 2. LOXL2 expression is upregulated under hypoxic conditions. **(A)** M238P and SKMel28P melanocytic cells were treated with 250 μ M of CoCl₂ to mimic hypoxia for 24 and 48h. Lysates were immunoblotted with LOXL2 and HIF1 α antibodies. HSP60 as loading control. **(B)** M238P, SKMel28P and 451LuP melanocytic cells were cultivated in normoxia (21% O₂) or hypoxia (1% O₂) conditions for the indicated times. Lysates were immunoblotted with LOXL2 and HIF1 α antibodies. HSP60 as loading control. **(C)** Heatmap showing *LOXL2* and phenotype markers mRNA expression in melanocytic cell lines cultivated for 72h under hypoxia (1% O₂) vs normoxia (21% O₂) conditions. **(D)** Immunoblot analysis of lysates from the same cell lines using the indicated antibodies. ACTIN as loading control.

FIGURE 3

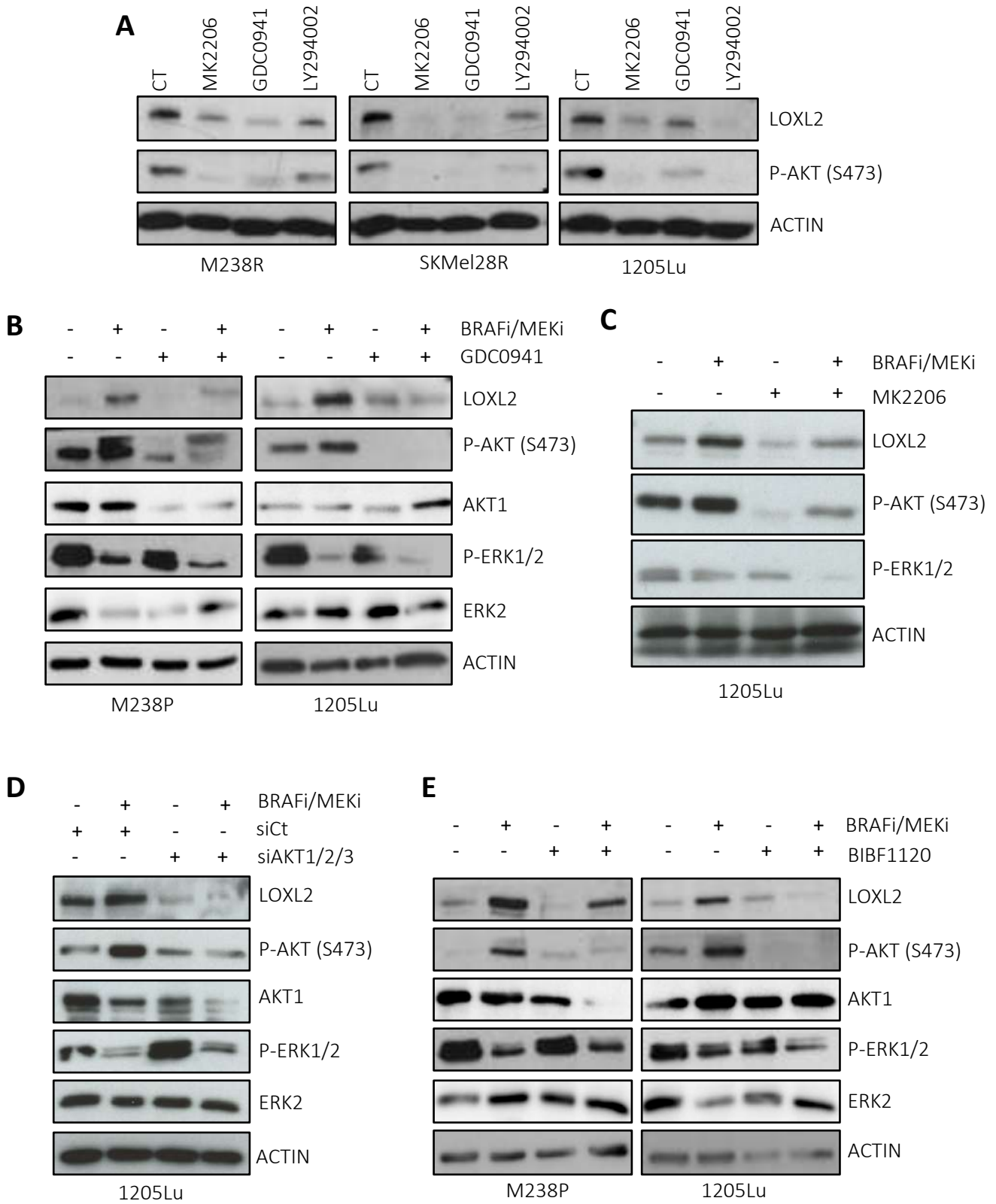


Figure 3. MAPKi induces LOXL2 expression through a RTK/PI3K/AKT-dependent pathway. (A) Effect of PI3K (GDC0941, 2 μ M; LY94002, 25 μ M) and AKT (MK2206, 10 μ M) inhibition on LOXL2 and P-AKT expression in M238R, SKMel28R and 1205Lu dedifferentiated melanoma cell lines. ACTIN as loading control. **(B)** Immunoblot analysis of lysates from cells cultivated for 72 h in the presence of BRAFi/MEKi (Vemurafenib/Cobimetinib, 1 μ M/0.1 μ M) combined or not with PI3Ki (GDC0941, 1 μ M) using antibodies against LOXL2, P-AKT, AKT, P-ERK1/2 and ERK2. ACTIN as loading control. **(C)** Immunoblot analysis of lysates from cells cultivated for 72 h in the presence of BRAFi/MEKi (Vemurafenib/Cobimetinib, 1 μ M/0.1 μ M) combined or not with AKT inhibitor (MK2206, 10 μ M) using antibodies against LOXL2, P-AKT, AKT, P-ERK1/2 and ERK2. ACTIN as loading control. **(D)** Melanoma cells transfected with 50nM of siRNA against AKT1/2/3 were treated with BRAFi/MEKi (Vemurafenib/Cobimetinib, 1 μ M/0.1 μ M) for 72h. Immunoblot analysis show the expression of LOXL2, P-AKT, AKT, P-ERK1/2 and ERK2. ACTIN as loading control. **(E)** Lysates from cells cultivated for 72 h in the presence of BRAFi/MEKi (Vemurafenib/Cobimetinib, 1 μ M/0.1 μ M) combined or not with RTK inhibitor BIBF1120 (1 μ M) were immunoblotted with using antibodies against LOXL2, P-AKT, AKT, P-ERK1/2 and ERK2. ACTIN as loading control.

FIGURE 4

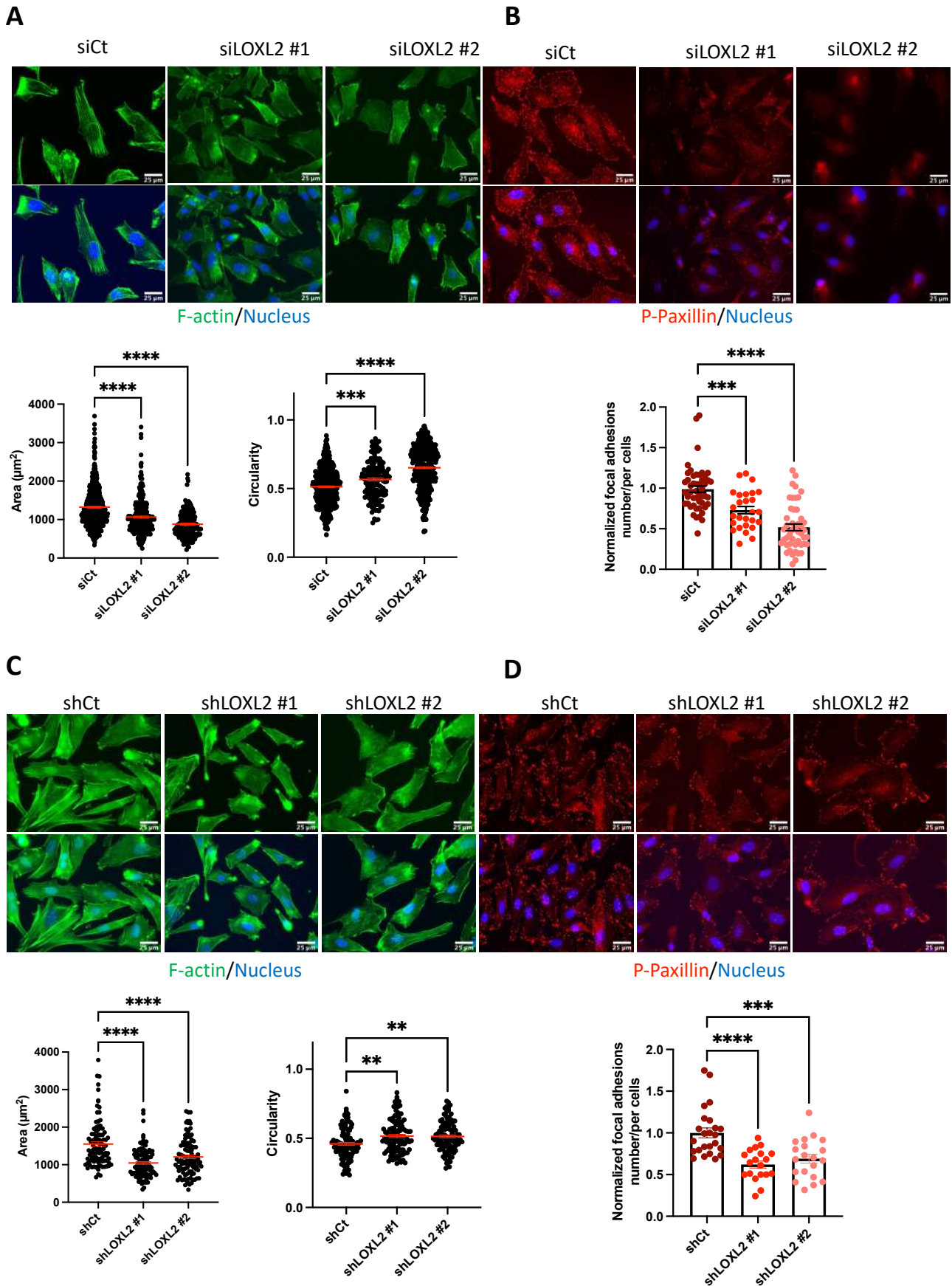


Figure 4. Knockdown of LOXL2 in dedifferentiated melanoma cells affects actin cytoskeleton remodeling and cell morphology. (A, B) 1205Lu cells were transfected with 50nM of Control (Ct) or two LOXL2 siRNA for 72h and stained for F-actin (green) and nuclei (blue) (A) or for P-Paxillin (green) and nuclei (blue) (B). Upper panels show representative images (scale bar, 25 μ m). Lower panels show the quantification of cell area, cell circularity and focal adhesions number per cell using ImageJ software. Data is represented as scatter plots with mean \pm sem (n \geq 30 cells per condition). Mann-Whitney test has been used for statistical analysis. **(C, D)** Respectively same experiments as above with stably LOXL2-depleted cells. ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01.

FIGURE 5

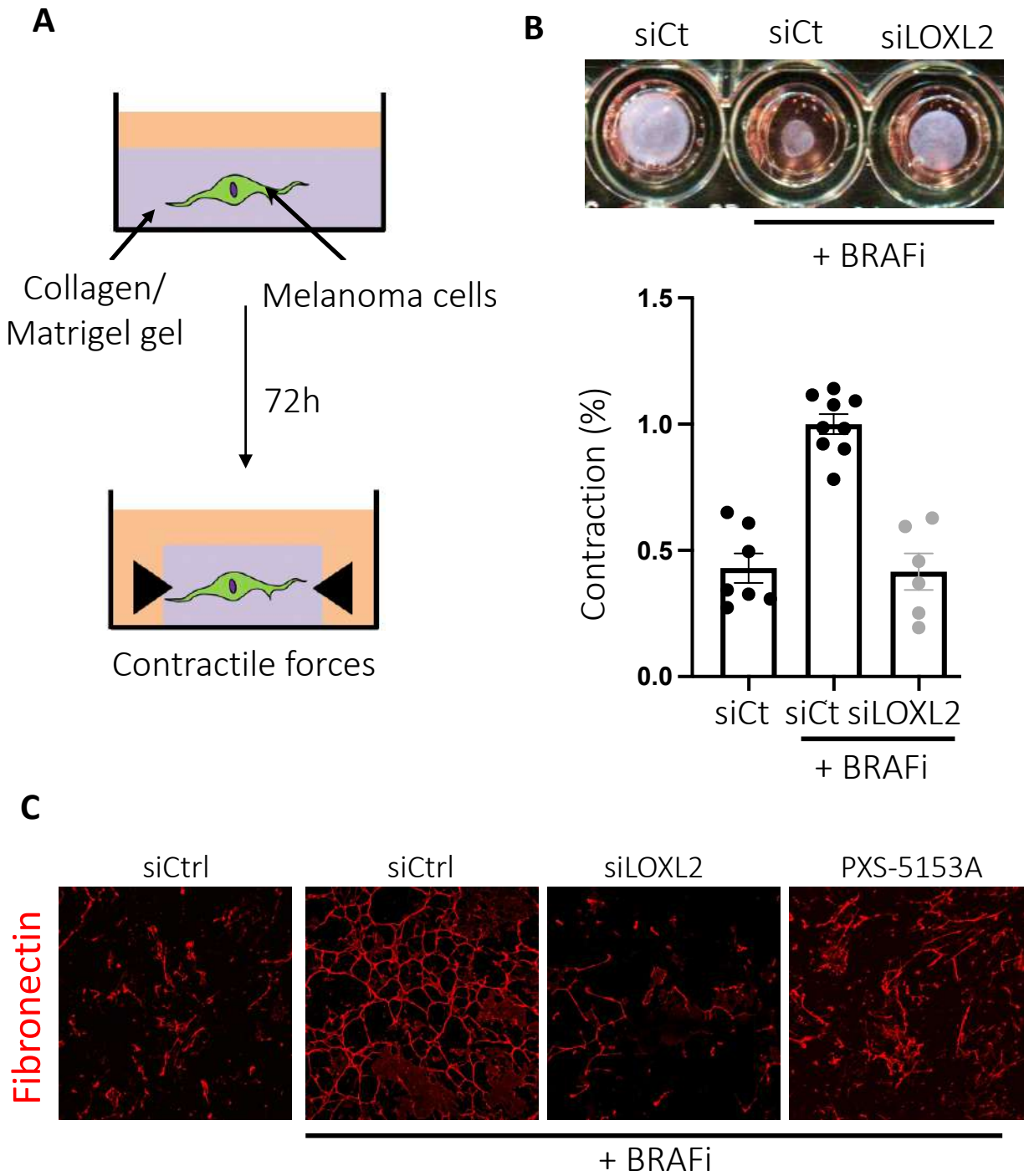


Figure 5. LOXL2 depletion impairs BRAFi-induced ECM production and remodelling by melanoma cells. **(A)** Experimental design scheme for contraction assay. **(B)** Collagen gel contraction assay performed on 1205Lu cells transfected with siControl or siLOXL2 and treated with or without Vemurafenib (BRAFi, 1 μ M). *Top*, representative images of contraction assays. *Bottom*, quantification of gel contraction (percent of MAPKi-treated siControl condition). Bar graph represents the mean \pm s.d. of triplicate experiments. **** P <0.0001, * P <0.05, Kruskal-Wallis test. **(C)** 1205Lu cells, transfected with siLOXL2 or treated with LOXL2 inhibitor PXS5153A (PXS, 5 μ M), were plated on gelatin coated plates and stimulated with 5 μ g/ml of ascorbic acid and 1 μ M of Vemurafenib (BRAFi) every 2 days for a period of 6 days. Cells were then lysed off from the matrices and the ECM was stained with antibodies against Fibronectin. Representative images are shown (scale bar 25 μ m).

Figure 6. LOXL2 regulates dedifferentiated melanoma cell migration independently of its catalytic activity. **(A)** 1205Lu, M238R and SKMel28R cells were transfected with Control (Ct) or two LOXL2 siRNA and cell migration was recorded over 24h and automatically tracked using ImageJ. For each condition, cell displacement was analyzed and quantified using the ImageJ software. **** $P < 0.0001$; *** $P = 0.002$; ** $P = 0.068$, Kruskal-Wallis analysis. **(B)** Same experiment with 1205Lu cells stably depleted for LOXL2. **** $P < 0.0001$, Kruskal-Wallis analysis. **(C)** After transfection with Control (Ct) or two different LOXL2 siRNA, the indicated dedifferentiated cells were seeded in Boyden upper chambers and cell migration was analyzed after 6h. Representative images (*bottom*) and quantification (*top*) of migrating cells are shown for the different conditions. **(D)** Same experiment with 1205Lu cells stably depleted for LOXL2. **** $P < 0.0001$; *** $P = 0.0002$, Kruskal-Wallis analysis. **(E)** 1205Lu cells were treated with LOXL2 inhibitor PXS5153A (1 and 5 μ M) for 3 days, seeded in Boyden chambers and cell migration was analysed after 6h. Bar graph shows the quantification of migrating cells. ns, non-significant (Kruskal-Wallis analysis).

FIGURE 7

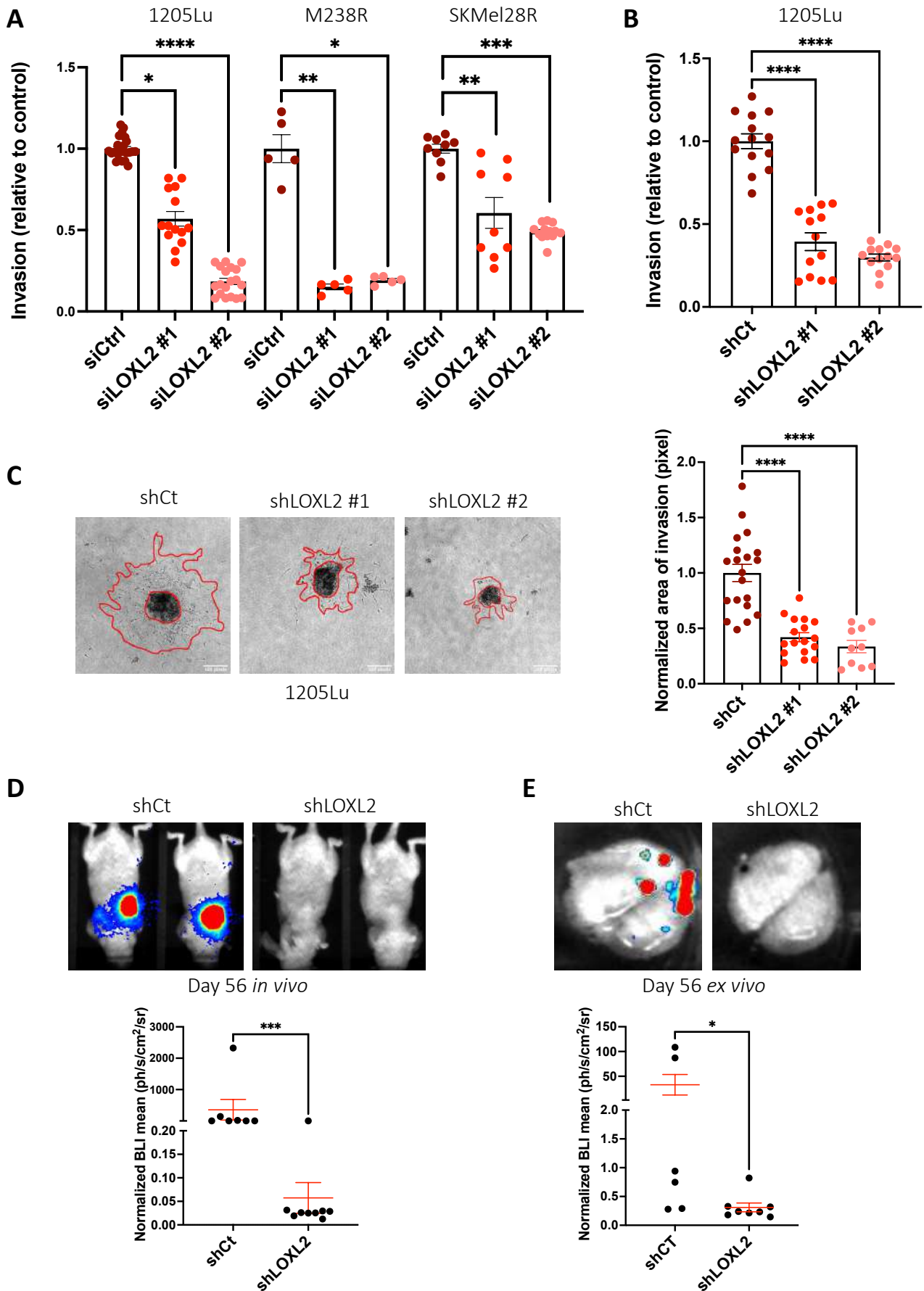


Figure 7. LOXL2 expression is required for dedifferentiated cell invasiveness *in vitro* and *in vivo*. **(A)** Cells were transfected with Control (Ct) or two LOXL2 siRNA and seeded on Boyden chambers coated with Matrigel. Cell invasion was analyzed after 24h. Bar graph represents the mean of invading cells \pm SEM of 3 independent experiments. **** $P < 0.0001$, Kruskal-Wallis analysis. **(B)** Same as above with 1205Lu cells stably depleted for LOXL2. **** $P < 0.0001$, Kruskal-Wallis analysis. **(C)** Analysis of invasion of shLOXL2 or shControl cells cultivated in spheroids and included in a 3D collagen matrix. *Left panels*, representative images of cellular invasion (red line) after 24h. *Right panels*, quantification of invasion area in pixels. **** $P < 0.0001$, Kruskal-Wallis analysis. **(D)** shCt-luc+ and shLOXL2-luc+ cells were intravenously injected in the caudal vein of nude mice and metastatic progression was followed and quantified using Biospace imager. *Upper panels*, images of bioluminescent melanoma cells in two representative mice after 56 days. *Lower panels*, quantification of photon fluxes produced by shCt-luc+ (n=7) and shLOXL2-luc+ (n=9) cells in mice at the end of the experiment. *** $P = 0.0002$, Mann-Whitney analysis. **(E)** Representative pictures of bioluminescence produced by metastatic foci in lungs extracted from mice described above (upper panels). Ex vivo quantification of the lung metastatic foci produced by shCt-luc+ (n=6) and shLOXL2-luc+ (n=8) cells at the end of the experiment. * $P = 0.0293$, Mann-Whitney analysis.

FIGURE 8

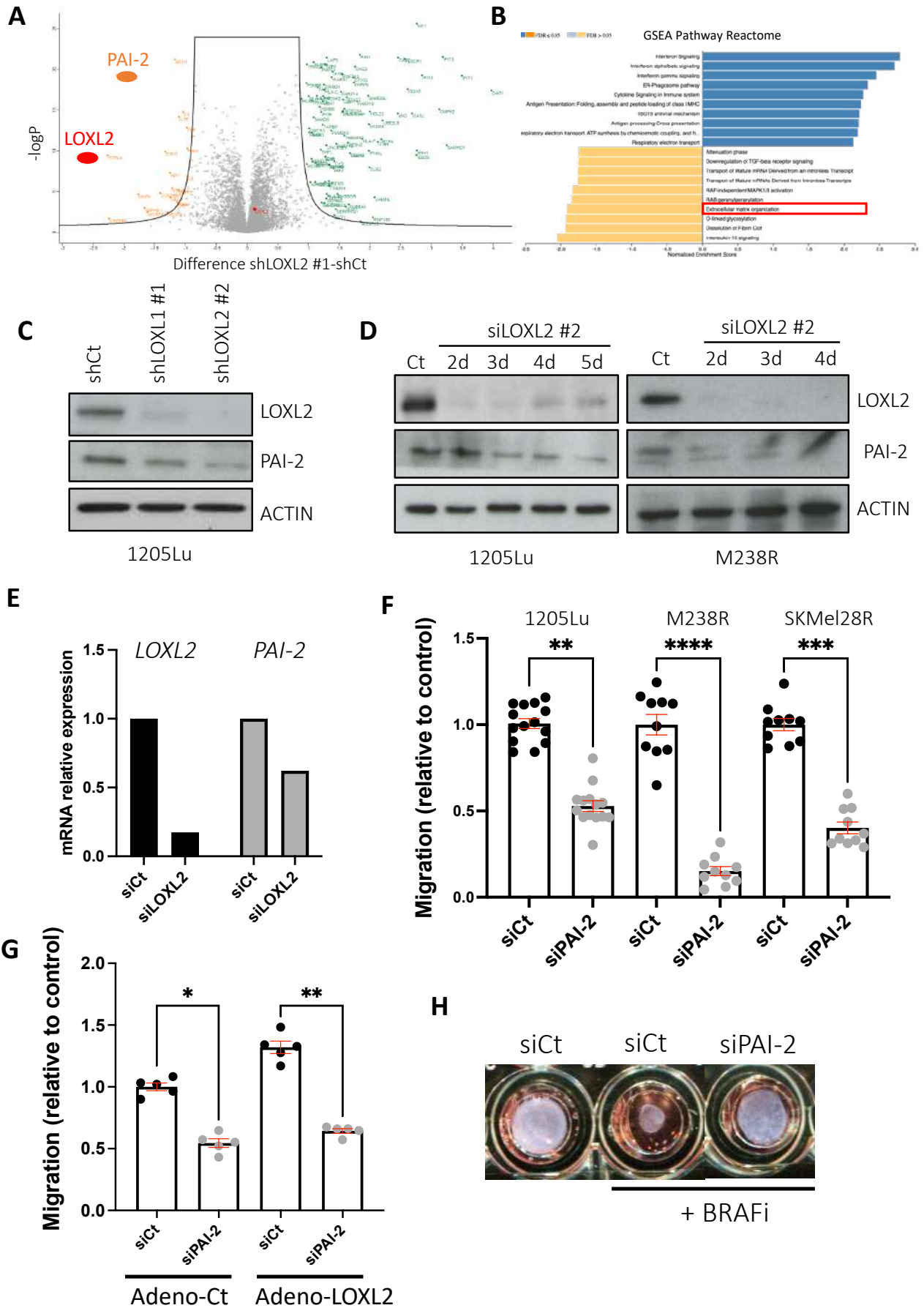
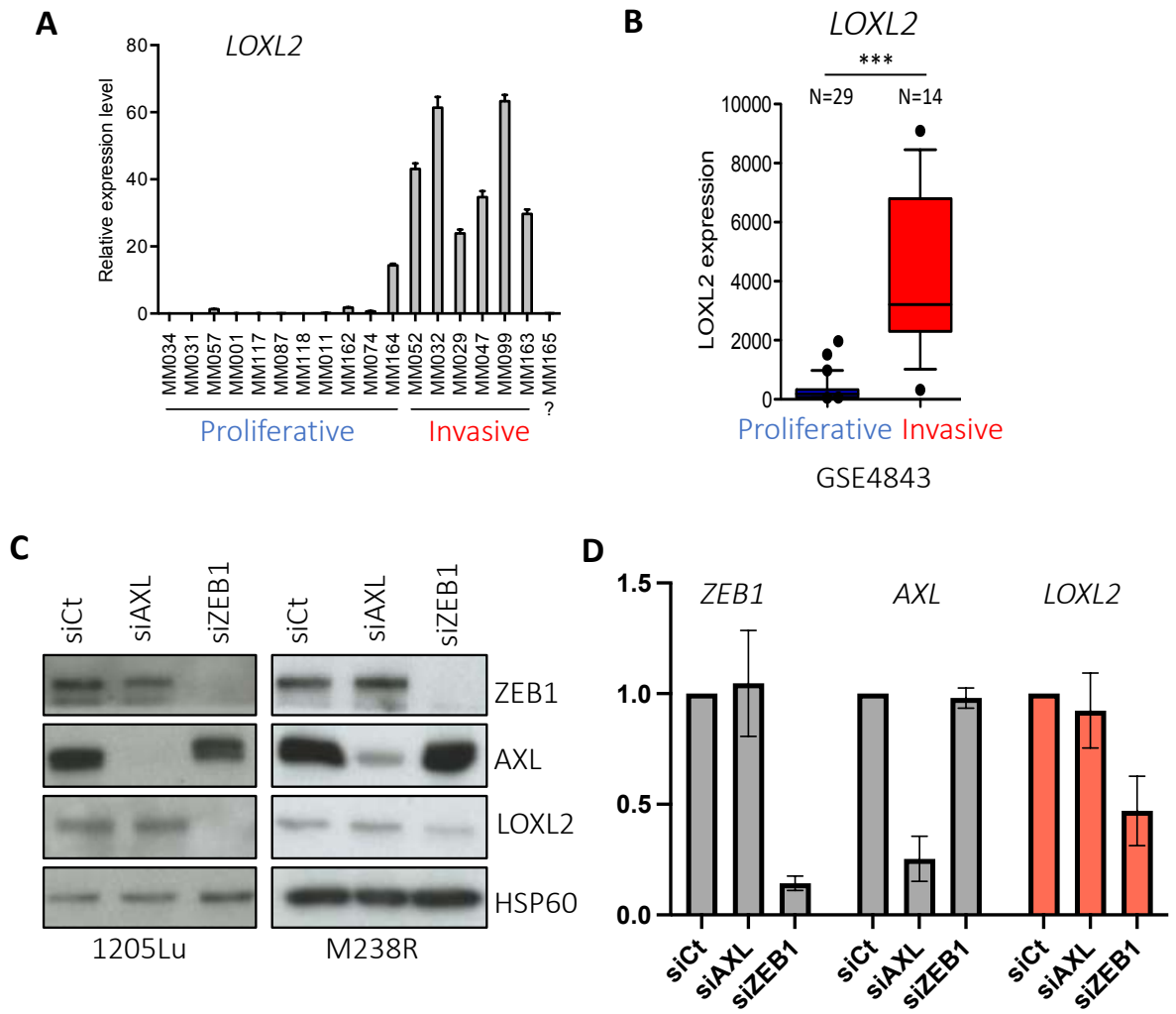


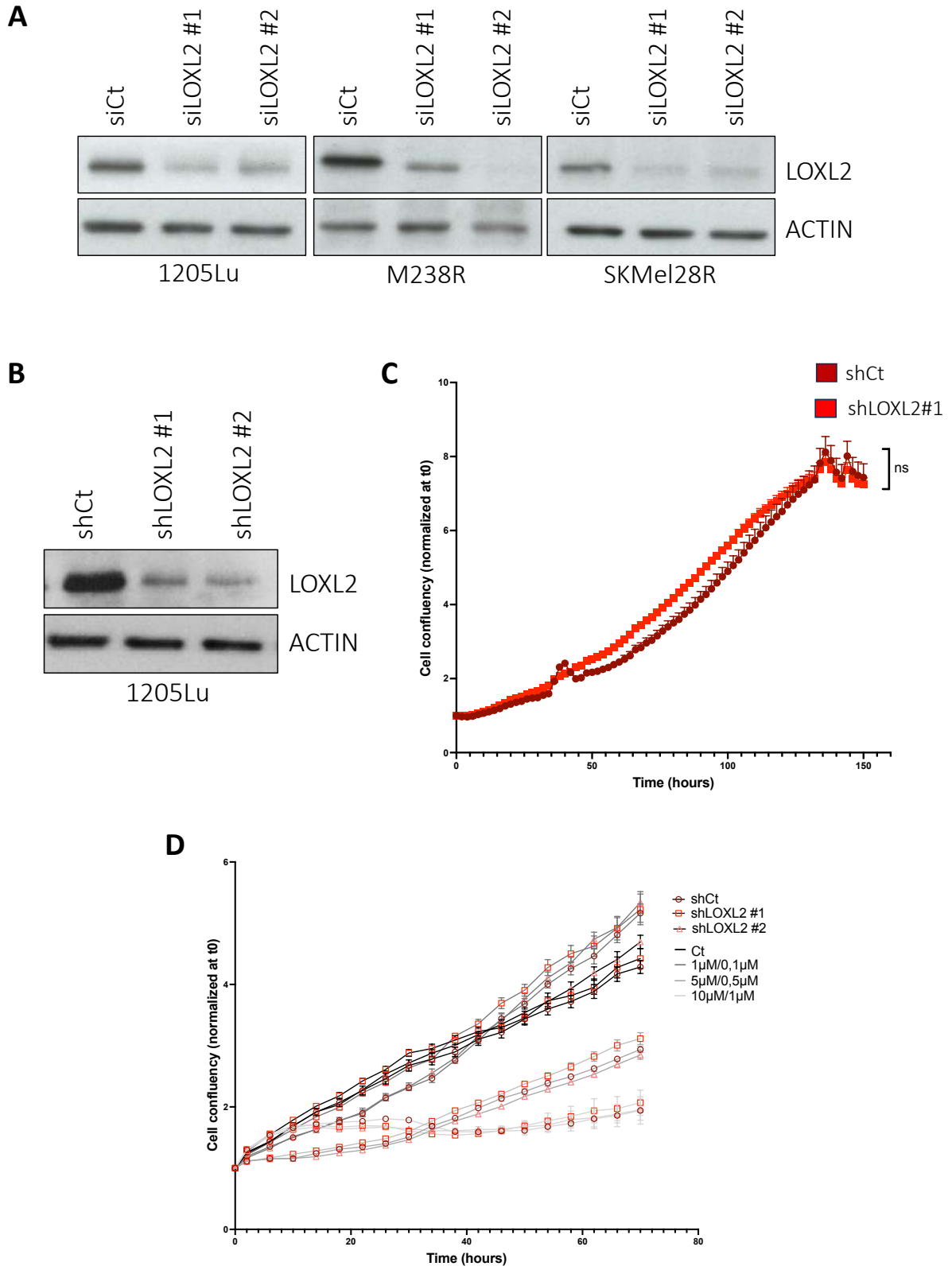
Figure 8: LOXL2/PAI-2 axis regulates melanoma cell migration and contractility. (A) Volcano plot showing proteins with differential expression in shLOXL2 and shControl 1205Lu cells. Orange dots show proteins whose expression is decreased upon LOXL2 depletion whereas green dots stand for proteins whose expression is increased upon LOXL2 knockdown. LOXL2 and PAI-2/SERPINB2 are underscored in red (left). **(B)** Gene set enrichment analysis (GSEA) analysis showing pathways that are significantly affected by LOXL2 knockdown. Extracellular matrix organization is underscored in red. **(C, D)** Immunoblot analysis showing the downregulation of PAI-2 in stable (C) and transient (D) LOXL2 knockdown cells. **(E)** qPCR analysis of *PAI-2/SERPINB2* mRNA expression on 1205Lu cells transfected with 50nM of siLOXL2 or siControl. **(F)** Dedifferentiated cells were transfected with PAI-2 siRNA for 72h and cell migration was analyzed in Boyden chambers for 6h. Bar graph represents the mean of migrating cells \pm SEM of 3 independent experiments. **** $P < 0.0001$, Kruskal-Wallis analysis. **(G)** Cells transfected with siControl or siPAI-2 were infected for 48h with LOXL2 adenoviral particles. Cell migration was then assessed with Boyden chamber assay experiments. Bar graph shows the quantification of cell migration. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Kruskal-Wallis analysis. **(H)** Collagen gel contraction assay performed on siPAI-2-transfected 1205Lu cells treated with Vemurafenib (BRAFi, 1 μ M). Representative images of the contraction assay are shown.

Supplemental FIGURE S1



Supplemental Figure S1. (A) *LOXL2* gene expression in short term melanoma cell cultures according to their phenotype (melanocytic vs dedifferentiated). **(B)** Box and whisker plots showing *LOXL2* expression according to the phenotype of melanoma cells (invasive n = 29 or proliferative n = 14; NC) (GSE4843). **(C, D)** Dedifferentiated cells were transfected with 50nM of siCTRL, siZEB1 or siAXL for 3 days. Expression of *LOXL2*, *AXL* and *ZEB1* was examined by immunoblotting (C) and by qPCR analysis (D).

Supplemental FIGURE S2



Supplemental Figure S2. (A) Immunoblot analysis of 1205Lu, M238R and SKMel28R transfected with Control (Ct) or two LOXL2 siRNA to test the efficiency of LOXL2 siRNA. ACTIN as loading control. **(B)** Same experiment to test the efficiency of LOXL2 shRNA. **(C)** Time lapse analysis of the proliferation of 1205lu-luc+ cells stably depleted for LOXL2 (shLOXL2) or not (shControl, shCT). Cell confluency was monitored using an Incucyte videomicroscope and normalized to T=0. ns, not significant. **(D)** Time lapse analysis of the proliferation of 1205lu-luc+ cells stably depleted for LOXL2 (shLOXL2 #1 and shLOXL2 #2) or not (shControl, shCT) treated or not with 1 μ M/0,1 μ M, 5 μ M/0,5 μ M or 10 μ M/1 μ M of BRAFi/MEKi. Cell confluency was monitored using an Incucyte videomicroscope and normalized to T=0.

Supplementary Table 1. List of antibodies used in the study.

Antibody	Company	Catalog number	Dilution
ACTIN	Cell Signaling	3700	WB 1:1000
p-AKT (Ser473)	Cell Signaling	9271	WB 1:1000
AKT (pan)	Cell Signaling	4691	WB 1:1000
AXL	Cell Signaling	4566	WB 1:1000
p-ERK1/2(Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	9101	WB 1:1000
ERK2	Santa Cruz	sc-1647	WB 1:500
p-FAK (Tyr397)	Cell Signaling	3283	WB 1:500
FN1	Santa Cruz	sc-8422	WB 1:1000
HIF1 α	BD biosciences	610958	WB 1:1000
HSP60	Santa Cruz	sc-57840	WB 1:1000
LOXL2	R&D Systems	AF2639	WB 1:500
MITF	Sigma	HPA003259	WB 1:1000
NGFR (p75NTR)	Cell Signaling	8238	WB 1:1000
p-Paxillin (Tyr118)	Cell Signaling	2541	WB 1:1000 IF 1:50
PDGFR β	Santa Cruz	sc-374573	WB 1:1000
p-PDGFR β (Tyr751)	R&D system	AF1767	WB 1:1000
PAI-2	Santa Cruz	Sc-166539	WB 1:500
ZEB1	Santa Cruz	sc-25388	WB 1:500

Supplementary Table 2. Human primers sequences used in this study.

Gene	Forward	Reverse
<i>LOX</i>	CGACCCTTACAACCCCTACA	AAGTAGCCAGTGCCGTATCC
<i>LOXL1</i>	AGAGCCTCTCTGTCCACCAG	GTACACCTGCCCGTTGTTCT
<i>LOXL2</i>	CCTGGGGAGAGGACATACAA	CTCGCAGGTGACATTCTTCA
<i>LOXL3</i>	CAACGCGGCCTTCTACAG	GGTGTATTGGCACGATAGA
<i>LOXL4</i>	CGACAGCCACTACTACAGGAAA	CTGGTGGATCCAGAAGGAGTT
<i>AXL</i>	GTGGGCAACCCAGGGAATATC	GTACTGTCCCGTGTGCGAAAG
<i>MITF</i>	CATTGTTATGCTGGAAATGCTAGAA	GGCTTGCTGTATGTGGTACTTGG
<i>SOX10</i>	CCTTCATGGTGTGGGCTC	CGCTTGCTCACTTTCGTTTCCAG
<i>ZEB1</i>	AGCGCTTCTCACACTCTGGGTCTT	CTGCCTCTTCTGCTCTGTGC
<i>FN1</i>	TGTTATGGAGGAAGCCGAGGTT	GCAGCGGTTTGCATGGT
<i>NGFR</i>	CCTACGGCTACTACCAGGATG	CACACGGTGTCTGCTTGT
<i>RPL32</i>	CCTTGTGAAGCCCAAGATCG	TGCCGGATGAACCTTCTGGT
<i>PAI-2</i>	AACCAGAGAACAACCAGATTGA	GACAGCATTACCAGGACCA

Supplementary Table 3. Human siRNA sequences used in this study.

siRNA	Company	Catalog number
AKT1/2	Santa Cruz Biotechnology	sc-43609
AKT3	Santa Cruz Biotechnology	sc-38911
MITF	ThermoScientific	HSS142939
ZEB1	ThermoScientific	HSS110548
AXL	ThermoScientific	HSS100897
PAI-2	ThermoScientific	HSS107572
siRNA	Forward	Reverse
Ctrl	CGUACGCGGAAUACUUCGAUU	AAUCGAAGUAUUCGCGUACG
<i>LOXL2</i> #1	GACCCUCAAGAUUCCGAAAGCGUA	UACGCUUUCGAAUCUUGAGGGUC
<i>shRNA</i>	CAACGAGAUCCAGUGCACAGGCAAU	AUUGCCUGUGCACUGGAUCUCGUUG
Gene	Forward	Reverse
<i>Renilla</i>	TAGATAAGCATTATAATTCCTATGCCTAC	GTAGGCATAGGAATTATAATGCTTATCTA
<i>LOXL2</i> #1	TTAGATTTGTACTTCCAAGGGC	GCCCTTGGAAGTACAAATCTAA
<i>LOXL2</i> #2	TGTTGCTGTTGACATCTCCGTG	CACGGAGATGTCAACAGCAACA

Résultats complémentaires :

Notre étude portant sur la régulation de LOXL2 au cours de la transition phénotypique et sur son rôle dans l'invasion et la réponse thérapeutique des cellules de mélanome cutané, nous a permis de mettre en évidence la contribution importante de LOXL2 dans le comportement dédifférencié mésenchymal. Nous avons montré que LOXL2 est spécifiquement exprimé dans une sous-population de cellules agressives, caractérisées par un phénotype dédifférencié, des propriétés invasives et métastatiques importantes, une capacité accrue de déposer une MEC organisée et une résistance innée ou acquise aux thérapies ciblées. Nous avons révélé son rôle dans les propriétés invasives et métastatiques intrinsèques à la cellule cancéreuse, et également son activité dans le remodelage de la MEC produite par les cellules de mélanome dédifférenciées. Bien que les cellules tumorales soient capables de produire de la MEC, les principales cellules qui en produisent abondamment sont les fibroblastes associés au mélanome (MAF). C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés au rôle de LOXL2 produit par les fibroblastes associés au mélanome (MAF) sur le remodelage de la MEC au sein du microenvironnement et ses conséquences sur les propriétés tumorales.

LOXL2 participe à l'acquisition de propriétés myofibroblastiques induite par le TGFβ1 dans les fibroblastes de peau

Les résultats de la figure 1A montrent que le traitement des fibroblastes normaux isolés de derme avec le TGFβ1 augmente l'activité myofibroblastique et ainsi le dépôt d'une MEC alignée et organisée (Albregues et al. 2014). Le dépôt de matrice par les fibroblastes a été évalué en les traitant toutes les 48h pendant une période de 6 jours avec 2ng/ml de TGFβ1 et 5μg/ml d'acide ascorbique. L'organisation des fibres de fibronectine est quantifiée en mesurant l'angle d'orientation relatif des fibres. Le pourcentage de fibres de fibronectine suivant un angle d'orientation préférentiel augmente en effet de 23,1% à 39,5%, et se rapproche de l'activité myofibroblastique des MAF #1. Nous avons par la suite confirmé dans la figure 1B que le TGFβ1 favorise un phénotype de type CAF-S1 dans les MAF, comme le montre l'expression accrue des marqueurs de la sous population CAF-S1 comme FAPα, la fibronectine (FN1) et αSMA qui atteint le niveau d'expression retrouvé dans les MAF #1 que nous avons analysés. Les niveaux de phosphorylation de STAT3 (pSTAT3 Tyr705), un marqueur de l'activation des CAF sont également augmentés après traitement des fibroblastes par le TGFβ1 et dans les MAF #1 (Costa et al. 2018). De plus, nous observons une augmentation de l'expression de LOXL2 dans les MAF #1 ainsi que dans les fibroblastes de peau activés en myofibroblastes par le TGFβ1 comparé aux fibroblastes normaux qui expriment peu LOXL2. Il est d'autant plus remarquable que dans une étude du laboratoire récemment publiée, nous montrons que ces populations de fibroblastes exprimant LOXL2 ont une forte capacité à générer des forces contractiles et produisent une MEC rigide avec des fibres alignées qui protège les cellules de mélanome des traitements ciblant la voie oncogénique BRAFV600 (Berestjuk et al. 2022).

Pour déterminer si LOXL2 est impliquée dans l'acquisition du phénotype CAF-S1-like et des propriétés myofibroblastiques induites par le TGFβ1, des fibroblastes normaux ont été transfectés par des siARN dirigés contre LOXL2. Nous avons évalué le dépôt de matrice par les fibroblastes en les traitant au TGFβ1 comme précédemment. Les fibres de collagène et fibronectine déposées ont été marquées, et les analyses d'immunofluorescence ont révélé que la déplétion de LOXL2 réduit fortement la capacité du TGFβ1 à induire le dépôt d'une MEC alignée et organisée par les fibroblastes. Cela a été confirmé par la quantification de l'alignement des fibres, qui montre une diminution significative de 36,0% à 20,6% du nombre de fibres de fibronectine suivant le même angle préférentiel et de 27,4% à 20,3% pour le collagène (figure 1C & D). Ces résultats suggèrent que l'expression de la protéine LOXL2 est cruciale pour que les fibroblastes traités avec le TGFβ1 acquièrent une capacité à organiser une MEC alignée. L'analyse par immunoblot (figure 1E) a également montré que la déplétion de LOXL2 entraîne une diminution de l'expression de certains marqueurs myofibroblastiques comme αSMA et FAPα, des marqueurs de remodelage de la MEC, de la fibronectine ou encore de pSTAT3 qui est important pour l'activation et le maintien d'un phénotype fibroblastique contractile.

Pour déterminer si l'activité enzymatique de LOXL2 est impliquée dans les processus que nous venons d'étudier précédemment, l'analyse du dépôt de MEC a été réalisé avec des fibroblastes traités avec 10 μ M de PXS-5153A, l'inhibiteur de LOXL2 (figure 1F) (Schilter et al. 2019). L'inhibition de l'activité enzymatique de LOXL2 entraîne alors une diminution de l'alignement des fibres de fibronectine produites par les fibroblastes de peau activés par le TGF β 1. Nous observons que l'inhibition de LOXL2 par le PXS5153A ne cible pas son expression (figure 1G), mais entraîne une diminution de l'expression induite par le TGF β de protéines matricielles comme la fibronectine ou SPARC (figure 1G).

LOXL2 contribue au maintien de l'activité myofibroblastique des MAF et impacte ainsi les propriétés migratoires des cellules de mélanome sur des matrices dérivées de MAF

Pour déterminer si la protéine LOXL2 contribue au phénotype des MAF de type CAF-S1, nous avons tout d'abord étudié leurs propriétés contractiles après déplétion de LOXL2. Pour se faire, nous avons invalidé LOXL2 par deux séquences de siARN, et ensemencé les cellules dans un gel de collagène et de Matrigel (figure 2A). Nous avons suivi au cours du temps la contraction de ce gel. Il est intéressant de noter qu'au bout de 72h, le ciblage de l'expression de LOXL2 diminue les forces contractiles générées par les MAF, puisqu'une diminution significative de la rétraction du gel est observée. Nous avons eu par la suite recours à un ciblage génétique et pharmacologique de LOXL2 et analysé le dépôt de MEC produit par des MAF invalidés pour LOXL2 par siARN (figure 2B) ou traités avec 5 μ M de PXS-5153A (figure 2C). Comme pour les fibroblastes activés, la déplétion ou l'inhibition de LOXL2 dans les MAF conduit à une altération du dépôt des fibres de fibronectine et de collagène I et ainsi à une désorganisation de la MEC, comme nous pouvons le voir sur les images d'immunofluorescence. Le dépôt désorganisé de MEC a été validé par la quantification de l'alignement des fibres qui montre en effet une diminution significative de l'alignement des fibres de fibronectine, de collagène et d'élastine. Ces résultats suggèrent que l'activité de LOXL2 est également importante pour maintenir les propriétés myofibroblastiques des MAF.

Afin d'avoir une vue plus globale de l'influence de LOXL2 sur le matrisome produit par les MAF, nous avons réalisé par spectrométrie de masse, une analyse comparative de la MEC dérivée de MAF invalidés ou non pour LOXL2 par siARN (Figure 2D) (Naba et al. 2012). L'analyse des protéines matricielles différemment exprimées entre nos deux conditions montre que la MEC produite par les MAF invalidés pour LOXL2 présente une diminution de l'expression de nombreux types de collagène comme COL4A2, COL3A1, COL14A1, COL15A1 mais aussi d'autres protéines impliquées dans le remodelage matriciel comme LOXL4 et MXRA5, ainsi que des protéines matricielles comme SPARC, POSTN ou THSB2, et enfin les protéines matricielles FBLN5 et FBLN1 à domaine RGD, connue pour l'assemblage des fibres élastiques dans les vaisseaux et la peau (Table 1). Étant donné le rôle important du remodelage matriciel dans le développement tumoral et la dissémination métastatique, l'interaction des cellules de mélanome avec la MEC produite par les MAF a été modélisée en cultivant des cellules de mélanome sur des matrices dérivées de fibroblastes en 3D (figure 3A). Nous avons ensemencé des cellules de mélanome dédifférenciées (1205Lu) sur des matrices produites par des MAF invalidés ou non pour LOXL2 et suivi leur motilité par vidéomicroscopie. Les résultats montrent que les cellules de mélanome 1205Lu (en rouge) cultivées sur des matrices de collagène (en vert) dérivées de MAF invalidés pour LOXL2 sont moins positionnées le long des fibres et se déplacent sur une distance significativement plus faible que lorsqu'elles sont cultivées sur des matrices dérivées de MAF contrôles (figure 3B). Cela suggère que la MEC déposée par les MAFs exprimant LOXL2 favorise la motilité des cellules de mélanome. Il est intéressant de noter que les cellules de mélanome dédifférenciées présentent une morphologie différente lorsqu'elles sont ensemencées sur une MEC alignée ou non. En effet, après marquage du cytosquelette d'actine et des noyaux, nous observons que bien que l'aire des cellules reste inchangée dans nos conditions, les cellules ensemencées sur une MEC alignée sont plus étirées comme le montre l'analyse de leur circularité. A l'inverse, l'ensemencement des cellules 1205Lu sur une MEC désorganisée dû à l'invalidation de LOXL2, réduit considérablement leur allongement (Figure 3C).

L'ensemble de ces données indique que LOXL2 produite par les fibroblastes environnants le mélanome contribue au remodelage matriciel stromal et à l'assemblage d'une MEC organisée favorisant *in vitro* la migration des cellules tumorales.

FIGURE 1

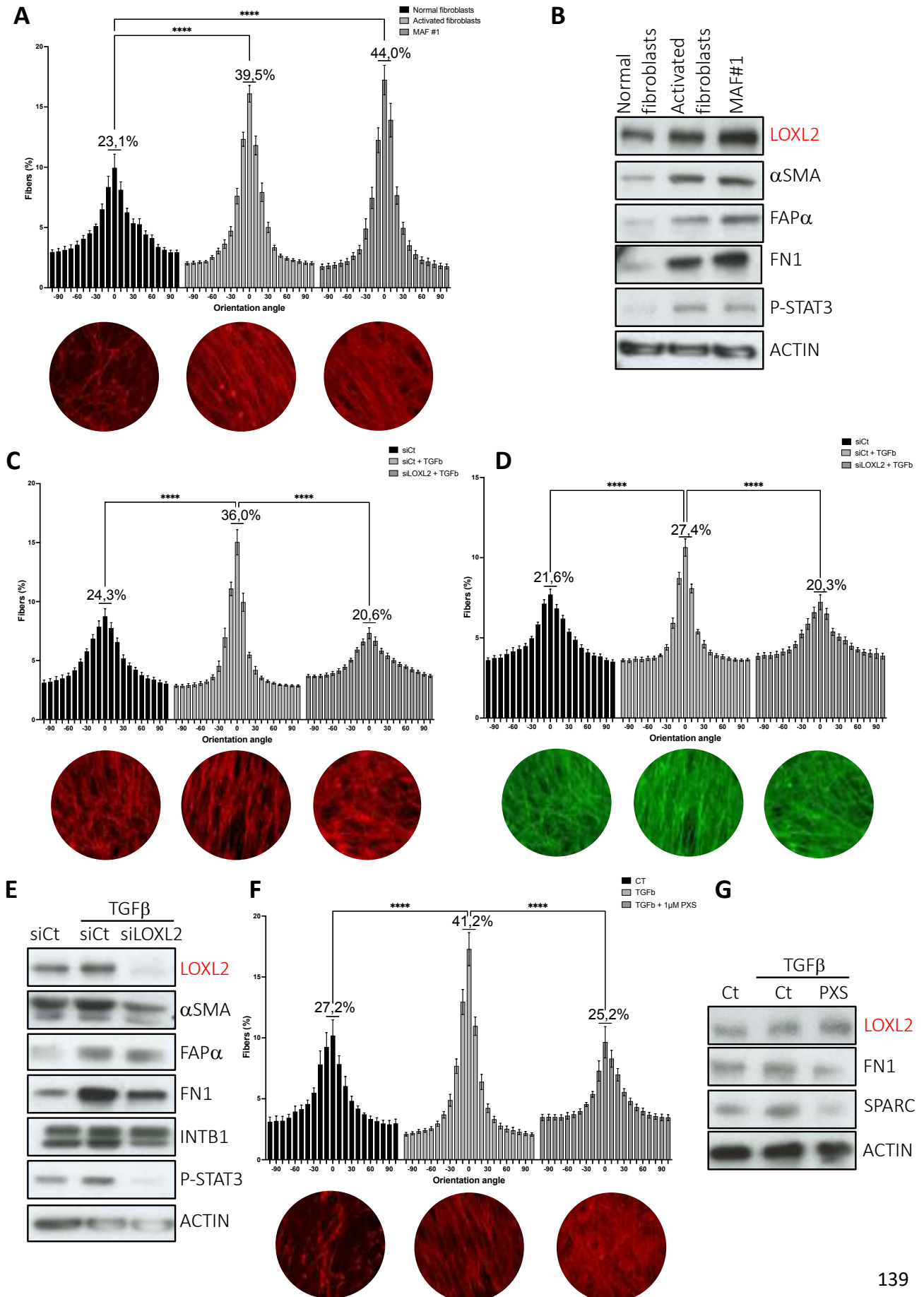


Figure 1 : LOXL2 knockdown or inhibition decreases the acquired myofibroblastic properties induced in skin fibroblasts upon TGFβ1 treatment :

(A) Skin fibroblasts and MAFs were plated on gelatin coated plates and stimulated to deposit ECM with 5μg/nl of ascorbic acid every 2 days, for a period of 6 days. To activate skin fibroblasts, 2ng/ml of rhTGFβ1 were added every 2 days. The cells were then lysed off from matrices and the ECM fibers were immunostained with antibodies against fibronectin 1 (FN1), illustrated by representative images (scale bar 25μm). Fibronectin fibers alignment was determined by calculating the angle of orientation for deposited fibers, using ImageJ analysis software. Statistical significance was assessed using Kruskal-Wallis analysis. *** $P < 0.001$.

(B) Endogenous LOXL2 protein expression was determined by subjecting control skin fibroblasts, skin fibroblasts activated with rhTGFβ1 (2ng/ml for 6 days), and MAF lysates to western blotting. Expression of indicated CAFS-S1 markers was analysed in parallel and ACTIN was used as a loading control.

(C) and (D) Skin fibroblasts were transfected with a siRNA sequence targeting LOXL2 or siControl and then treated with 2ng/ml of rhTGFβ1 and stimulated to deposit ECM with 5μg/nl of ascorbic acid every 2 days, for a period of 6 days. Fibronectin **(C)** and collagen I **(D)** fibers were stained and depicted by representative images. Fiber alignments were determined by calculating the angle of orientation for deposited fibers, using ImageJ analysis software. Statistical significance was assessed using Kruskal-Wallis analysis. *** $P < 0.001$.

(E) Cell lysates from the experiment in (C) were subjected to western blotting using antibodies against LOXL2, FAPα, β1 integrin (INTB1), αSMA, PDGFRβ, fibronectin (FN1) and pSTAT3. ACTIN was used as a loading control.

(F) During the ECM deposition assay, skin fibroblasts were treated with 2ng/ml rhTGFβ1 in the absence or presence of the protease inhibitor PXS5153A (5μM), which is known to inhibit LOXL2 enzymatic activity. Fibronectin fibers were stained (representative images, *bottom*) and their alignment were analysed with ImageJ (quantification, *on top*). Statistical significance was assessed using Kruskal-Wallis analysis. *** $P < 0.001$.

(G) LOXL2 and myofibroblast markers expression was analysed in western blot following the same culture and treatment conditions.

FIGURE 2

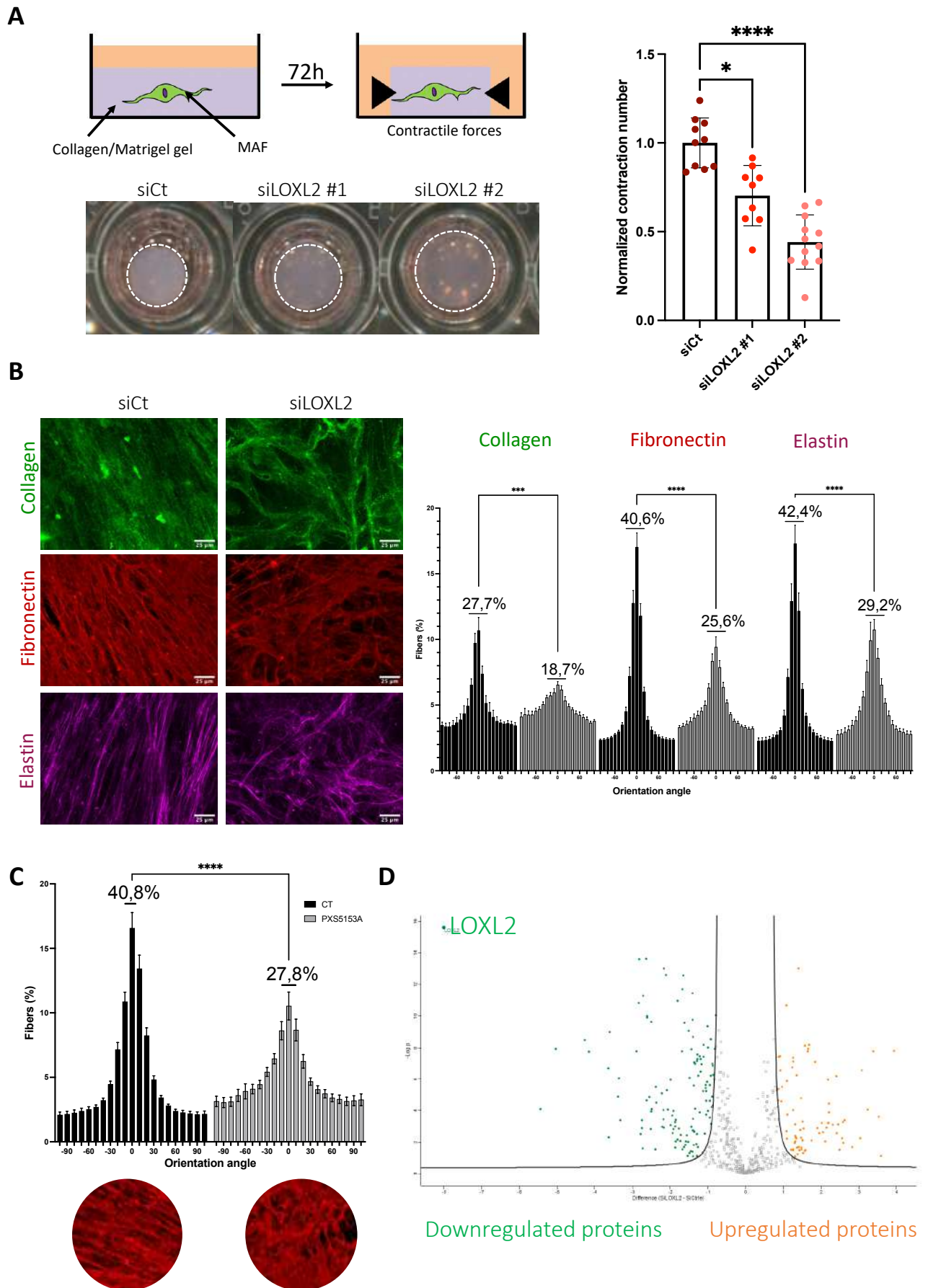


Figure 2 : LOXL2-silenced MAF lose their ability to deposit aligned ECM fibers :

(A) Collagen gel contraction assays of MAF derived from a human melanoma skin lesion transfected with two siRNA sequences targeting LOXL2 (siLOXL2 #1 ; siLOXL2 #2) or siControl. Scheme of the experimental design and representative images of contraction assays are shown. *Right panel*, quantification of gel contraction (percent). Bar graph represents the mean \pm s.d. of triplicate experiments. **** $P < 0.0001$, * $P < 0.05$, Kruskal-Wallis analysis.

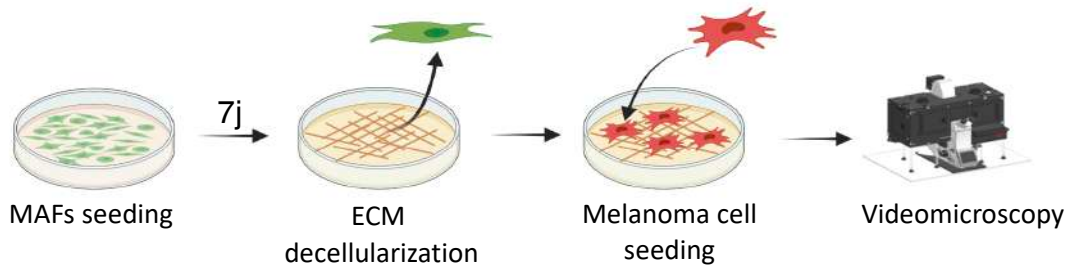
(B) *Left panel*, immunofluorescent images (scale bar 25 μ m) of deposited collagen I, fibronectin, and elastin fibers from MAF transfected with siCt or siLOXL2 #2. *Right panel*, quantification of fibers orientation in ECM derived from LOXL2-silenced MAF. ECM fiber alignment was determined by calculating the angle of orientation for deposited fibers, using ImageJ analysis software. Statistical significance was assessed using *** $P < 0.001$, Kruskal-Wallis analysis.

(C) MAFs were treated with vehicle or the LOXL2 inhibitor PXS5153A, at a concentration of 5 μ M, every 2 days, for the duration of the experiment. *Bottom panel*, immunofluorescent images of deposited fibronectin, and *top panel*, alignment quantification of deposited fibronectin was analysed using ImageJ software **** $P < 0.0001$, Kruskal-Wallis analysis.

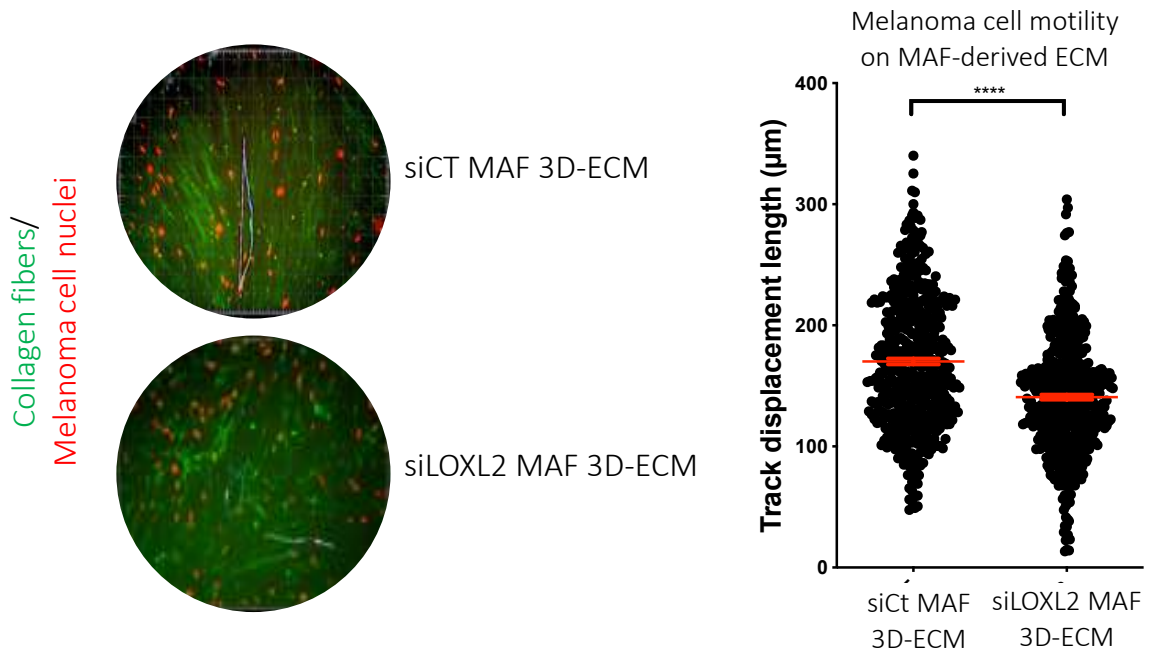
(D) Quantitative proteomic analysis of fibroblast-derived ECM produced by MAF transfected with siLOXL2 #2 or siControl. Volcano-plot shows matrisome components whose expression is increased (orange dots) or decreased (green dots) upon LOXL2 depletion.

FIGURE 3

A



B



C

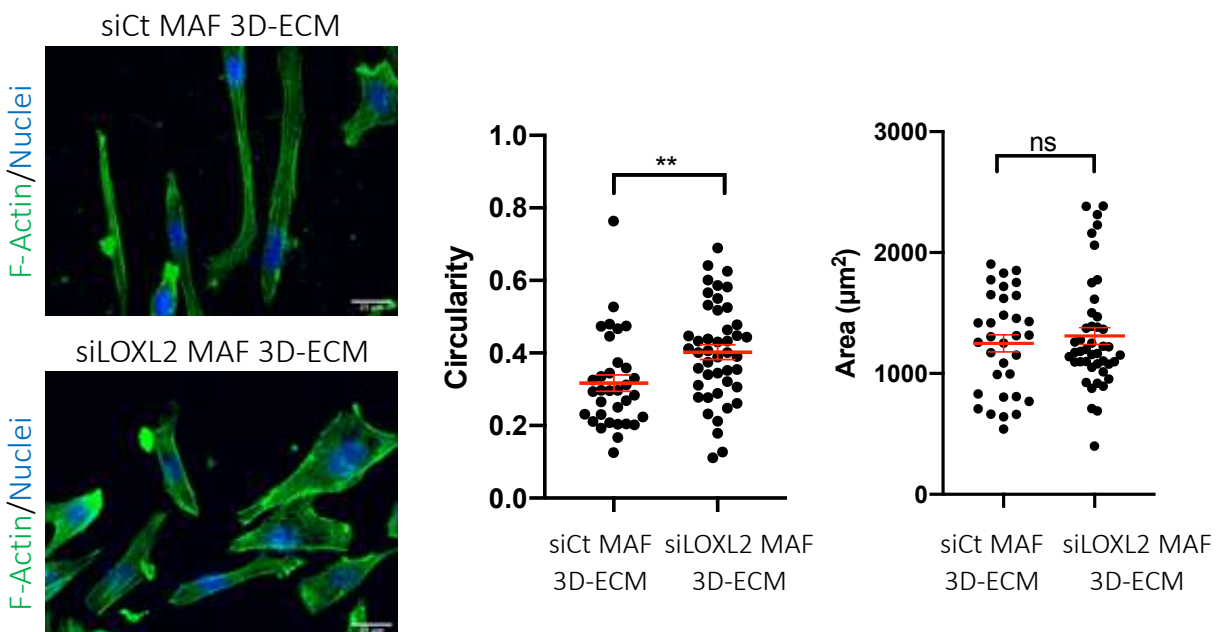


Figure 3 : Melanoma cells show an increase motility and a more elongated phenotype on fibroblast-derived matrices deposited by LOXL2 expressing MAF :

(A) Scheme of the experimental design. 1205Lu melanoma cells were stably transduced with the Incucyte® NuCLight Red Lentivirus Reagent and cultured on top of decellularized fibroblast-derived ECM produced by MAF transfected with 100nM of siLOXL2 #2 or siControl.

(B) Motility was assessed using live video microscopy of the 1205Lu melanoma cells cultured on top of ECM for a period of 24h. *Left panel*, immunofluorescent images (scale bar 25µm) of nuclei melanoma cell nuclei (red) seeded on collagen I fibers (green). *Right panel*, the distance displaced by each cell was tracked using IMARIS software and the track displacement length was plotted. Data represent the mean and ±SEM of five images per well that were acquired every 10 min. Statistical significance was calculated using Kruskal-Wallis analysis. **** $P < 0.0001$.

(C) *Left panel*, immunofluorescence analysis of F-Actin (green) of 1205Lu cells cultivated according to (A) (scale bar 25µM). *Right panel*, quantification of the area and circularity of the cells (n>30), ** $P < 0.01$.

Protein names	Gene names	Student's T-test Difference SiLOXL2_ SiCtrl
Protein S100-A8;Protein S100-A8, N-terminally processed	S100A8	3,523349762
Fibroleukin	FGL2	3,392506917
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5	ADAMTS5	3,088380814
Galectin-7	LGALS7	3,04242346
Plakophilin-1	PKP1	2,557668686
Zinc-alpha-2-glycoprotein	AZGP1	2,457110087
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1	ADAMTS1	2,400869793
Protein S100-A9	S100A9	2,205449634
Extracellular matrix protein 1	ECM1	2,144552867
Protein S100-A7	S100A7	2,057214313
Tenascin-X	TNXB	1,654027727
Thrombospondin-4	THBS4	1,649680244
Collagen alpha-2(IV) chain;Canstatin	COL4A2	-0,853822284
Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1	-0,900064256
Matrix-remodeling-associated protein 5	MXRA5	-0,930034637
Collagen alpha-1(XIV) chain	COL14A1	-0,992127524
Galectin-1	LGALS1	-1,113964293
CD59 glycoprotein	CD59	-1,114437103
Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	-1,215066062
Galectin-9	LGALS9	-1,270705753
Serpin H1	SERPINH1	-1,353881412
Myosin regulatory light chain 12B	MYL12B	-1,356264538
Alpha-crystallin B chain	CRYAB	-1,372482088
CD44 antigen	CD44	-1,403015773
Lysyl oxidase homolog 4	LOXL4	-1,43755722
Periostin	POSTN	-1,482831531
Collagen alpha-1(XV) chain	COL15A1	-1,493095822
Myosin-14	MYH14	-1,507652495
Myosin light polypeptide 6	MYL6	-1,612072627
Fibulin-1	FBLN1	-1,650455051
SPARC	SPARC	-1,678475274
Thrombospondin-2	THBS2	-3,385137134
Fibulin-5	FBLN5	-3,638083352
Lysyl oxidase homolog 2	LOXL2	-7,998878267

Table 1 : Quantitative mass spectrometry analysis of fibroblast-derived ECM.

Complete list of core matrisome and matrisome-associated proteins detected by mass spectrometry of fibroblast-derived ECM produced by skin MAF transfected with siRNA against LOXL2 or siControl. The table provides the student's T test difference of siLOXL2 vs siCtrl. Identified proteins were matched with the human matrisome database (Naba et al. 2012).

Discussion et perspectives

Malgré le succès des thérapies ciblant la voie oncogénique BRAFV600E ou les points de contrôle immunitaires, le mélanome cutané reste de nos jours un problème de santé publique majeur. Le mélanome est un cancer agressif et hautement invasif qui présente des résistances et des rechutes importantes. En fonction du microenvironnement et des pressions thérapeutiques, les cellules de mélanome peuvent subir une transition phénotype et ainsi se reprogrammer pour passer d'un état mélanocytaire à des états dédifférenciés associés à une expression accrue des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) et des marqueurs mésenchymateux. Cette plasticité adaptative a été décrite comme un facteur de résistance aux thérapies ciblées. Mes travaux de thèse s'appuient sur des observations originales de l'équipe selon lesquelles les cellules de mélanome dédifférenciées produisent une matrice extracellulaire (MEC) abondante enrichie en LOXL2, une enzyme de réticulation du collagène également connue pour piloter la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans de nombreux carcinomes, dont le cancer du sein. Au cours de ma thèse, j'ai émis l'hypothèse que la production de LOXL2 par les cellules de mélanome et sa présence dans le stroma pourraient influencer la progression métastastique du mélanome et la réponse aux traitements.

Est-ce que LOXL2 agit comme un acteur ou est-il une conséquence de la transition phénotypique des cellules de mélanome cutané ?

Comme nous l'avons vu précédemment, le mélanome cutané est un cancer très hétérogène et caractérisé par une plasticité cellulaire très importante, permettant aux cellules cancéreuses de s'adapter aux différents stress et signaux du microenvironnement. L'acquisition d'un phénotype dédifférencié s'accompagne d'une résistance accrue aux thérapies ciblées, de fortes propriétés invasives, ainsi qu'une production de MEC plus rigide et organisée par les cellules tumorales. Dans notre laboratoire, nous avons analysé par spectrométrie de masse la MEC produite par des cellules dédifférenciées résistantes aux thérapies ciblées en comparaison à celle produite par les cellules parentales mélanocytaires. Nous avons ainsi identifié LOXL2 comme étant le seul membre de la famille des Lysyl Oxidases surexprimé dans la MEC provenant de cellules dédifférenciées. Pour aller plus loin dans notre étude, l'analyse *in silico* des bases de données publiques montre que LOXL2 est spécifiquement exprimé dans des populations de cellules indifférenciées et de cellules de type crête neurale caractérisées par une expression élevée de AXL et des propriétés invasives et résistantes. Nous avons confirmé l'expression de LOXL2 dans des lignées cellulaires de mélanome dédifférenciées, dans des cultures fraîchement isolées de patients, et dans des cellules de mélanome qui ont acquis une résistance non génétique à l'inhibiteur de BRAF, le Vemurafenib. Il est d'ailleurs intéressant de noter que LOXL2 est le seul membre de la famille des Lysyl Oxidase qui présente une différence d'expression aussi marquée entre les deux phénotypes cellulaires. De plus, une analyse bio-informatique a montré que l'expression de LOXL2 est inversement corrélée à l'expression de MITF et positivement corrélée à l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que AXL et ZEB1. Enfin, la déplétion de MITF entraîne une augmentation de l'expression de LOXL2 dans les cellules mélanocytaires MITF^{low}, ce qui suggère que MITF pourrait réguler négativement l'expression de LOXL2 dans le mélanome. Au contraire, l'expression de LOXL2 est régulée à la baisse dans les cellules de mélanome dédifférenciées suite à la déplétion de ZEB1. Ce facteur de transcription a été décrit comme étant un moteur majeur de la plasticité des cellules de mélanome. En effet, comme nous l'avons observé avec LOXL2, une forte expression de ZEB1 est corrélée à une faible expression de MITF, et est associée à une résistance innée aux thérapies ciblées dans les lignées cellulaires, mais aussi chez les patients. En effet, une grande majorité des patients qui ne présentent pas de réponse initiale au traitement, est caractérisée par une forte expression de ZEB1. La surexpression de ZEB1 est aussi suffisante pour entraîner l'émergence d'une résistance aux MAPKi alors que l'inhibition de ZEB1 permet une différenciation des cellules de mélanome, empêche la tumorigenèse *in vivo*, sensibilise les cellules naïves aux MAPKi, et induit la mort cellulaire des cellules résistantes (Richard et al. 2016). De façon intéressante, dans le cancer du poumon et le cancer colorectal, des tests d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont montré une liaison directe de ZEB1 au promoteur de LOXL2 (D. H. Peng et al. 2017). Cette liaison directe au promoteur permet une régulation transcriptionnelle de LOXL2 par ZEB1 et induit une invasion accrue des cellules

cancéreuses (F. Wang et al. 2021). Cependant dans nos expériences, LOXL2 ne phénocopie pas tous les effets que contrôle ZEB1 dans le mélanome cutané. Bien que LOXL2 soit aussi connu pour induire une transition épithélio-mésenchymateuse dans les cancers du sein, le cancer colorectal, le cancer du col de l'utérus ou encore l'adénocarcinome du pancréas (I.-K. Kim et al. 2019; P.-G. Park et al. 2017; Tian et al. 2019; Peinado et al. 2005), l'inactivation de LOXL2 dans nos cellules de mélanome dédifférenciées n'entraîne pas de modifications de l'expression de marqueurs importants pour la transition phénotypique au niveau protéique et génique. De plus, nos expériences de viabilité cellulaire montrent que l'inactivation de LOXL2 ne suffit pas à re-sensibiliser les cellules de mélanome aux inhibiteurs de BRAF/MEK *in vitro*. Ces résultats suggèrent que LOXL2 ne médie qu'une partie des effets de ZEB1.

Parmi les différents signaux connus pour induire un changement phénotypique vers un état agressif et dédifférencié, nous nous sommes concentrés sur l'hypoxie. Selon Cheli *et al*, un microenvironnement hypoxique est capable de diminuer l'expression de MITF par un mécanisme transcriptionnel indirect dépendant de HIF1 α dans le mélanome (Y. Cheli et al. 2012). Nous avons confirmé dans nos expériences l'acquisition d'un phénotype dédifférencié dans des conditions hypoxiques avec la diminution de l'expression des marqueurs mélanocytaires MITF et SOX10 et l'augmentation de l'expression des protéines mésenchymateuses AXL et FN1. Cela suggère que l'expression de LOXL2 est associée à l'acquisition de ce phénotype MITF^{low}. Notre étude nous a permis de mettre en évidence le fait que LOXL2 est induit et régulé par des signaux et marqueurs clés de la transition phénotypique comme ZEB1 ou encore l'hypoxie, mais n'agit pas comme un moteur de la plasticité puisque LOXL2 n'est pas suffisant, seul, pour permettre aux cellules de mélanome de transiter d'un état phénotypique à un autre.

Les thérapies ciblées ont constitué une avancée remarquable dans la prise en charge du mélanome métastatique. Cependant, la résistance à ces thérapies reste un obstacle majeur dans la gestion clinique de la maladie. En plus de façonner le microenvironnement tumoral, les traitements actuels ont un impact sur les états de transition pour favoriser la plasticité phénotypique des cellules de mélanome et l'hétérogénéité intratumorale, ce qui compromet l'efficacité du traitement et les résultats cliniques. Dans ce contexte, les cellules de mélanome dédifférenciées mésenchymateuses présentent une capacité importante à assembler de manière autonome leur propre matrice extracellulaire et à s'adapter en réponse aux agressions thérapeutiques, alimentant ainsi la rechute tumorale. Les mélanomes échappent au ciblage de BRAF par une reprogrammation transcriptionnelle des cellules qui vont acquérir un phénotype dédifférencié, caractérisé par l'activation de voies de survie alternatives comme PI3K/AKT médiée par les récepteurs tyrosine kinase (RTK) (Tsoi et al. 2018; Müller et al. 2014; Rambow et al. 2018; Tirosh et al. 2016; Nazarian et al. 2010). Dans des paires isogéniques de lignées cellulaires sensibles et résistantes, nous avons en effet confirmé l'augmentation de l'expression des RTK tels que PDGFR β , FGFR1, AXL, DDR1, DDR2, et EGFR spécifiquement dans les cellules de mélanome qui ont acquis une résistance non génétique. Lors de l'adaptation précoce aux BRAFi/MEKi, nous avons également observé l'activation de la voie PI3K avec l'augmentation de la phosphorylation de la kinase AKT après 3 jours de traitement. Il est intéressant de noter que l'inhibition de la voie MAPK entraîne une augmentation de l'expression protéique et génique de LOXL2, qui peut être prévenue avec des inhibiteurs de PI3K et des RTK. L'induction de LOXL2 sous thérapies ciblées est cohérente puisque les cellules qui ont acquis une résistance aux BRAFi présentent un phénotype de type CAF/myofibroblastes caractérisé par une surexpression de marqueurs myofibroblastiques et fibrotiques tels que α -SMA, cavéoline 1, MLC2, TAGLN2, FAP α et LOXL2. Ces cellules affichent aussi des comportements normalement associés aux CAF comme des propriétés contractiles accrues et une capacité à produire un réseau de collagène organisé. Dans le cas d'une réponse adaptative aux thérapies ciblées, les cellules acquièrent aussi l'expression des différents marqueurs myofibroblastiques et ces caractéristiques CAF-Like (Girard et al. 2020).

La reprogrammation mécanique en réponse aux thérapies ciblées participe à l'adaptation précoce et tardive des cellules de mélanomes aux traitements. Nous avons récemment découvert au sein de notre laboratoire que la plasticité mécanique des cellules de mélanome sous thérapies ciblées repose sur l'activité d'un cluster de microARN miR-143/-145. Ce cluster permet une dédifférenciation des cellules de mélanome associée à l'acquisition de propriétés invasives, d'une résistance aux traitements accrue, et d'une reprogrammation de la MEC. Le blocage de ce cluster de microARN empêche ainsi la transition phénotypique des cellules de

mélanome vers un phénotype dédifférencié. Nous avons mis en évidence que le cluster miR-143/-145, cible la protéine de liaison à l'actine Fascin-1 connue pour moduler le dialogue entre le cytosquelette d'actine et la MEC. La surexpression transitoire et stable des miARN dans des cellules présentant un phénotype mélanocytaire induit une augmentation de l'expression de LOXL2 tandis que l'inhibition de ces miARN dans des cellules dédifférenciées diminue l'expression de LOXL2 et prévient son induction en réponse à l'inhibition de la voie des MAPK dans des cellules mélanocytaires. De la même manière, les cellules résistantes à BRAFi M238R qui surexpriment FSCN1 diminuent l'expression de LOXL2. De plus, nous avons découvert que l'inhibiteur de RTK Nintedanib, et médicament anti-fibrotique, empêche l'activation du cluster miR-143/-145 sous thérapies ciblées (Diazi et al. 2022). De la même façon, nous avons dans nos résultats, confirmé que le Nintedanib prévient l'induction de LOXL2 par BRAFi.

Comme les cellules de mélanome dédifférenciées acquièrent des propriétés hautement invasives, nous avons confirmé que la déplétion transitoire ou stable de LOXL2 entraîne une réorganisation du cytosquelette d'actine et une diminution de la motilité, de la migration et de l'invasion des cellules de mélanome. En accord avec ces résultats, d'autres études ont attribué à LOXL2 un rôle important dans l'invasion. Par exemple, la régulation transcriptionnelle de la lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) par ZEB1 dans le cancer du col de l'utérus réduit la capacité d'invasion et de migration de ces cellules (Hase et al. 2014). De même, il a été démontré précédemment que LOXL2 réorganise le cytosquelette d'actine dans le carcinome épidermoïde de l'œsophage (ESCC) et que la phosphorylation d'Ezrin induite par LOXL2 et donc la réorganisation du cytosquelette favorisent l'invasion et la métastase des cellules tumorales (Zhan et al. 2019). De plus, nous montrons que l'inhibition de LOXL2 entraîne une diminution spectaculaire de la colonisation des poumons par les cellules de mélanome dédifférencié 1205Lu. Les souris auxquelles nous avons injecté des cellules dédifférenciées contrôle ont commencé à montrer une activité luciférase détectable à 4 semaines. De la même façon, Moreno-Bueno *et al* ont montré une différence significative de colonisation pulmonaire dans un modèle de cancer du sein, où les souris injectées avec le contrôle ont commencé à montrer des signaux à 3 semaines jusqu'à 9 semaines alors que les souris injectées avec shLOXL2 n'ont pas montré de signal bioluminescent (Moreno-Bueno et al. 2011). Enfin, dans nos cellules dédifférenciées invalidées pour LOXL2, nous avons observé une diminution de l'activité contractile et de leur capacité à déposer de la MEC.

Sur la base de ces résultats, LOXL2 ne semble pas être un acteur clé impliqué dans le contrôle de la transition phénotypique puisque que LOXL2 semble être dispensable pour la résistance acquise aux thérapies ciblées, et pour la réponse anti-proliférative précoce des cellules de mélanome dédifférenciées au cocktail BRAFi/MEKi et que sa déplétion ne permet pas aux cellules de mélanome de transiter vers un autre état phénotypique. Cependant, nous avons montré que l'expression de LOXL2 est spécifique à la sous-population dédifférenciée de cellules de mélanome, que son expression suit celles de nombreux marqueurs dédifférenciés, et qu'elle est induite par différents signaux induisant la transition phénotypique comme l'hypoxie et les thérapies ciblées. Le ciblage de LOXL2 est aussi capable d'impacter certaines caractéristiques importantes des cellules dédifférenciées et notamment leurs capacités invasives et métastatiques et leur propriétés myofibroblastiques. LOXL2 semble alors être un acteur important de l'acquisition d'un phénotype CAF-Like des cellules de mélanome. L'expression de LOXL2 étant spécifique à cette sous-population de cellules dédifférenciée de mélanome, LOXL2 pourrait représenter un nouveau biomarqueur traduisant de l'agressivité et de la résistance du mélanome. LOXL2 représente déjà un biomarqueur de pronostic dans le carcinome hépatocellulaire (N. Zhao et al. 2023), et un biomarqueur métastatique dans le cancer du sein (Janyasupab et al. 2015).

Dans quelle mesure les rôles extracellulaires et intracellulaires de LOXL2 sont impliqués dans la progression du mélanome cutané ?

Dans la littérature, LOXL2 est connu comme étant une enzyme sécrétée qui a pour rôle principal de réticuler les fibres de collagène et d'élastine. En effet, la fonction canonique des enzymes de la famille des Lysyl Oxidase dont fait partie LOXL2 est la maturation de la matrice extracellulaire (MEC). Ces enzymes catalysent la désamination des groupes ϵ -amino des résidus peptidyl-lysine et hydroxylysine pour produire des aldéhydes hautement réactifs qui subissent une condensation spontanée, établissant ainsi des liaisons intra- ou inter-réticulations dans le collagène et l'élastine (Lucero et Kagan 2006). Malgré leur rôle bien établi dans la maturation de la MEC, les protéines de réticulation sont également associées à divers processus physiologiques et pathologiques, notamment la fibrose, le cancer et les maladies cardiovasculaires. Dans nos expériences, nous avons effectivement identifié LOXL2 au niveau extracellulaire au sein de la MEC produite par des cellules résistantes différenciées. Cependant, grâce à un fractionnement subcellulaire, nous avons pu observer l'expression de LOXL2 dans le noyau, le cytoplasme, le milieu sécrété et la MEC des cellules de mélanome (non montré). En effet, la protéine LOXL2 est largement distribuée dans les compartiments extracellulaire et intracellulaire ainsi que dans le noyau, et elle participe à de multiples processus intracellulaires et extracellulaires à travers ses divers effecteurs en aval. De plus, de nombreuses preuves se sont accumulées montrant le rôle de LOXL2 dans plusieurs cancers humains et il est d'ailleurs intéressant de noter que le rôle de LOXL2 dans ce contexte pathologique a été associé à sa localisation intracellulaire et nucléaire. En effet, LOXL2 intracellulaire peut jouer un rôle important sur la régulation de certaines voies de signalisation et ainsi impacter la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration ou encore la différenciation cellulaire. Dans le cancer du sein par exemple, LOXL2 peut interagir avec la protéine MARCKSL1 et favoriser la croissance des cellules cancéreuses en inhibant l'apoptose (B.-R. Kim et al. 2014). D'autres études ont montré mécaniquement que LOXL2 entraîne la tumorigenèse par son action sur la TEM, notamment dans les cancers du sein en collaborant avec SNAI1 pour réprimer l'expression de *CDH1* en empêchant la dégradation de SNAI1 dépendant de GSK3 β (Peinado, Portillo, et Cano 2005). Dans le noyau, LOXL2 peut également oxyder la lysine 4 triméthylée dans l'histone 3 (H3K4me3) après la liaison de SNAI1 à l'hétérochromatine, réprimant ainsi la transcription de *CDH1* (Millanes-Romero et al. 2013; Herranz et al. 2016).

Peu d'études existent concernant le rôle de LOXL2 dans le développement et la progression du mélanome cutané. LOXL2 a seulement été décrit comme étant exprimé au sein des lignées de cellules de mélanome, mais aussi dans les tumeurs de mélanome primaires en comparaison aux nævus bénins (Kielosto et al. 2018). Nous avons ainsi montré de façon originale que LOXL2 a un rôle intracellulaire important dans le mélanome cutané. La protéine est, en effet, spécifique d'une sous-population agressive, résistante et invasive de mélanome, et est responsable du maintien des caractéristiques migratoires, invasives, métastatiques et myofibroblastiques de cette sous-population.

Comme décrit précédemment, plusieurs études montrent que LOXL2 favorise la progression de différents types de tumeurs. Initialement, LOXL2 a été identifié comme un acteur important dans les maladies fibrotiques (Puente et al. 2019; Diazi, Tartare-Deckert, et Deckert 2020). C'est la raison pour laquelle certains inhibiteurs diminuant l'expression ou l'activité de LOXL2 ont été développés et sont envisagés en tant que nouveaux agents thérapeutiques utiles pour le traitement des fibroses et de certains cancers. Le développement des inhibiteurs de LOXL2 a commencé avec le Simtuzumab, un anticorps humanisé ciblant LOXL2. Cependant, cet anticorps n'a pas réussi à démontrer son efficacité clinique dans plusieurs essais cliniques de phase 2 sur plusieurs types de cancer (Benson et al. 2017; Hecht et al. 2017). Par la suite, de nouveaux inhibiteurs de LOXL2 ont été développés comme le PXS-S1A. Il s'agit d'un inhibiteur LOXL2 de première génération qui a montré des résultats prometteurs dans des modèles précliniques. En effet, le PXS-S1A a permis d'inhiber la croissance des tumeurs primaires et de réduire l'angiogenèse dans des modèles de cancer du sein, mais a été moins efficace pour bloquer la charge métastatique globale dans le foie et les poumons (Chang et al. 2017). Cela pourrait s'expliquer par le fait que certaines fonctions intracellulaires de LOXL2 sont indépendantes de son activité catalytique. Dans notre étude, nous avons voulu définir si l'activité catalytique de LOXL2 était responsable des effets fonctionnels que nous avons observés. Pour montrer si la

migration induite par LOXL2 dépend de son activité catalytique, nous avons utilisé un double inhibiteur LOXL2/LOXL3 à action rapide, le PXS-5153A. L'inhibition pharmacologique de LOXL2 n'a eu aucun effet sur la migration des cellules de mélanome, ce qui suggère que son rôle sur la migration dans le mélanome ne dépend pas de son activité enzymatique. Plusieurs études ont montré que LOXL2 favorise la migration ou l'EMT indépendamment de son activité catalytique dans les cellules ESCC et rhabdomyosarcome (RMS) (Almacellas-Rabaiget et al. 2020b). Par la suite, il serait nécessaire d'effectuer des expériences supplémentaires avec des mutants (H626/628Q) catalytiquement inactifs de LOXL2 afin de consolider nos résultats. Cuevas *et al*, ont généré et caractérisé un mutant de délétion ainsi qu'un double mutant qui présentent tous deux une activité enzymatique réduite en comparaison au plasmide LOXL2 sauvage. Ces constructions ont permis de montrer que les mutants LOXL2 catalytiquement inactifs assurent quand même la transition mésenchymateuse (Cuevas et al. 2014).

Lorsque l'on envisage de cibler un membre de la famille des Lysyl Oxidases et plus spécifiquement LOXL2 avec différents inhibiteurs, il est alors nécessaire de garder à l'esprit d'une part que les membres de la famille des Lysyl oxydases peuvent avoir des fonctions redondantes comme cela a été récemment démontré pour LOXL2 et LOXL3 (Santamaría et al. 2022). D'autre part, il convient de considérer que les inhibiteurs de LOXL2 de petit poids moléculaire sont conçus pour bloquer l'activité catalytique de l'enzyme, et nous venons de discuter du fait que l'activité enzymatique de LOXL2 n'est pas requise pour de nombreuses fonctions intracellulaires de LOXL2 dans le cancer, comme l'induction de l'EMT dans les cancers du sein, ou encore les propriétés migratoires dans le mélanome cutané. C'est la raison pour laquelle étudier le mécanisme d'action de LOXL2 dans les principaux processus cellulaires dans lesquels la protéine est impliquée nous permettrait de valider au mieux cette cible thérapeutique potentielle.

L'analyse protéomique que nous avons réalisée sur nos lignées stablement déplétées pour LOXL2, a révélé plusieurs cibles régulées à la baisse impliquées dans le remodelage de l'ECM, et la dynamique du cytosquelette d'actine par exemple. Nous avons sélectionné puis confirmé que la protéine PAI-2 est une cible de LOXL2 qui impacte les propriétés migratoires des cellules de mélanome. Dans le cancer du sein, la surexpression du cluster miR-200c/141 augmente le taux de PAI-2 dans les lignées cellulaires du cancer du sein triple négatif et la déplétion de PAI-2 par siRNA réduit les métastases pulmonaires (Jin et al. 2017). De plus, les cellules métastatiques cérébrales des cancers du poumon et du sein expriment des niveaux élevés de protéine PAI-2 afin d'empêcher la génération de plasmine et son effet de suppression métastatique (Valiente et al. 2014). Par conséquent, l'expression de PAI-2 est corrélée à un potentiel métastatique accru et à une évolution défavorable du cancer du sein. La protéine PAI-2 pourrait être un biomarqueur utile pour évaluer le risque métastatique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. Des expériences supplémentaires seraient donc intéressantes à réaliser pour évaluer le rôle de PAI-2 dans l'organisation de la MEC tumorale et les capacités métastatiques des cellules de mélanome différenciées.

Ainsi, nous avons montré dans le mélanome cutané que LOXL2 pouvait avoir à la fois un rôle intracellulaire important dans les propriétés invasives et métastatiques des cellules différenciées, mais aussi un rôle extracellulaire dans le remodelage de la MEC produite par les cellules de mélanome. La MEC étant principalement produite par les fibroblastes du microenvironnement tumoral, nous nous sommes par la suite intéressés au rôle de LOXL2 au sein des CAF (ou MAF dans le mélanome).

Quelle est la contribution de LOXL2 au sein du microenvironnement tumoral ?

La MEC est un composant clé du microenvironnement tumoral et constitue un maillage complexe de protéines réticulées fournissant des signaux à la fois biophysiques et biochimiques qui sont d'importants régulateurs de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire. Dans le cancer, les CAF sont les principales cellules productrices de MEC. Cependant dans les années 70, de nouvelles études ont montré pour la première fois que certaines enzymes de modification du collagène comme les prolyl hydroxylases ont été identifiées au sein de cellules cancéreuses de l'hypophyse, de neuroblastome, mais aussi au sein des cellules de mélanome (Langness et Udenfriend 1974). Cela a permis d'émettre l'hypothèse que les cellules cancéreuses sont capables de produire et remodeler leur propre MEC comme peuvent le faire les fibroblastes. De nombreuses stratégies ont été mises en place afin d'analyser la composition protéique de la MEC tissulaire et de définir si des différences existent entre les différents tissus, et entre les cellules stromales et cancéreuses. Le développement de méthodes basées sur la protéomique couplées à une analyse bioinformatique du « matrisome » (MEC et protéines associées à la MEC) pour analyser la composition protéique de la matrice extracellulaire tissulaire a permis de caractériser en détail des MEC provenant de tissus murins normaux (poumon et côlon) et des tumeurs de mélanome métastatiques et non métastatiques qui comprennent chacune plus d'une centaine de protéines. De plus, en utilisant des modèles de xénogreffes humaines sur souris, Naba *et al*, ont pu montrer que les cellules tumorales et les cellules stromales contribuent toutes les deux à la production de la MEC du microenvironnement tumoral. LOXL2 a d'ailleurs été identifié dans la MEC produite par les cellules tumorales de mélanome A375 (Naba *et al.* 2012). Ainsi, ces résultats appuient notre première approche qui nous a permis d'identifier l'enzyme LOXL2 au sein de la MEC produite par des cellules de mélanome dédifférenciées résistantes.

Dans le mélanome, nous avons vu que de nombreux signaux et stress du microenvironnement sont capables d'induire une transition phénotypique et ainsi une reprogrammation cellulaire vers un phénotype dédifférencié, invasif et résistant. Parmi ces signaux, nous avons mis en évidence que les thérapies ciblées utilisées dans le traitement du mélanome en clinique ainsi que l'hypoxie peuvent en effet entraîner une reprogrammation des cellules, et l'induction de l'expression de la protéine LOXL2 au niveau intracellulaire. De façon intéressante, nous avons aussi observé que les thérapies ciblées augmentent également la sécrétion de LOXL2, suggérant que ce signal peut aussi avoir un effet sur son rôle extracellulaire. Il est, en effet, très préoccupant de constater que les inhibiteurs de BRAF et de MEK, actuellement utilisés pour traiter les patients atteints de mélanome porteurs de la mutation oncogénique BRAF, favorisent une MEC tolérante aux médicaments en activant la reprogrammation de la MEC dans les MAF et les cellules de mélanome. L'adaptation précoce et la résistance acquise à l'inhibition de la voie des MAPK induisent paradoxalement une reprogrammation et ainsi une modification de la composition et la topographie de la MEC dérivée des cellules de mélanome, ce qui a un impact important sur la rigidité de la tumeur et ses capacités de résistance (Girard *et al.* 2020). Nous avons d'ailleurs montré dans notre étude que l'expression de LOXL2 est nécessaire pour l'organisation de la MEC dérivée des cellules de mélanome ayant une résistance acquise aux inhibiteurs de la voie des MAPK. De plus, l'inhibiteur de BRAF PLX4032 active les MAF, favorise la production et le remodelage de la matrice dérivée des MAF dans les mélanomes, conduisant à la signalisation de l'intégrine β 1-FAK-Src et à la réactivation de ERK et MAPK dans les cellules de mélanome (Hirata *et al.* 2015). Il serait donc intéressant d'étayer notre étude en évaluant le rôle de LOXL2 dans l'activation des MAF et le remodelage matriciel sous thérapies ciblées, d'autant plus que LOXL2 est connu dans le cancer du sein pour activer directement les fibroblastes stromaux du microenvironnement tumoral via l'activation de la voie intégrines/FAK (Barker *et al.* 2013).

La prolifération rapide des cellules cancéreuses, combinée à des anomalies structurelles et fonctionnelles dans les vaisseaux sanguins tumoraux, entraîne l'apparition de régions au sein des tumeurs solides qui ont une disponibilité réduite en oxygène (Vaupel, Mayer, et Höckel 2004). Les cellules cancéreuses s'adaptent à un environnement hypoxique par l'activité transcriptionnelle de deux facteurs inductibles par l'hypoxie HIF1 et HIF2. L'hypoxie et ses facteurs de transcription représentent un stress du microenvironnement important, et vont permettre une reprogrammation des cellules et notamment de réguler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'angiogenèse, le métabolisme du glucose ou encore favoriser les propriétés invasives

et métastatiques des cellules cancéreuses (Semenza 2012). Nous avons montré dans nos expériences que l'hypoxie induit une transition phénotypique des cellules de mélanome vers un état dédifférencié comme le montre l'augmentation de l'expression de certains marqueurs mésenchymateux et dédifférenciés tels que AXL ou la fibronectine. Nous retrouvons d'ailleurs une augmentation de l'expression intracellulaire de LOXL2 en conditions d'hypoxie. Au sein du microenvironnement, l'hypoxie est capable d'affecter le dépôt, le remodelage et la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). En effet, dans les cellules hypoxiques du cancer du sein, HIF-1 active la transcription des gènes *PLOD1* et *PLOD2* codant pour les pro-collagène lysyl hydroxylases nécessaires à la biogenèse des fibres de collagène, qui est un constituant majeur de la matrice extracellulaire (Gilkes et al. 2013). Les facteurs de transcription HIF sont aussi connus pour réguler les enzymes extracellulaires qui modifient le collagène. Les enzymes de la famille des Lysyl Oxidases (dont LOXL2) ainsi que certaines métalloprotéases sont d'importants gènes cibles induits par l'hypoxie et régulés par HIF (Erler et al. 2009; Schietke et al. 2010; J. Y. Choi et al. 2011). D'autres expériences seraient ainsi nécessaires dans le mélanome afin de démontrer si l'hypoxie, déjà connue pour induire un phénotype dédifférencié des cellules de mélanome, est aussi capable de modifier et remodeler la MEC dérivée des cellules tumorales et stromales via la régulation de LOXL2. En réponse à différents signaux du microenvironnement LOXL2 semble avoir des rôles intracellulaires et extracellulaires importants afin de contribuer au remodelage du microenvironnement tumoral et ainsi permettre aux cellules cancéreuses de s'adapter à ces différents signaux. De plus, LOXL2 est nécessaire à l'assemblage du collagène de type IV et joue un rôle majeur dans l'organisation de la lame basale endothéliale, ce qui permet une régulation de l'angiogenèse (Bignon et al. 2011). De par son rôle dans l'organisation et le remodelage de la MEC, LOXL2 peut être une protéine clé dans de nombreux processus et ainsi apporter une contribution importante au sein du microenvironnement

Les MAF sont les cellules clés du microenvironnement tumorale et favorisent la progression du mélanome, les métastases et la résistance thérapeutique en présentant des propriétés myofibroblastiques, ce qui entraîne un remodelage important de la MEC dont ils sont les principaux producteurs (Sahai et al. 2020; Hirata et al. 2015; Ruitter et al. 2002). Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, les CAF sont très hétérogènes et affichent des phénotypes et des fonctions différents les uns des autres. À cet égard, différentes sous-populations de CAF ont été identifiées dans les tissus de carcinome et de mélanome. Plus précisément, un groupe appelé CAF-S1 associé à des propriétés myofibroblastiques et à l'expression de FAP α ou α SMA a été identifié dans les tissus de patients atteints de mélanome (Kieffer et al. 2020; Costa et al. 2018; Pelon et al. 2020). De nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires pour cibler les effets de remodelage de la MEC dérivée des MAF dans le microenvironnement, afin de « normaliser » la MEC. Une façon possible d'y parvenir serait de reprogrammer les MAF vers un phénotype de fibroblaste résident dans la tumeur primaire et les sites métastatiques. Cependant, cela nécessite une meilleure compréhension des mécanismes qui entraînent l'activation des fibroblastes normaux en MAFs. Comme nous avons montré un rôle important de LOXL2 dans l'acquisition et le maintien d'un phénotype CAF-Like dans les cellules de mélanome, nous avons émis l'hypothèse que LOXL2 produit par les fibroblastes du microenvironnement pouvait avoir un rôle dans l'assemblage de la matrice et ainsi sur les propriétés tumorales des cellules de mélanome.

Pour tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord confirmé que le niveau d'expression endogène de LOXL2 est significativement plus faible dans les fibroblastes naïfs en comparaison aux fibroblastes activés par du TGF β ou aux MAFs isolés de patients atteints de mélanome. De façon intéressante, nous avons observé que, contrairement aux fibroblastes de la peau, les MAF remodelent facilement la MEC *in vitro* et déposent ainsi une MEC alignée et organisée (Berestjuk et al. 2022). Les fibroblastes de peau et les MAF ont donc un phénotype très différent. Il est d'ailleurs important de noter que les fibroblastes résidents peuvent être une source de CAF et ont des signatures épigénétiques différentes (Albregues et al. 2015; Xiao et al. 2016). Les fibroblastes de la peau constituent alors un bon modèle pour étudier les mécanismes entraînant l'activation des fibroblastes en MAF au sein du microenvironnement tumoral. Nous avons ainsi activé des fibroblastes de peau invalidés ou non pour LOXL2 avec du TGF β humain recombinant et observé que la déplétion de LOXL2 empêche les fibroblastes activés par le TGF β de produire une MEC alignée, organisée et réticulée. Lorsqu'on analyse l'expression des différents marqueurs myofibroblastiques induits par le TGF β , nous remarquons que la déplétion de LOXL2 n'altère pas l'expression de certains marqueurs comme FAP α et

PDGFR β , mais entraîne une diminution de l'expression de FN1 ou encore α SMA. Cela suggère que LOXL2 est important pour permettre aux fibroblastes d'acquérir des propriétés myofibroblastiques comme la production d'une MEC organisée, mais ne suffit pas à contrôler complètement l'activation des fibroblastes de la peau. Pour déterminer si les effets que nous avons observés dépendent de l'activité enzymatique de LOXL2, nous avons utilisé l'inhibiteur de LOXL2 PXS5153A. Ce dernier inhibe la capacité de LOXL2 à réticuler le collagène et empêche le remodelage matriciel que nous observons sous traitement au TGF β . Il nous reste par la suite à définir si cet inhibiteur entraîne une diminution de l'expression de certaines protéines matricielles importantes. Dans la littérature, des analyses protéomiques du matrisome de fibroblastes de derme a montré que le ciblage de LOXL2 enzymatique à l'aide d'un anticorps anti-LOXL2 modifie l'orientation et l'épaisseur des fibres de la MEC, mais n'entraîne pas de modifications de sa composition. Cela laisse supposer que le ciblage de l'activité enzymatique de LOXL2 n'a d'impact que sur sa fonction de réticulation du collagène alors que le ciblage de la protéine LOXL2 totale par siARN peut influencer sur la composition et le phénotype des fibroblastes. Nous retrouvons là encore un rôle double de LOXL2 qui ne dépend pas forcément de son activité enzymatique. Dans le processus fibrotique du syndrome de détresse respiratoire aigüe, l'utilisation d'anticorps anti-LOXL2 n'a pas montré davantage par rapport au placebo chez les patients atteints de troubles fibrotiques, ce qui indique que le ciblage de l'activité enzymatique extracellulaire de LOXL2 n'est pas suffisant pour prévenir des cicatrices fibrotiques. Il a, en effet, été montré qu'en réponse au TGF β , l'expression de LOXL2 est retrouvée dans les noyaux des fibroblastes de poumons et myofibroblastes. La déplétion de LOXL2 est d'ailleurs capable d'inhiber la transition fibroblastes-myofibroblastes induite par le TGF β (Matsuo et al. 2021).

Nous avons vérifié par la suite si la déplétion et l'inhibition de LOXL2 dans les CAF altèrent leurs principales caractéristiques et avons ainsi confirmé que les propriétés contractiles des CAF étaient diminuées suite à l'invalidation de LOXL2. De plus, nous avons marqué les fibres de collagène, fibronectine et élastine et avons montré que la déplétion de LOXL2 entraîne une diminution de l'alignement des fibres de la MEC et ainsi une désorganisation de la MEC. Une analyse protéomique du matrisome de CAF invalidés ou non pour LOXL2 a permis de mettre en évidence plusieurs protéines impliquées dans le remodelage de la MEC et l'activation des fibroblastes dont l'expression est diminuée en absence de LOXL2 comme MXRA5, ou encore SPARC. Il serait alors nécessaire par la suite de se concentrer sur les cibles que nous avons identifiées afin de décrypter le mode d'action de LOXL2 dans les MAF. SPARC est une protéine matricellulaire étudiée dans l'équipe et pour laquelle nous avons montré un rôle important dans la transition phénotypique, la survie et la dissémination métastatique des cellules de mélanome (Robert et al. 2006; Tichet et al. 2015; Fenouille et al. 2011). Il serait alors intéressant d'étudier son rôle dans les MAF, d'autant plus que SPARC a été retrouvée dans l'interactome de LOXL2 (Vallet et al. 2020). Enfin, nous avons étudié les effets que l'architecture de la MEC médiée par LOXL2 peut avoir sur les propriétés des cellules cancéreuses de mélanome cutané.

La protéine LOXL2 peut-elle favoriser un dialogue entre les cellules de mélanome et leur microenvironnement ?

Le dialogue entre la tumeur et son stroma joue un rôle fondamental dans la progression cancéreuse. Les facteurs sécrétés par les cellules tumorales activent les fibroblastes locaux, qui à leur tour sécrètent des niveaux accrus de facteurs de croissance, de chimiokines, de protéines de la MEC et d'enzymes de remodelage matriciel pour modifier le microenvironnement tumoral et ainsi favoriser la prolifération, la survie, l'invasion et les métastases des cellules tumorales (Bissell et Radisky 2001). Comme le mélanome est un cancer qui présente une importante plasticité cellulaire, nous étudions dans l'équipe les facteurs sécrétés par les différentes sous populations de cellules de mélanome. Parmi ces facteurs, nous avons observé que le TGF β 1 est le facteur sécrété dans le milieu conditionné dérivé de cellules de mélanome invasives prédominant qui entraîne un phénotype MAF. Pour modéliser l'activation paracrine des fibroblastes de la peau par les cellules de mélanome en fonction de leur état phénotypique, des fibroblastes cutanés ont été traités avec un milieu conditionné (CM) dérivé soit de cellules de mélanome différenciées, mélanocytaires et plus prolifératives, soit de cellules de mélanome dédifférenciées, invasives et de type mésenchymateux. Le traitement des fibroblastes cutanés avec le CM dérivé de cellules de mélanome dédifférenciées

spécifiquement entraîne une augmentation de l'expression des marqueurs CAF-S1 FAP α , integrin β 1 et α SMA. Le CM de mélanome dédifférencié stimule les fibroblastes de la peau pour qu'ils présentent une activité myofibroblastique, caractérisée par un dépôt de MEC alignée et organisée (Popovic *et al*, en préparation). Étant donné que nous avons montré l'expression de LOXL2 spécifiquement au sein des cellules dédifférenciées de mélanome, il serait intéressant d'évaluer si LOXL2 peut être un des facteurs sécrétés du mélanome impliqué dans l'activation des fibroblastes. Ceci est d'autant plus relevant que la sécrétion de LOXL2 dérivée des cellules de cancer du sein est capable d'activer directement les fibroblastes du stroma tumoral (Barker *et al*. 2013).

Nous savons que la MEC contribue aux métastases, à l'invasion, à la plasticité et à la résistance thérapeutique du mélanome (Girard *et al*. 2020; Miskolczi *et al*. 2018; Hirata *et al*. 2015). Comme les MAF sont des cellules clés qui remodelent la MEC dans le microenvironnement du mélanome, les effets de la MEC déposée par les MAF exprimant LOXL2 ou non ont été étudiés. Nos résultats montrent que les MAF invalidés pour LOXL2 déposent une MEC moins organisée et alignée que les MAF contrôles. Nous avons par la suite ensemencé des cellules de mélanome sur les matrices produites par des MAF contrôle ou déplétés en LOXL2 et nous avons suivi leur morphologie et leur motilité par des techniques d'imagerie en temps réel. Nous montrons que les cellules de mélanome présentent une morphologie moins allongée et une motilité diminuée lorsqu'elles sont ensemencées sur une matrice désorganisée due à l'absence de LOXL2 dans les MAF qui ont déposé cette matrice. Ces résultats sont en accord avec une autre étude qui a d'abord réalisé un criblage d'anticorps et ainsi identifié un anticorps dirigé contre LOXL2 capable d'interférer avec l'assemblage des fibres de matrice. Ils ont pu montrer par la suite que la désorganisation de la MEC causée par le ciblage de LOXL2 par l'anti-LOXL2 perturbe la prolifération, l'adhésion et l'invasion des cellules cancéreuses de sein (Grossman *et al*. 2016). Il est d'ailleurs connu dans le cancer du sein que le collagène à l'intérieur et autour des tumeurs mammaires est fréquemment aligné et organisé. L'organisation du collagène est alors un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints d'un cancer du sein. Ceci peut être dû au fait que l'alignement du collagène facilite l'invasion des cellules cancéreuses en leur fournissant des pistes sur lesquelles migrer hors de la tumeur (Riching *et al*. 2014). La diminution de la motilité des cellules ensemencées sur une MEC désorganisée est intéressante puisque ces résultats montrent que la MEC provenant du stroma peut contribuer à la plasticité phénotypique des cellules de mélanomes, il serait alors important de vérifier l'expression de différents marqueurs phénotypiques et de caractériser ces cellules.

En plus de la contribution de la MEC stromale à la motilité des cellules de mélanome, nous avons récemment étudié dans l'équipe la résistance aux thérapies médiée par la MEC (MM-DR) en réponse à l'inhibition de la voie des MAPK dans le mélanome cutané. Nous avons ainsi démontré que les signaux physiques et structurels provenant de la MEC dérivée des fibroblastes empêchent les réponses antiprolifératives dues à l'inhibition de BRAF/MEK. Ces signaux mécaniques sont perçus par la cellule tumorale via les récepteurs au collagène à domaine discoidine DDR1 et DDR2. Ainsi, le ciblage de ces deux récepteurs permet de surmonter la résistance aux thérapies ciblées médiée par la MEC (Berestjuk *et al*. 2022). Dans la littérature, certaines études ont mis en évidence que la modification exacerbée du dépôt et de la rigidité de la MEC peut contribuer au développement d'une chimiorésistance acquise, probablement due à des modifications de la signalisation cellulaire. Pour en apporter la preuve, Schütze *et al*, ont montré que la surexpression de LOX/LOXL2 n'a aucun effet sur la sensibilité à la doxorubicine des cellules dans des modèles 2D alors que dans des modèles 3D, les cellules montrent une sensibilité réduite à la doxorubicine lorsque LOX/LOXL2 est surexprimé (Schütze *et al*. 2015). Une activité accrue de LOX/LOXL2 a été associée au développement de la chimiorésistance et le blocage de son activité augmente la pénétration du médicament dans les tumeurs murines et améliore ainsi l'homogénéité de la distribution des drogues (Le Calvé *et al*. 2016; Rossow *et al*. 2018). Il serait alors intéressant d'étudier si la désorganisation de la MEC due à l'invalidation de LOXL2 dans les MAF pourrait affecter la sensibilité des cellules de mélanome aux thérapies ciblées.

Peut-on considérer LOXL2 comme une nouvelle cible thérapeutique ?

Une meilleure compréhension des altérations moléculaires à l'origine de la progression du mélanome a permis le développement de thérapies ciblant la voie de signalisation des MAPK qui est activée de manière constitutive. Plus précisément, la combinaison d'inhibiteurs ciblant la mutation BRAF^{V600} (BRAFi) et d'inhibiteurs de MEK (MEKi) permet d'obtenir des réponses cliniques significatives chez les patients atteints de mélanome muté sur *BRAF* (Robert et al. 2019; Chapman et al. 2011). De plus, la découverte de molécules régulatrices du système immunitaire a ouvert la voie à des thérapies révolutionnaires contre le mélanome, définies comme « immunothérapies ». Ces thérapies sont basées sur des anticorps monoclonaux ciblant des récepteurs immunomodulateurs tels que la protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) ou la protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD-1) qui modulent l'activité des cellules T cytotoxiques, déclenchant ainsi le système immunitaire antitumoral. Concernant le traitement de première ligne du mélanome avancé, les MAPKi actuellement approuvés comprennent trois combinaisons d'inhibiteurs de la voie des MAPK : la combinaison Vémurafénib/Cobimétinib, Drabrafénib/Tramétinib et Encorafénib/Binimétinib. Les immunothérapies comprennent le Pembrolizumab, le Nivolumab et la combinaison Ipilimumab/Nivolumab. Cependant, la majorité des patients souffrent de résistances acquises aux thérapies ciblées et immunothérapies. De nombreuses études et essais cliniques en cours visent à déterminer la stratégie thérapeutique optimale permettant d'éviter les rechutes et de maximiser les chances de survie des patients. Trois stratégies candidates sont alors disponibles, à savoir une immunothérapie suivie d'un traitement aux MAPKi, les thérapies ciblées suivies d'une immunothérapie ou une combinaison des deux traitements (Bai et Flaherty 2021).

Il est nécessaire de définir cette stratégie de traitement optimale puisque plusieurs études ont montré l'existence d'une résistance croisée entre les thérapies ciblées et les immunothérapies (Diazi, Tartare-Deckert, et Deckert 2023). Orgaz *et al.*, ont en effet montré qu'au cours de l'adaptation des cellules de mélanome à l'inhibition de la voie MAPK un remodelage du cytosquelette ainsi qu'une augmentation de l'expression et de l'activité de la voie ROCK/Myosine II se met en place. Cette signalisation permet alors la survie des cellules de mélanome et favorise une immunosuppression. L'activité élevée de la voie ROCK/Myosine II est corrélée à une agressivité élevée et une résistance aux thérapies ciblées et immunothérapies. Une approche à l'aide d'inhibiteurs de ROCK s'est révélée prometteuse et a permis d'améliorer l'efficacité des inhibiteurs de la voie des MAPK et des immunothérapies, en ciblant spécifiquement les cellules résistantes via l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène et des dommages à l'ADN et en limitant l'immunosuppression myéloïde et lymphoïde (Orgaz et al. 2020). Une autre étude confirme chez des patients atteints de mélanome et des modèles murins que les tumeurs qui rechutent après une thérapie ciblée présentent une résistance croisée aux immunothérapies, bien que les modes d'action de ces thérapies soient différents. La résistance croisée est médiée par un microenvironnement tumoral immunosuppresseur instruit par les cellules cancéreuses et dépourvu de cellules dendritiques CD103⁺ fonctionnelles, empêchant une réponse efficace des lymphocytes T (Haas et al. 2021). Cette résistance croisée qui se met en place est la raison pour laquelle l'utilisation des immunothérapies en première ligne de traitement, indépendamment de la mutation que les patients arborent, est de plus en plus mise en place.

Nous avons montré dans nos résultats, que l'expression de l'enzyme LOXL2 est régulée par différents signaux connus pour induire une transition phénotypique vers un état cellulaire dédifférencié comme l'hypoxie ou encore les thérapies ciblées elles-mêmes, mais aussi par la présence de certains facteurs de transcription spécifiques de cette sous population comme ZEB1. LOXL2 est ainsi un marqueur spécifique des cellules résistantes et dédifférenciées de mélanome et joue un rôle important dans le maintien de leurs propriétés CAF-Like. Comme les cellules de mélanome développent une résistance croisée entre immunothérapies et les thérapies ciblées, et que l'expression de LOXL2 est spécifique aux cellules résistantes aux thérapies ciblées, nous pouvons supposer que LOXL2 pourrait contribuer à une résistance aux immunothérapies. Certaines études pourraient aller dans le sens cette hypothèse, et montrent en effet que plusieurs signaux régulant l'expression de LOXL2 sont capables de favoriser l'évasion immunitaire et la résistance aux immunothérapies. C'est le cas du facteur de transcription ZEB1 connu dans le mélanome en tant que

régulateur majeur de la plasticité cellulaire du mélanome, entraînant une résistance aux MAPKi. ZEB1 a été alors identifié comme un déterminant clé de l'exclusion des lymphocytes T et de l'échappement immunitaire du mélanome. Des analyses spatiales et transcriptomiques ont permis de mettre en évidence qu'une expression élevée de ZEB1 dans les cellules de mélanome est associée à une diminution de l'infiltration des lymphocytes T CD8+ dans une cohorte de mélanomes cutanés humains. En tant que facteur de transcription, ZEB1 est capable de se lier aux promoteurs des gènes codant pour les chimiokines attirant les lymphocytes T, y compris *CXCL10*, et de réprimer leur transcription et ainsi l'attraction des cellules immunitaires. Ainsi, le ciblage de ZEB1 est une approche intéressante puisqu'elle permet de favoriser le recrutement de lymphocytes T CD8+ au sein de la tumeur et d'augmenter la réponse à l'immunothérapie dans le mélanome (Plaschka et al. 2022). L'étude de LOXL2 dans le contexte des immunothérapies est d'autant plus importante que les patients atteints d'un mélanome non muté BRAF n'ont accès qu'aux immunothérapies qui présentent un taux de réponse assez faible. Nous avons par ailleurs confirmé que l'expression de LOXL2 au sein des cellules dédifférenciées spécifiquement est retrouvée indépendamment du profil mutationnel des cellules. LOXL2 est ainsi exprimé dans les cellules NRAS muté dédifférenciées.

De façon intéressante, les tumeurs naturellement résistantes aux immunothérapies présentent une signature transcriptionnelle (appelée IPRES ou résistance innée à l'anti-PD-1) particulière, indiquant une expression simultanée de gènes impliqués dans la régulation de la transition mésenchymateuse, de l'adhésion cellulaire, de l'hypoxie, de l'angiogenèse, de la cicatrisation des plaies et du remodelage de la matrice extracellulaire. Il est important de noter que les thérapies ciblées induisent des signatures similaires dans le mélanome, ce qui montre qu'une forme non génomique de résistance aux inhibiteurs de MAPK médie la résistance croisée au traitement anti-PD-1 (Hugo et al. 2015; 2016). La sélection de gènes liés à la MEC exprimés de manière différentielle par les cellules de mélanome résistantes dédifférenciées et les MAF (Girard et al. 2020; Diazi et al. 2022; Berestjuk et al. 2022) couplée à l'analyse des gènes exprimés en fonction de la réponse au Pembrolizumab chez les patients atteints d'un mélanome métastatique (Hugo et al. 2017), nous a permis par ailleurs d'identifier des composants de la MEC associés à la résistance croisée entre les thérapies ciblées et les immunothérapies. Parmi ces composants et protéines matricielles, nous retrouvons *LOXL2* comme étant associé à la résistance croisée. L'enzyme *LOXL2* pourrait être envisagée comme nouvelle cible thérapeutique dans le mélanome cutané, d'autant plus que de nombreuses approches consistent à cibler la rigidification de la MEC fibrotique par l'inhibition de l'activité des lysyl oxydases. En effet, la MEC tumorale est associée à la progression du cancer, à la résistance au traitement et à la suppression immunitaire. Une étude a cherché à comparer différents modèles précliniques de carcinomes murins avec des microenvironnements tumoraux hétérogènes, afin de relier le taux de raidissement de la tumeur au remodelage de la MEC et ainsi à déterminer comment ces caractéristiques affectent la migration intratumorale des lymphocytes T. Ils ont ensuite utilisé une stratégie de ciblage de la MEC via l'inhibition avec le BAPN de l'activité des lysyl oxydases et ont alors montré que modifier la réticulation du collagène permet de réduire la rigidité de la tumeur, conduisant à une meilleure migration des lymphocytes T et à une efficacité accrue du blocage anti-PD-1 (Nicolas-Boluda et al. 2021). Concernant *LOXL2*, plus spécifiquement, Peng *et al.*, ont montré que l'augmentation du dépôt et de la rigidification du collagène est capable de générer une résistance à l'immunothérapie PD-1/PD-L1 en régulant positivement l'expression de LAIR1 et la signalisation en aval, conduisant à un épuisement accru des lymphocytes T CD8+. De façon intéressante, l'inactivation de *LOXL2* par shARN ou l'inhibition de l'activité enzymatique de *LOXL2* avec l'acide éllagique est suffisante pour réduire le dépôt et la réticulation du collagène, pour réduire la charge métastatique, pour augmenter l'infiltration des lymphocytes T et permet ainsi une sensibilisation des cellules d'adénocarcinome pulmonaire au blocage de PD-L1 (Peng et al. 2020).

Dans l'idée de décrypter les mécanismes par lesquels *LOXL2* contribue à l'acquisition de propriétés invasives et métastatiques et la production d'une MEC mieux organisée, nous avons réalisé une analyse protéomique de nos cellules stablement déplétées pour *LOXL2*. Cette analyse nous a permis d'identifier certaines cibles de *LOXL2* impliquées dans la dynamique du cytosquelette ou encore la migration. De façon intéressante, nous avons mis en évidence un enrichissement des voies de signalisation à l'interféron ($\text{INF-}\alpha$, $\text{INF-}\beta$ et $\text{INF-}\gamma$) comme le montre la surexpression de certaines protéines impliquées dans ces voies comme STAT1, STAT2, IFIT1, IFIT2, IFIT3 ou encore MX1 et MX2 lorsque *LOXL2* est stablement invalidée dans nos cellules dédifférenciées de mélanome. La fixation d'un INF sur son récepteur entraîne l'activation de la protéine JAK1

et TYK2 qui vont permettre la phosphorylation des protéines STAT. Le dimère STAT/STAT2 peut ensuite se fixer sur la séquence consensus ISRE (interferon-stimulated response element) dans le noyau, ce qui peut activer de nombreux gènes nommés *ISG* (*interferon stimulated genes*). Cette surexpression de la voie interféron est importante puisque que dans le mélanome, elle est connue pour induire PD-L1 et PD-L2, les ligands du point de contrôle inhibiteur immunitaire PD-1 et ainsi entraîner une évasion immunitaire. Plus précisément l'axe interféron gamma-JAK1/JAK2-STAT1/STAT2/STAT3-IRF1 régule principalement l'expression de PD-L1. PD-L2 est régulé quant à lui par IRF1 et STAT3, qui se lient au promoteur de PD-L2. L'analyse de biopsies de patients montre alors que les patients répondant aux immunothérapies anti-PD-1 possèdent un enrichissement de la signature interféron (Garcia-Diaz et al. 2017). De plus, la résistance aux anti-PD-1 chez les patients atteints de mélanome est associée à des défauts dans les voies impliquées dans la signalisation interféron et notamment des mutations sur les protéines JAK1/JAK2 (Zaretsky et al. 2016). La déplétion de LOXL2 semble entraîner une activation de la voie interféron, c'est pour cela qu'il faudrait par la suite vérifier en cytométrie en flux l'expression des ligands PD-L1 et PD-L2.

Grâce à ces observations qui montrent que LOXL2 est identifié comme étant un composant de la MEC associé à une résistance croisée, que son ciblage est déjà envisagé en combinaison avec les anti-PD-1 dans d'autres cancers, et que sa déplétion induit la voie interféron impliquée dans la réponse aux anti-PD-1, il serait très important d'étudier la contribution de LOXL2 dans la résistance aux immunothérapies dans le mélanome cutané. Pour cela, nous pourrions utiliser un modèle murin syngénique dont nous disposons au laboratoire. Nos précédentes études montrent que les cellules primaires de mélanome murin syngénique Yumm1.7 ($BRAF^{V600E/WT}$ $PTEN^{-/-}$ $CDKN2^{-/-}$) subissent une reprogrammation biomécanique associée à une réaction profibrotique en réponse aux thérapies ciblées (Diazi et al. 2022). Cela pourrait être un modèle intéressant pour étudier la résistance croisée entre les thérapies ciblées et les immunothérapies. Nous pourrions alors envisager d'analyser dans ce modèle murin syngénique, après échappement aux thérapies ciblées, l'effet du ciblage de LOXL2 dans la réponse aux anti-PD-1 et le recrutement des cellules immunitaires. Ces prochaines expériences nous permettront ainsi de mieux comprendre la contribution de LOXL2 dans les phénomènes de résistance aux traitements actuels, et de définir la meilleure stratégie d'action pour développer LOXL2 en tant que cible thérapeutique pour les patients atteints d'un mélanome métastatique.

Conclusion

Le mélanome cutané est un cancer de la peau agressif de par son extrême plasticité créant ainsi une hétérogénéité intra-tumorale importante, responsable des métastases et des récives. Aujourd'hui de nouveaux traitements sont proposés comme les thérapies combinant un inhibiteur de BRAF (BRAFi) et MEK (MEKi) pour cibler la voie oncogénique BRAF^{V600}, et les immunothérapies. Cependant, ces traitements sont limités à des sous-groupes de patients et les rechutes sont fréquentes. En réponse aux signaux du microenvironnement, les cellules de mélanome adoptent différents états phénotypiques associés à une expression différentielle de marqueurs de différenciation et mésenchymaux et à l'acquisition de propriétés tumorales différentes. La reprogrammation vers un phénotype cellulaire dédifférencié (MITF^{low}/AXL^{high}) peut être induite par les thérapies ciblées elles-mêmes, et contribue à l'échappement thérapeutique. Comprendre les processus moléculaires impliqués dans la plasticité et la diversité fonctionnelle des cellules de mélanome reste un défi important dans les recherches sur ce cancer et permettra de lutter contre la transition phénotypique mésenchymale responsable des phénomènes de résistance aux traitements et des rechutes observées.

L'évolution cancéreuse est influencée par des altérations des propriétés biochimiques et biophysiques du stroma environnant. Il est reconnu qu'une augmentation des dépôts de collagène et de la réticulation des fibres rigidifie la tumeur, promeut la progression maligne et protège des thérapies. Les travaux du laboratoire portent sur la mécanobiologie des mélanomes et sur le rôle de la matrice extracellulaire (MEC) dans la résistance aux traitements et ont permis de montrer que les cellules de mélanome s'adaptent aux thérapies ciblées par le biais d'une reprogrammation biomécanique impliquant une boucle de signalisation autocrine et d'un remodelage matriciel pro-fibrotique. Dans ce contexte, nous avons récemment révélé une accumulation de LOXL2, une enzyme d'assemblage du collagène dans la MEC des tumeurs en réponse aux thérapies ciblées mais aussi, dans la matrice des cellules dédifférenciées résistantes. Mon projet de thèse visait alors à étudier le rôle de LOXL2 dans la diversité phénotypique des cellules de mélanome ainsi que dans les propriétés de la MEC au sein du microenvironnement tumoral.

Dans un premier temps, j'ai montré que LOXL2 est préférentiellement exprimé par les cellules dédifférenciées MITF^{low}/AXL^{high}, résistantes aux thérapies ciblées et présentant une signature mésenchymateuse et matricielle. Nous avons mis en évidence sa régulation par les facteurs de transcription de la plasticité tumorale MITF et ZEB1 et son induction par la combinaison BRAFi/MEKi et l'hypoxie, connues pour induire la transition vers un phénotype dédifférencié mésenchymal. De manière intéressante, l'inhibition de la voie de survie alternative PDGFR β /AKT conduit à une diminution de LOXL2 et empêche son induction sous thérapie ciblée. Au niveau fonctionnel, la protéine LOXL2 est impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine, et dans l'acquisition de propriétés migratoires, invasives et métastatiques des cellules dédifférenciées de mélanome. Au-delà de ce nouveau rôle intracellulaire dans la migration, LOXL2 influence aussi le réseau matriciel de la tumeur. En effet, LOXL2 permet aux cellules de mélanome de produire une MEC plus organisée et dense. Nous avons également identifié la protéine PAI-2 comme un effecteur potentiel de LOXL2 dans les mélanomes. Nous avons ainsi révélé que LOXL2 est un marqueur important de la sous-population dédifférencié, et que son expression permet le maintien des propriétés mésenchymales de ces cellules.

Dans un deuxième temps, nous avons observé que LOXL2 est aussi exprimé au sein des cellules stromales et plus particulièrement dans les fibroblastes activés et les CAF (ou MAF), et joue un rôle important dans leurs propriétés contractiles, et leur capacité de déposer de la MEC. En effet, la déplétion ou l'inhibition de LOXL2 altère la contractilité des MAF et entraîne une diminution de l'alignement des fibres de collagène, de fibronectine et d'élastine. Cette perte d'alignement altère la motilité des cellules tumorales, suggérant que LOXL2 joue un rôle dans le dialogue entre le mélanome et le stroma matriciel. Sur la base de ces données identifiant une fonction à la fois tumorale et stromale de LOXL2, nous pouvons penser que la production de LOXL2 par les cellules de mélanome ainsi que sa présence dans la MEC produite par les MAF influence la transition vers un phénotype plus invasif et agressif.

Ces travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la plasticité cellulaire des mélanomes en lien avec LOXL2, et son implication dans le dialogue entre la tumeur et son microenvironnement. De façon originale, nous avons pu mettre en évidence un double rôle de LOXL2 dans le mélanome cutané, à la fois intracellulaire dans le maintien des propriétés invasives et métastatiques des cellules dédifférenciées de mélanome, mais aussi extracellulaire dans la réticulation et l'organisation de la MEC produite par les cellules stromales et tumorales. Ces données identifient LOXL2 comme nouvelle cible thérapeutique potentielle, et permettent de proposer de nouvelles pistes et stratégies thérapeutiques afin de cibler le remodelage matriciel et ainsi normaliser la réponse fibrotique des tumeurs, mais aussi les cellules cancéreuses, et plus particulièrement la sous-population cellulaire dédifférenciée reconnue comme agressive et résistante aux traitements actuels.

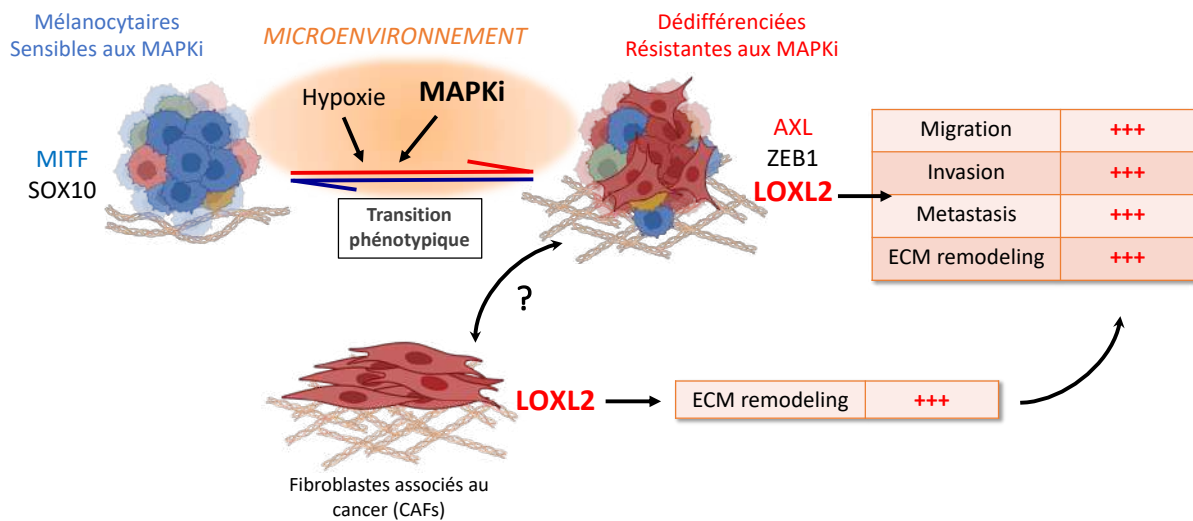


Figure 1 : Modèle proposé du rôle tumoral et stromal de LOXL2 dans le mélanome cutané

En réponse aux signaux du microenvironnement comme l'hypoxie ou aux pressions thérapeutiques comme les thérapies ciblées (MAPKi), les cellules de mélanome transitent d'un état mélanocytaire à des états dédifférenciés associés à une expression accrue de marqueurs mésenchymateux et résistants aux traitements. Le phénotype dédifférencié mésenchymal est associé à une forte expression de l'enzyme LOXL2 dont nous avons montré un rôle important dans le maintien des propriétés migratoires, invasives, métastatiques ainsi que de remodelage de la matrice extracellulaire. De façon intéressante, nous avons mis évidence un rôle de LOXL2 exprimé par les fibroblastes associés au cancer (CAFs) dans le remodelage matriciel du stroma tumoral. Ce remodelage matriciel peut d'ailleurs favoriser la migration des cellules de mélanome, traduisant un potentiel rôle de LOXL2 dans le dialogue entre les cellules de mélanome et leur microenvironnement. Nous proposons que LOXL2 pourrait être une cible intéressante pour diminuer le caractère agressif des cellules dédifférenciées de mélanome cutané et pourrait ainsi constituer une nouvelle approche thérapeutique prometteuse.

Bibliographie

Acerbi, I., L. Cassereau, I. Dean, Q. Shi, A. Au, C. Park, Y. Y. Chen, J. Liphardt, E. S. Hwang, et V. M. Weaver. 2015. « Human Breast Cancer Invasion and Aggression Correlates with ECM Stiffening and Immune Cell Infiltration ». *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 7 (10): 1120-34. <https://doi.org/10.1039/c5ib00040h>.

Ackermann, Julien, Manon Frutschi, Kostas Kaloulis, Thomas McKee, Andreas Trumpp, et Friedrich Beermann. 2005. « Metastasizing Melanoma Formation Caused by Expression of Activated N-RasQ61K on an INK4a-Deficient Background ». *Cancer Research* 65 (10): 4005-11. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2970>.

Ahmed, Farzana, et Nikolas K. Haass. 2018. « Microenvironment-Driven Dynamic Heterogeneity and Phenotypic Plasticity as a Mechanism of Melanoma Therapy Resistance ». *Frontiers in Oncology* 8 (mai): 173. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00173>.

Ahn, Sung Gwe, Seung Myung Dong, Akira Oshima, Woo Ho Kim, Hak Min Lee, Seung Ah Lee, Seung-Hyun Kwon, et al. 2013. « LOXL2 Expression Is Associated with Invasiveness and Negatively Influences Survival in Breast Cancer Patients ». *Breast Cancer Research and Treatment* 141 (1): 89-99. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2662-3>.

Ahn, Sung Yong. 2020. « The Role of MSCs in the Tumor Microenvironment and Tumor Progression ». *Anticancer Research* 40 (6): 3039-47. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14284>.

Albregues, Jean, Thomas Bertero, Eloise Grasset, Stephanie Bonan, Majdi Maiel, Isabelle Bourget, Claude Philippe, et al. 2015. « Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts ». *Nature Communications* 6 (décembre): 10204. <https://doi.org/10.1038/ncomms10204>.

Albregues, Jean, Isabelle Bourget, Catherine Pons, Vincent Butet, Paul Hofman, Sophie Tartare-Deckert, Chloe C. Feral, Guerrino Meneguzzi, et Cedric Gaggioli. 2014. « LIF Mediates Proinvasive Activation of Stromal Fibroblasts in Cancer ». *Cell Reports* 7 (5): 1664-78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.036>.

Albregues, Jean, Mario A. Shields, David Ng, Chun Gwon Park, Alexandra Ambrico, Morgan E. Poindexter, Priya Upadhyay, et al. 2018. « Neutrophil Extracellular Traps Produced during Inflammation Awaken Dormant Cancer Cells in Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 361 (6409): eaao4227. <https://doi.org/10.1126/science.aao4227>.

Alford, Andrea I., et Kurt D. Hankenson. 2006. « Matricellular Proteins: Extracellular Modulators of Bone Development, Remodeling, and Regeneration ». *Bone* 38 (6): 749-57. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.11.017>.

Alitalo, Kari. 2011. « The Lymphatic Vasculature in Disease ». *Nature Medicine* 17 (11): 1371-80. <https://doi.org/10.1038/nm.2545>.

Almacellas-Rabaiget, Olga, Paola Monaco, Juan Huertas-Martinez, Silvia García-Monclús, Mariona Chicón-Bosch, Susana Maqueda-Marcos, Isabel Fabra-Heredia, et al. 2020a. « LOXL2 Promotes Oncogenic Progression in Alveolar Rhabdomyosarcoma Independently of Its Catalytic Activity ». *Cancer Letters* 474 (avril): 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.040>.

Andersen, Lone B., Jane W. Fountain, David H. Gutmann, Susan A. Tarlé, Thomas W. Glover, Nicholas C. Dracopoli, David E. Housman, et Francis S. Collins. 1993. « Mutations in the Neurofibromatosis 1 Gene in Sporadic Malignant Melanoma Cell Lines ». *Nature Genetics* 3 (2): 118-21. <https://doi.org/10.1038/ng0293-118>.

Annes, Justin P., John S. Munger, et Daniel B. Rifkin. 2003. « Making Sense of Latent TGFbeta Activation ».

Journal of Cell Science 116 (Pt 2): 217-24. <https://doi.org/10.1242/jcs.00229>.

Armulik, Annika, Guillem Genové, et Christer Betsholtz. 2011. « Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises ». *Developmental Cell* 21 (2): 193-215. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>.

Arnold, James N., Lukasz Magiera, Matthew Kraman, et Douglas T. Fearon. 2014. « Tumoral Immune Suppression by Macrophages Expressing Fibroblast Activation Protein-Alpha and Heme Oxygenase-1 ». *Cancer immunology research* 2 (2): 121-26. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0150>.

Arozarena, Imanol, et Claudia Wellbrock. 2019. « Phenotype Plasticity as Enabler of Melanoma Progression and Therapy Resistance ». *Nature Reviews. Cancer* 19 (7): 377-91. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0154-4>.

Atkins, Michael B., Sandra J. Lee, Bartosz Chmielowski, Ahmad A. Tarhini, Gary I. Cohen, Thach-Giao Truong, Helen H. Moon, et al. 2023. « Combination Dabrafenib and Trametinib Versus Combination Nivolumab and Ipilimumab for Patients With Advanced BRAF-Mutant Melanoma: The DREAMseq Trial-ECOG-ACRIN EA6134 ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 41 (2): 186-97. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.01763>.

Aumailley, Monique. 2013. « The Laminin Family ». *Cell Adhesion & Migration* 7 (1): 48-55. <https://doi.org/10.4161/cam.22826>.

Bader, Andreas G., Sohye Kang, et Peter K. Vogt. 2006. « Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (5): 1475-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510857103>.

Bai, X., et K. T. Flaherty. 2021. « Targeted and Immunotherapies in BRAF Mutant Melanoma: Where We Stand and What to Expect ». *The British Journal of Dermatology* 185 (2): 253-62. <https://doi.org/10.1111/bjd.19394>.

Bais, Manish V., Gokhan Baris Ozdener, Gail E. Sonenshein, et Philip C. Trackman. 2015. « Effects of Tumor Suppressor Lysyl Oxidase Propeptide on Prostate Cancer Xenograft Growth and Its Direct Interactions with DNA Repair Pathways ». *Oncogene* 34 (15): 1928-37. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.147>.

Balkwill, Frances R., Melania Capasso, et Thorsten Hagemann. 2012. « The tumor microenvironment at a glance ». *Journal of Cell Science* 125 (23): 5591-96. <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>.

Ballester, Beatriz, Javier Milara, et Julio Cortijo. 2019. « Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer: Mechanisms and Molecular Targets ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (3): 593. <https://doi.org/10.3390/ijms20030593>.

Barker, Holly E., Demelza Bird, Georgina Lang, et Janine T. Erler. 2013. « Tumor-Secreted LOXL2 Activates Fibroblasts through FAK Signaling ». *Molecular Cancer Research: MCR* 11 (11): 1425-36. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0033-T>.

Barker, Holly E., Joan Chang, Thomas R. Cox, Georgina Lang, Demelza Bird, Monica Nicolau, Holly R. Evans, Alison Gartland, et Janine T. Erler. 2011. « LOXL2-Mediated Matrix Remodeling in Metastasis and Mammary Gland Involution ». *Cancer Research* 71 (5): 1561-72. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2868>.

Barker, Holly E., Thomas R. Cox, et Janine T. Erler. 2012. « The Rationale for Targeting the LOX Family in Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 12 (8): 540-52. <https://doi.org/10.1038/nrc3319>.

Bastian, Boris C. 2014. « The Molecular Pathology of Melanoma: An Integrated Taxonomy of Melanocytic Neoplasia ». *Annual Review of Pathology* 9: 239-71. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104658>.

Beaumont, Kimberley A., Sri L. Shekar, Richard A. Newton, Michael R. James, Jennifer L. Stow, David L. Duffy, et Richard A. Sturm. 2007. « Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlations for MC1R variant alleles ». *Human Molecular Genetics* 16 (18): 2249-60. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm177>.

Beiter, Katharina, Elke Hiendlmeyer, Thomas Brabletz, Falk Hlubek, Angela Haynl, Claudia Knoll, Thomas Kirchner, et Andreas Jung. 2005. « β -Catenin Regulates the Expression of Tenascin-C in Human Colorectal Tumors ». *Oncogene* 24 (55): 8200-8204. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208960>.

Bennett, D. C. 1983. « Differentiation in Mouse Melanoma Cells: Initial Reversibility and an on-off Stochastic Model ». *Cell* 34 (2): 445-53. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90378-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90378-1).

Benson, Al B., Zev A. Wainberg, J. Randolph Hecht, Dmitry Vyushkov, Hua Dong, Johanna Bendell, et Fred Kudrik. 2017. « A Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Simtuzumab or Placebo in Combination with Gemcitabine for the First-Line Treatment of Pancreatic Adenocarcinoma ». *The Oncologist* 22 (3): 241-e15. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0024>.

Berestjuk, Ilona, Margaux Lecacheur, Alexandrine Carminati, Serena Diazzi, Christopher Rovera, Virginie Prod'homme, Mickael Ohanna, et al. 2022. « Targeting Discoidin Domain Receptors DDR1 and DDR2 Overcomes Matrix-Mediated Tumor Cell Adaptation and Tolerance to BRAF-Targeted Therapy in Melanoma ». *EMBO Molecular Medicine* 14 (2): e11814. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911814>.

Berking, C., R. Takemoto, H. Schaidler, L. Showe, K. Satyamoorthy, P. Robbins, et M. Herlyn. 2001. « Transforming Growth Factor-Beta1 Increases Survival of Human Melanoma through Stroma Remodeling ». *Cancer Research* 61 (22): 8306-16.

Bevona, Caroline, William Goggins, Timothy Quinn, Julie Fullerton, et Hensin Tsao. 2003. « Cutaneous Melanomas Associated with Nevi ». *Archives of Dermatology* 139 (12): 1620-24; discussion 1624. <https://doi.org/10.1001/archderm.139.12.1620>.

Bhatia, Shailender, Scott S. Tykodi, et John A. Thompson. 2009. « Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview ». *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 23 (6): 488.

Bignon, Marine, Cathy Pichol-Thievend, Julie Hardouin, Marilyne Malbouyres, Nicolas Bréchet, Luiz Nasciutti, Alain Barret, et al. 2011. « Lysyl Oxidase-like Protein-2 Regulates Sprouting Angiogenesis and Type IV Collagen Assembly in the Endothelial Basement Membrane ». *Blood* 118 (14): 3979-89. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-313296>.

Bissell, Mina J., et Derek Radisky. 2001. « Putting Tumours in Context ». *Nature Reviews Cancer* 1 (1): 46-54. <https://doi.org/10.1038/35094059>.

Biswas, Subhra K., Lisa Gangi, Saki Paul, Tiziana Schioppa, Alessandra Saccani, Marina Sironi, Barbara Bottazzi, et al. 2006. « A Distinct and Unique Transcriptional Program Expressed by Tumor-Associated Macrophages (Defective NF-kappaB and Enhanced IRF-3/STAT1 Activation) ». *Blood* 107 (5): 2112-22. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0428>.

Bittner, M., P. Meltzer, Y. Chen, Y. Jiang, E. Seftor, M. Hendrix, M. Radmacher, et al. 2000. « Molecular Classification of Cutaneous Malignant Melanoma by Gene Expression Profiling ». *Nature* 406 (6795): 536-40. <https://doi.org/10.1038/35020115>.

Blum, David, Samuel LaBarge, et Reproducibility Project: Cancer Biology. 2014. « Registered Report: Tumour Micro-Environment Elicits Innate Resistance to RAF Inhibitors through HGF Secretion ». *eLife* 3 (décembre): e04034. <https://doi.org/10.7554/eLife.04034>.

Boer, Magdalena, Ewa Duchnik, Romuald Maleszka, et Mariola Marchlewicz. 2016. « Structural and Biophysical Characteristics of Human Skin in Maintaining Proper Epidermal Barrier Function ». *Postepy Dermatologii I Alergologii* 33 (1): 1-5. <https://doi.org/10.5114/pdia.2015.48037>.

- Böhme, Ines, et Anja Bosserhoff. 2020. « Extracellular Acidosis Triggers a Senescence-like Phenotype in Human Melanoma Cells ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 33 (1): 41-51. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12811>.
- Bonanno, E., M. Iurlaro, J. A. Madri, et R. F. Nicosia. 2000. « Type IV Collagen Modulates Angiogenesis and Neovessel Survival in the Rat Aorta Model ». *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 36 (5): 336-40. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2000\)036<0336:TICMAA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2000)036<0336:TICMAA>2.0.CO;2).
- Bondareva, Alla, Charlene M. Downey, Fabio Ayres, Wei Liu, Steven K. Boyd, Benedikt Hallgrímsson, et Frank R. Jirik. 2009. « The Lysyl Oxidase Inhibitor, β -Aminopropionitrile, Diminishes the Metastatic Colonization Potential of Circulating Breast Cancer Cells ». *PLoS ONE* 4 (5): e5620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005620>.
- Boon, Thierry, Pierre G. Coulie, Benoît J. Van den Eynde, et Pierre van der Bruggen. 2006. « Human T Cell Responses against Melanoma ». *Annual Review of Immunology* 24: 175-208. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090733>.
- Boshuizen, Julia, Louise A. Koopman, Oscar Krijgsman, Aida Shahrabi, Elke Gresnigt- van den Heuvel, Maarten A. Ligtenberg, David W. Vredevoogd, et al. 2018. « Cooperative Targeting of Melanoma Heterogeneity with an AXL Antibody-Drug Conjugate and BRAF/MEK Inhibitors ». *Nature Medicine* 24 (2): 203-12. <https://doi.org/10.1038/nm.4472>.
- Boufraquech, Myriem, Lisa Zhang, Naris Nilubol, Samira M. Sadowski, Shweta Kotian, Martha Quezado, et Electron Kebebew. 2016. « Lysyl Oxidase (LOX) Transcriptionally Regulates SNAI2 Expression and TIMP4 Secretion in Human Cancers ». *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22 (17): 4491-4504. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2461>.
- Bradshaw, Amy D., Pauli Puolakkainen, Thomas N. Wight, E. Helene Sage, Jayasri Dasgupta, et Jeffrey M. Davidson. 2003. « SPARC-Null Mice Display Abnormalities in the Dermis Characterized by Decreased Collagen Fibril Diameter and Reduced Tensile Strength ». *Journal of Investigative Dermatology* 120 (6): 949-55. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12241.x>.
- Brand, Almut, Katrin Singer, Gudrun E. Koehl, Marlene Kolitzus, Gabriele Schoenhammer, Annette Thiel, Carina Matos, et al. 2016. « LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells ». *Cell Metabolism* 24 (5): 657-71. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.011>.
- Brandman, Onn, et Tobias Meyer. 2008. « Feedback Loops Shape Cellular Signals in Space and Time ». *Science (New York, N.Y.)* 322 (5900): 390-95. <https://doi.org/10.1126/science.1160617>.
- Brennen, W. Nathaniel, John T. Isaacs, et Samuel R. Denmeade. 2012. « Rationale Behind Targeting Fibroblast Activation Protein–Expressing Carcinoma-Associated Fibroblasts as a Novel Chemotherapeutic Strategy ». *Molecular cancer therapeutics* 11 (2): 257-66. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0340>.
- Brichkina, Anna, Thomas Bertero, Hui Mun Loh, Nguyet Thi Minh Nguyen, Alexander Emelyanov, Sidwell Rigade, Marius Ilie, Paul Hofman, Cedric Gaggioli, et Dmitry V. Bulavin. 2016. « p38MAPK Builds a Hyaluronan Cancer Niche to Drive Lung Tumorigenesis ». *Genes & Development* 30 (23): 2623-36. <https://doi.org/10.1101/gad.290346.116>.
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmund, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis, et M. E. Greenberg. 1999. « Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor ». *Cell* 96 (6): 857-68. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80595-4).
- Bucheit, Amanda D., Erica Syklawer, John A. Jakob, Roland L. Bassett, Jonathan L. Curry, Jeffrey E. Gershenwald, Kevin B. Kim, Patrick Hwu, Alexander J. Lazar, et Michael A. Davies. 2013. « Clinical Characteristics and Outcomes with Specific BRAF and NRAS Mutations in Patients with Metastatic Melanoma ». *Cancer* 119 (21): 3821-29. <https://doi.org/10.1002/cncr.28306>.

- Campbell, Daniel J., et Meghan A. Koch. 2011. « Treg Cells: Patrolling a Dangerous Neighborhood ». *Nature Medicine* 17 (8): 929-30. <https://doi.org/10.1038/nm.2433>.
- Camps, J. L., S. M. Chang, T. C. Hsu, M. R. Freeman, S. J. Hong, H. E. Zhau, A. C. von Eschenbach, et L. W. Chung. 1990. « Fibroblast-Mediated Acceleration of Human Epithelial Tumor Growth in Vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (1): 75-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.1.75>.
- Cano, Amparo, Patricia G. Santamaría, et Gema Moreno-Bueno. 2012. « LOXL2 in Epithelial Cell Plasticity and Tumor Progression ». *Future Oncology (London, England)* 8 (9): 1095-1108. <https://doi.org/10.2217/fon.12.105>.
- Caramel, Julie, Eftychios Papadogeorgakis, Louise Hill, Gareth J. Browne, Geoffrey Richard, Anne Wierinckx, Gerald Saldanha, et al. 2013. « A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma ». *Cancer Cell* 24 (4): 466-80. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.018>.
- Carbone, Michele, Laura Korb Ferris, Francine Baumann, Andrea Napolitano, Christopher A. Lum, Erin G. Flores, Giovanni Gaudino, et al. 2012. « BAP1 Cancer Syndrome: Malignant Mesothelioma, Uveal and Cutaneous Melanoma, and MBAITs ». *Journal of Translational Medicine* 10 (août): 179. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-179>.
- Carmeliet, Peter, et Rakesh K. Jain. 2011. « Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis ». *Nature* 473 (7347): 298-307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>.
- Carreira, Suzanne, Jane Goodall, Isil Aksan, S. Anna La Rocca, Marie-Dominique Galibert, Laurence Denat, Lionel Larue, et Colin R. Goding. 2005. « Mitf Cooperates with Rb1 and Activates p21Cip1 Expression to Regulate Cell Cycle Progression ». *Nature* 433 (7027): 764-69. <https://doi.org/10.1038/nature03269>.
- 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 Dial Controls Melanoma Proliferation and Invasiveness ». *Genes & Development* 20 (24): 3426-39. <https://doi.org/10.1101/gad.406406>.
- Cawston, Tim E., et David A. Young. 2010. « Proteinases Involved in Matrix Turnover during Cartilage and Bone Breakdown ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 221-35. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0887-6>.
- Cebrià-Costa, J. P., L. Pascual-Reguant, A. Gonzalez-Perez, G. Serra-Bardenys, J. Querol, M. Cosín, G. Verde, et al. 2020. « LOXL2-Mediated H3K4 Oxidation Reduces Chromatin Accessibility in Triple-Negative Breast Cancer Cells ». *Oncogene* 39 (1): 79-121. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0969-1>.
- Chang, Joan, Morghan C. Lucas, Lidia E. Leonte, Marc Garcia-Montolio, Lukram Babloo Singh, Alison D. Findlay, Mandar Deodhar, et al. 2017. « Pre-Clinical Evaluation of Small Molecule LOXL2 Inhibitors in Breast Cancer ». *Oncotarget* 8 (16): 26066-78. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15257>.
- Chapman, Paul B., Axel Hauschild, Caroline Robert, John B. Haanen, Paolo Ascierto, James Larkin, Reinhard Dummer, et al. 2011. « Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation ». *The New England Journal of Medicine* 364 (26): 2507-16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>.
- Chauhan, D., S. Kharbanda, A. Ogata, M. Urashima, G. Teoh, M. Robertson, D. W. Kufe, et K. C. Anderson. 1997. « Interleukin-6 Inhibits Fas-Induced Apoptosis and Stress-Activated Protein Kinase Activation in Multiple Myeloma Cells ». *Blood* 89 (1): 227-34.
- Cheli, Y., S. Giuliano, T. Botton, S. Rocchi, V. Hofman, P. Hofman, P. Bahadoran, C. Bertolotto, et R. Ballotti. 2011. « Mitf Is the Key Molecular Switch between Mouse or Human Melanoma Initiating Cells and Their Differentiated Progeny ». *Oncogene* 30 (20): 2307-18. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.598>.

- 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>.
- Cheli, Yann, Mickael Ohanna, Robert Ballotti, et Corine Bertolotto. 2010. « Fifteen-Year Quest for Microphthalmia-Associated Transcription Factor Target Genes ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 23 (1): 27-40. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00653.x>.
- Chen, WanJun, Wenwen Jin, Neil Hardegen, Ke-Jian Lei, Li Li, Nancy Marinos, George McGrady, et Sharon M. Wahl. 2003. « Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF-Beta Induction of Transcription Factor Foxp3 ». *The Journal of Experimental Medicine* 198 (12): 1875-86. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>.
- Chen, Yang, Li-Xia He, Jin-Ling Chen, Xin Xu, Juan-Juan Wang, Xiu-Hui Zhan, Ji-Wei Jiao, Geng Dong, En-Min Li, et Li-Yan Xu. 2022. « L2Δ13, a Splicing Isoform of Lysyl Oxidase-like 2, Causes Adipose Tissue Loss via the Gut Microbiota and Lipid Metabolism ». *iScience* 25 (9): 104894. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104894>.
- Chitty, Jessica L., Michelle Yam, Lara Perryman, Amelia L. Parker, Joanna N. Skhinas, Yordanos F. I. Setargew, Ellie T. Y. Mok, et al. 2023. « A First-in-Class Pan-Lysyl Oxidase Inhibitor Impairs Stromal Remodeling and Enhances Gemcitabine Response and Survival in Pancreatic Cancer ». *Nature Cancer* 4 (9): 1326-44. <https://doi.org/10.1038/s43018-023-00614-y>.
- Choi, Jae Young, Yeon Soo Jang, Sun Young Min, et Jeong Yoon Song. 2011. « Overexpression of MMP-9 and HIF-1α in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions ». *Journal of Breast Cancer* 14 (2): 88-95. <https://doi.org/10.4048/jbc.2011.14.2.88>.
- Choi, Sul Ki, Hoe Suk Kim, Tiefeng Jin, et Woo Kyung Moon. 2017. « LOXL4 Knockdown Enhances Tumor Growth and Lung Metastasis through Collagen-Dependent Extracellular Matrix Changes in Triple-Negative Breast Cancer ». *Oncotarget* 8 (7): 11977-89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14450>.
- Chu, Tang-Yuan, June-Ting Yang, Tien-Hung Huang, et Hwan-Wun Liu. 2014. « Crosstalk with Cancer-Associated Fibroblasts Increases the Growth and Radiation Survival of Cervical Cancer Cells ». *Radiation Research* 181 (5): 540-47. <https://doi.org/10.1667/RR13583.1>.
- Clark, W. H., L. From, E. A. Bernardino, et M. C. Mihm. 1969. « The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin ». *Cancer Research* 29 (3): 705-27.
- Coffelt, Seth B., Max D. Wellenstein, et Karin E. de Visser. 2016. « Neutrophils in Cancer: Neutral No More ». *Nature Reviews Cancer* 16 (7): 431-46. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.52>.
- Condeelis, John, et Jeffrey W. Pollard. 2006. « Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis ». *Cell* 124 (2): 263-66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.007>.
- Cooke, Vesselina G., Valerie S. LeBleu, Doruk Keskin, Zainab Khan, Joyce T. O'Connell, Yingqi Teng, Michael B. Duncan, et al. 2012. « Pericyte Depletion Results in Hypoxia-Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis Mediated by Met Signaling Pathway ». *Cancer Cell* 21 (1): 66-81. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.024>.
- Costa, Ana, Yann Kieffer, Alix Scholer-Dahirel, Floriane Pelon, Brigitte Bourachot, Melissa Cardon, Philemon Sirven, et al. 2018. « Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer ». *Cancer Cell* 33 (3): 463-479.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011>.
- Cox, Thomas R., Demelza Bird, Ann-Marie Baker, Holly E. Barker, Melisa W-Y. Ho, Georgina Lang, et Janine T. Erler. 2013. « LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis ». *Cancer research* 73 (6): 1721-32. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2233>.

- Cremasco, Viviana, Jillian L. Astarita, Angelo L. Grauel, Shilpa Keerthivasan, Kenzie MacIsaac, Matthew C. Woodruff, Michael Wu, et al. 2018. « FAP Delineates Heterogeneous and Functionally Divergent Stromal Cells in Immune-Excluded Breast Tumors ». *Cancer Immunology Research* 6 (12): 1472-85. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0098>.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, et B. A. Hemmings. 1995. « Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 by Insulin Mediated by Protein Kinase B ». *Nature* 378 (6559): 785-89. <https://doi.org/10.1038/378785a0>.
- Cuevas, Eva P., Gema Moreno-Bueno, Giacomo Canesin, Vanesa Santos, Francisco Portillo, et Amparo Cano. 2014. « LOXL2 Catalytically Inactive Mutants Mediate Epithelial-to-Mesenchymal Transition ». *Biology Open* 3 (2): 129-37. <https://doi.org/10.1242/bio.20146841>.
- Cui, Ximao, Guanghui Wang, Wenbin Shen, Zhenyu Huang, Hailan He, et Long Cui. 2018. « Lysyl Oxidase-like 2 Is Highly Expressed in Colorectal Cancer Cells and Promotes the Development of Colorectal Cancer ». *Oncology Reports* 40 (2): 932-42. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6452>.
- Curtin, John A., Mitchell S. Stark, Daniel Pinkel, Nicholas K. Hayward, et Boris C. Bastian. 2006. « PI3-Kinase Subunits Are Infrequent Somatic Targets in Melanoma ». *The Journal of Investigative Dermatology* 126 (7): 1660-63. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700311>.
- Damiano, J. S., A. E. Cress, L. A. Hazlehurst, A. A. Shtil, et W. S. Dalton. 1999. « Cell Adhesion Mediated Drug Resistance (CAM-DR): Role of Integrins and Resistance to Apoptosis in Human Myeloma Cell Lines ». *Blood* 93 (5): 1658-67.
- Damsky, William E., David P. Curley, Manjula Santhanakrishnan, Lara E. Rosenbaum, James T. Platt, Bonnie E. Gould Rothberg, Makoto M. Taketo, et al. 2011. « β -Catenin Signaling Controls Metastasis in Braf-Activated Pten-Deficient Melanomas ». *Cancer Cell* 20 (6): 741-54. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.030>.
- Dankort, David, David P. Curley, Robert A. Carlidge, Betsy Nelson, Anthony N. Karnezis, William E. Damsky, Mingjian J. You, Ronald A. DePinho, Martin McMahon, et Marcus Bosenberg. 2009. « Braf(V600E) Cooperates with Pten Loss to Induce Metastatic Melanoma ». *Nature Genetics* 41 (5): 544-52. <https://doi.org/10.1038/ng.356>.
- Dantonio, Paola M., Marianne O. Klein, Maria Renata V. B. Freire, Camila N. Araujo, Ana Carolina Chiacetti, et Ricardo G. Correa. 2018. « Exploring Major Signaling Cascades in Melanomagenesis: A Rationale Route for Targetted Skin Cancer Therapy ». *Bioscience Reports* 38 (5): BSR20180511. <https://doi.org/10.1042/BSR20180511>.
- Darby, Ian A, Betty Laverdet, Frédéric Bonté, et Alexis Desmoulière. 2014. « Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing ». *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 7 (novembre): 301-11. <https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>.
- Das Thakur, Meghna, Fernando Salangsang, Allison S. Landman, William R. Sellers, Nancy K. Pryer, Mitchell P. Levesque, Reinhard Dummer, Martin McMahon, et Darrin D. Stuart. 2013. « Modelling Vemurafenib Resistance in Melanoma Reveals a Strategy to Forestall Drug Resistance ». *Nature* 494 (7436): 251-55. <https://doi.org/10.1038/nature11814>.
- Davies, Helen, Graham R. Bignell, Charles Cox, Philip Stephens, Sarah Edkins, Sheila Clegg, Jon Teague, et al. 2002. « Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer ». *Nature* 417 (6892): 949-54. <https://doi.org/10.1038/nature00766>.
- Davies, M. A., K. Stemke-Hale, C. Tellez, T. L. Calderone, W. Deng, V. G. Prieto, A. J. F. Lazar, J. E. Gershenwald, et G. B. Mills. 2008. « A Novel AKT3 Mutation in Melanoma Tumours and Cell Lines ». *British Journal of Cancer* 99 (8): 1265-68. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604637>.
- De Wever, Olivier, Pieter Demetter, Marc Mareel, et Marc Bracke. 2008. « Stromal Myofibroblasts Are

- Drivers of Invasive Cancer Growth ». *International Journal of Cancer* 123 (10): 2229-38. <https://doi.org/10.1002/ijc.23925>.
- De Wever, Olivier, Mieke Van Bockstal, Marc Mareel, An Hendrix, et Marc Bracke. 2014. « Carcinoma-Associated Fibroblasts Provide Operational Flexibility in Metastasis ». *Seminars in Cancer Biology*, Cancer-associated fibroblasts, 25 (avril): 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.009>.
- Debelle, L., et A. J. Alix. 1999. « The Structures of Elastins and Their Function ». *Biochimie* 81 (10): 981-94. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(99\)00221-7](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(99)00221-7).
- Delmas, Audrey, Julia Cherier, Magdalena Pohorecka, Claire Medale-Giamarchi, Nicolas Meyer, Anne Casanova, Olivier Sordet, et al. 2015. « The c-Jun/RHOB/AKT pathway confers resistance of BRAF-mutant melanoma cells to MAPK inhibitors ». *Oncotarget* 6 (17): 15250-64.
- Delmas, Véronique, Friedrich Beermann, Silvia Martinuzzi, Suzanne Carreira, Julien Ackermann, Mayuko Kumasaka, Laurence Denat, et al. 2007. « β -Catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development ». *Genes & Development* 21 (22): 2923-35. <https://doi.org/10.1101/gad.450107>.
- Dennler, S, S Itoh, D Vivien, P ten Dijke, S Huet, et J M Gauthier. 1998. « Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. » *The EMBO Journal* 17 (11): 3091-3100. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.11.3091>.
- Desmoulière, Alexis, Ian A. Darby, et Giulio Gabbiani. 2003. « Normal and Pathologic Soft Tissue Remodeling: Role of the Myofibroblast, with Special Emphasis on Liver and Kidney Fibrosis ». *Laboratory Investigation* 83 (12): 1689-1707. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000101911.53973.90>.
- Dey, Shatovisha, Jason J. Kwon, Sheng Liu, Gabriel A. Hodge, Solaema Taleb, Teresa A. Zimmers, Jun Wan, et Janaiah Kota. 2020. « miR-29a Is Repressed by MYC in Pancreatic Cancer and Its Restoration Drives Tumor-Suppressive Effects via Downregulation of LOXL2 ». *Molecular Cancer Research: MCR* 18 (2): 311-23. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0594>.
- Dharanipragada, Prashanthi, Xiao Zhang, Sixue Liu, Shirley H. Lomeli, Aayoung Hong, Yan Wang, Zhentao Yang, et al. 2023. « Blocking Genomic Instability Prevents Acquired Resistance to MAPK Inhibitor Therapy in Melanoma ». *Cancer Discovery* 13 (4): 880-909. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0787>.
- Dhawan, Punita, Amar B. Singh, Darrel L. Ellis, et Ann Richmond. 2002. « Constitutive Activation of Akt/Protein Kinase B in Melanoma Leads to up-Regulation of Nuclear Factor-kappaB and Tumor Progression ». *Cancer Research* 62 (24): 7335-42.
- Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath, et W. Kolch. 2007. « MAP Kinase Signalling Pathways in Cancer ». *Oncogene* 26 (22): 3279-90. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>.
- Diazzi, Serena, Alberto Baeri, Julien Fassy, Margaux Lecacheur, Oskar Marin-Bejar, Christophe A. Girard, Lauren Lefevre, et al. 2022. « Blockade of the Pro-Fibrotic Reaction Mediated by the miR-143/-145 Cluster Enhances the Responses to Targeted Therapy in Melanoma ». *EMBO Molecular Medicine* 14 (3): e15295. <https://doi.org/10.15252/emmm.202115295>.
- Diazzi, Serena, Sophie Tartare-Deckert, et Marcel Deckert. 2020. « Bad Neighborhood: Fibrotic Stroma as a New Player in Melanoma Resistance to Targeted Therapies ». *Cancers* 12 (6): 1364. <https://doi.org/10.3390/cancers12061364>.
- Diazzi, Serena, Sophie Tartare-Deckert, et Marcel Deckert.. 2023. « The Mechanical Phenotypic Plasticity of Melanoma Cell: An Emerging Driver of Therapy Cross-Resistance ». *Oncogenesis* 12 (1): 7. <https://doi.org/10.1038/s41389-023-00452-8>.

Dinca, Simion C., Daniel Greiner, Keren Weidenfeld, Laura Bond, Dalit Barkan, et Cheryl L. Jorcyk. 2021. « Novel Mechanism for OSM-Promoted Extracellular Matrix Remodeling in Breast Cancer: LOXL2 Upregulation and Subsequent ECM Alignment ». *Breast Cancer Research: BCR* 23 (1): 56. <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01430-x>.

Direkze, Natalie C., Kairbaan Hodivala-Dilke, Rosemary Jeffery, Toby Hunt, Richard Poulson, Dahmane Oukrif, Malcolm R. Alison, et Nicholas A. Wright. 2004. « Bone Marrow Contribution to Tumor-Associated Myofibroblasts and Fibroblasts ». *Cancer Research* 64 (23): 8492-95. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1708>.

Domingues, Beatriz, José Manuel Lopes, Paula Soares, et Helena Pópulo. 2018. « Melanoma treatment in review ». *ImmunoTargets and Therapy* 7 (juin): 35-49. <https://doi.org/10.2147/ITT.S134842>.

Dooley, T. P., R. E. Wilson, N. C. Jones, et I. R. Hart. 1988. « Polyoma Middle T Abrogates TPA Requirement of Murine Melanocytes and Induces Malignant Melanoma ». *Oncogene* 3 (5): 531-35.

Doudican, N. A., et S. J. Orlow. 2017. « Inhibition of the CRAF/Prohibitin Interaction Reverses CRAF-Dependent Resistance to Vemurafenib ». *Oncogene* 36 (3): 423-28. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.214>.

Dranoff, Glenn. 2004. « Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy ». *Nature Reviews Cancer* 4 (1): 11-22. <https://doi.org/10.1038/nrc1252>.

Drobits, Barbara, Martin Holcman, Nicole Amberg, Melissa Swiecki, Roland Grundtner, Martina Hammer, Marco Colonna, et Maria Sibilica. 2012. « Imiquimod Clears Tumors in Mice Independent of Adaptive Immunity by Converting pDCs into Tumor-Killing Effector Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (2): 575-85. <https://doi.org/10.1172/JCI61034>.

Duffy, M. J., et P. O'Grady. 1984. « Plasminogen Activator and Cancer ». *European Journal of Cancer & Clinical Oncology* 20 (5): 577-82. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(84\)90001-4](https://doi.org/10.1016/0277-5379(84)90001-4).

Dumaz, Nicolas, Robert Hayward, Jan Martin, Lesley Ogilvie, Douglas Hedley, John A. Curtin, Boris C. Bastian, Caroline Springer, et Richard Marais. 2006. « In Melanoma, RAS Mutations Are Accompanied by Switching Signaling from BRAF to CRAF and Disrupted Cyclic AMP Signaling ». *Cancer Research* 66 (19): 9483-91. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4227>.

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).

Dummer, Reinhard, Keith T. Flaherty, Caroline Robert, Ana Arance, Jan Willem B. de Groot, Claus Garbe, Helen J. Gogas, et al. 2022. « COLUMBUS 5-Year Update: A Randomized, Open-Label, Phase III Trial of Encorafenib Plus Binimetinib Versus Vemurafenib or Encorafenib in Patients With BRAF V600-Mutant Melanoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 40 (36): 4178-88. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02659>.

Dummer, Reinhard, Celeste Lebbé, Victoria Atkinson, Mario Mandalà, Paul D. Nathan, Ana Arance, Erika Richtig, et al. 2020. « Combined PD-1, BRAF and MEK Inhibition in Advanced BRAF-Mutant Melanoma: Safety Run-in and Biomarker Cohorts of COMBI-i ». *Nature Medicine* 26 (10): 1557-63. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1082-2>.

Dupont, Sirio, Leonardo Morsut, Mariaceleste Aragona, Elena Enzo, Stefano Giulitti, Michelangelo Cordenonsi, Francesca Zanconato, et al. 2011. « Role of YAP/TAZ in Mechanotransduction ». *Nature* 474 (7350): 179-83. <https://doi.org/10.1038/nature10137>.

Egeblad, Mikala, Morten G. Rasch, et Valerie M. Weaver. 2010a. « Dynamic Interplay between the Collagen Scaffold and Tumor Evolution ». *Current Opinion in Cell Biology* 22 (5): 697-706. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.015>.

Eggermont, Alexander M. M., et John M. Kirkwood. 2004. « Re-Evaluating the Role of Dacarbazine in

Metastatic Melanoma: What Have We Learned in 30 Years? » *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 40 (12): 1825-36. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.04.030>.

Eisen, T., T. Ahmad, K. T. Flaherty, M. Gore, S. Kaye, R. Marais, I. Gibbens, et al. 2006. « Sorafenib in Advanced Melanoma: A Phase II Randomised Discontinuation Trial Analysis ». *British Journal of Cancer* 95 (5): 581-86. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603291>.

Elenbaas, B., et R. A. Weinberg. 2001. « Heterotypic Signaling between Epithelial Tumor Cells and Fibroblasts in Carcinoma Formation ». *Experimental Cell Research* 264 (1): 169-84. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5133>.

Engelman, Jeffrey A. 2009. « Targeting PI3K Signalling in Cancer: Opportunities, Challenges and Limitations ». *Nature Reviews Cancer* 9 (8): 550-62. <https://doi.org/10.1038/nrc2664>.

Erler, Janine T., Kevin L. Bennewith, Thomas R. Cox, Georgina Lang, Demelza Bird, Albert Koong, Quynh-Thu Le, et Amato J. Giaccia. 2009. « Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the pre-metastatic niche ». *Cancer cell* 15 (1): 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.012>.

Erler, Janine T., et Valerie M. Weaver. 2009. « Three-dimensional context regulation of metastasis ». *Clinical & experimental metastasis* 26 (1): 35-49. <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9209-8>.

Ezzoukhry, Zakaria, Elodie Henriet, Léo Piquet, Kevin Boyé, Paulette Bioulac-Sage, Charles Balabaud, Gabrielle Couchy, Jessica Zucman-Rossi, Violaine Moreau, et Frédéric Saltel. 2016. « TGF- β 1 Promotes Linear Invadosome Formation in Hepatocellular Carcinoma Cells, through DDR1 up-Regulation and Collagen I Cross-Linking ». *European Journal of Cell Biology*, Integrated mechano-chemical signals in invasion, 95 (11): 503-12. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.09.003>.

Falcomatà, Chiara, Stefanie Bärthel, Sebastian A. Widholz, Christian Schneeweis, Juan José Montero, Albulena Toska, Jonas Mir, et al. 2022. « Selective Multi-Kinase Inhibition Sensitizes Mesenchymal Pancreatic Cancer to Immune Checkpoint Blockade by Remodeling the Tumor Microenvironment ». *Nature Cancer* 3 (3): 318-36. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00326-1>.

Fallahi-Sichani, Mohammad, Verena Becker, Benjamin Izar, Gregory J. Baker, Jia-Ren Lin, Sarah A. Boswell, Parin Shah, Asaf Rotem, Levi A. Garraway, et Peter K. Sorger. 2017. « Adaptive Resistance of Melanoma Cells to RAF Inhibition via Reversible Induction of a Slowly Dividing De-Differentiated State ». *Molecular Systems Biology* 13 (1): 905. <https://doi.org/10.15252/msb.20166796>.

Falletta, Paola, Luis Sanchez-Del-Campo, Jagat Chauhan, Maike 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>.

Fedorenko, I. V., E. V. Abel, J. M. Koomen, B. Fang, E. R. Wood, Y. A. Chen, K. J. Fisher, et al. 2016. « Fibronectin Induction Abrogates the BRAF Inhibitor Response of BRAF V600E/PTEN-Null Melanoma Cells ». *Oncogene* 35 (10): 1225-35. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.188>.

Fedorenko, Inna V., Jennifer A. Wargo, Keith T. Flaherty, Jane L. Messina, et Keiran S.M. Smalley. 2015. « BRAF inhibition generates a host/tumor niche that mediates therapeutic escape ». *The Journal of investigative dermatology* 135 (12): 3115-24. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.329>.

Feig, Christine, James O. Jones, Matthew Kraman, Richard J. B. Wells, Andrew Deonarine, Derek S. Chan, Claire M. Connell, et al. 2013. « Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (50): 20212-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320318110>.

Feige, Erez, Satoru Yokoyama, Carmit Levy, Mehdi Khaled, Vivien Igras, Richard J. Lin, Stephen Lee, et al.

2011. « Hypoxia-Induced Transcriptional Repression of the Melanoma-Associated Oncogene MTF ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (43): E924-933. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106351108>.

Fenouille, N., A. Puissant, M. Tichet, G. Zimniak, P. Abbe, A. Mallavialle, S. Rocchi, et al. 2011. « SPARC Functions as an Anti-Stress Factor by Inactivating P53 through Akt-Mediated MDM2 Phosphorylation to Promote Melanoma Cell Survival ». *Oncogene* 30 (49): 4887-4900. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.198>.

Fenouille, Nina, Mélanie Tichet, Maeva Dufies, Anaïs Pottier, Ariane Mogha, Julia K. Soo, Stéphane Rocchi, et al. 2012. « The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Regulatory Factor SLUG (SNAI2) Is a Downstream Target of SPARC and AKT in Promoting Melanoma Cell Invasion ». *PloS One* 7 (7): e40378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040378>.

Ferguson, Jennifer, Michael Smith, Isabel Zudaire, Claudia Wellbrock, et Imanol Arozarena. 2017. « Glucose Availability Controls ATF4-Mediated MTF Suppression to Drive Melanoma Cell Growth ». *Oncotarget* 8 (20): 32946-59. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16514>.

Fidler, I. J., E. Gruys, M. A. Cifone, Z. Barnes, et C. Bucana. 1981. « Demonstration of Multiple Phenotypic Diversity in a Murine Melanoma of Recent Origin ». *Journal of the National Cancer Institute* 67 (4): 947-56.

Flach, Edward H., Vito W. Rebecca, Meenhard Herlyn, Keiran S. M. Smalley, et Alexander R. A. Anderson. 2011. « Fibroblasts Contribute to Melanoma Tumor Growth and Drug Resistance ». *Molecular Pharmaceutics* 8 (6): 2039-49. <https://doi.org/10.1021/mp200421k>.

Flaherty, Keith T., Igor Puzanov, Kevin B. Kim, Antoni Ribas, Grant A. McArthur, Jeffrey A. Sosman, Peter J. O'Dwyer, et al. 2010. « Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma ». *The New England journal of medicine* 363 (9): 809-19. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1002011>.

Flaherty, Keith T., Caroline Robert, Peter Hersey, Paul Nathan, Claus Garbe, Mohammed Milhem, Lev V. Demidov, et al. 2012. « Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 367 (2): 107-14. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203421>.

Folkman, Judah. 2002. « Role of Angiogenesis in Tumor Growth and Metastasis ». *Seminars in Oncology* 29 (6 Suppl 16): 15-18. <https://doi.org/10.1053/sonc.2002.37263>.

Frantz, Christian, Kathleen M. Stewart, et Valerie M. Weaver. 2010. « The extracellular matrix at a glance ». *Journal of Cell Science* 123 (24): 4195-4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.

Fridman, R., G. Giaccone, T. Kanemoto, G. R. Martin, A. F. Gazdar, et J. L. Mulshine. 1990. « Reconstituted Basement Membrane (Matrigel) and Laminin Can Enhance the Tumorigenicity and the Drug Resistance of Small Cell Lung Cancer Cell Lines ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (17): 6698-6702. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.17.6698>.

Fridman, Wolf Herman, Franck Pagès, Catherine Sautès-Fridman, et Jérôme Galon. 2012. « The Immune Contexture in Human Tumours: Impact on Clinical Outcome ». *Nature Reviews Cancer* 12 (4): 298-306. <https://doi.org/10.1038/nrc3245>.

Fu, Chunmei, et Aimin Jiang. 2018. « Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment ». *Frontiers in Immunology* 9: 3059. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03059>.

Fuente, Maria Teresa de la, Benito Casanova, José V. Moyano, Mercedes Garcia-Gila, Laura Sanz, José Garcia-Marco, Augusto Silva, et Angeles Garcia-Pardo. 2002. « Engagement of Alpha4beta1 Integrin by Fibronectin Induces in Vitro Resistance of B Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Fludarabine ». *Journal of Leukocyte Biology* 71 (3): 495-502.

Fukumoto, Ichiro, Naoko Kikkawa, Ryosuke Matsushita, Mayuko Kato, Akira Kurozumi, Rika Nishikawa, Yusuke Goto, et al. 2016. « Tumor-Suppressive microRNAs (miR-26a/b, miR-29a/b/c and miR-218)

- Concertedly Suppressed Metastasis-Promoting LOXL2 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma ». *Journal of Human Genetics* 61 (2): 109-18. <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.120>.
- Fukumura, D., R. Xavier, T. Sugiura, Y. Chen, E. C. Park, N. Lu, M. Selig, et al. 1998. « Tumor Induction of VEGF Promoter Activity in Stromal Cells ». *Cell* 94 (6): 715-25. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81731-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81731-6).
- Gaggioli, Cedric, Steven Hooper, Cristina Hidalgo-Carcedo, Robert Grosse, John F. Marshall, Kevin Harrington, et Erik Sahai. 2007. « Fibroblast-Led Collective Invasion of Carcinoma Cells with Differing Roles for RhoGTPases in Leading and Following Cells ». *Nature Cell Biology* 9 (12): 1392-1400. <https://doi.org/10.1038/ncb1658>.
- Gaggioli, Cédric, Guillaume Robert, Corine Bertolotto, Olivier Bailet, Patricia Abbe, Anne Spadafora, Philippe Bahadoran, et al. 2007a. « Tumor-Derived Fibronectin Is Involved in Melanoma Cell Invasion and Regulated by V600E B-Raf Signaling Pathway ». *Journal of Investigative Dermatology* 127 (2): 400-410. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700524>.
- Gandini, Sara, Francesco Sera, Maria Sofia Cattaruzza, Paolo Pasquini, Roberto Zanetti, Cinzia Masini, Peter Boyle, et Carmelo Francesco Melchi. 2005. « Meta-Analysis of Risk Factors for Cutaneous Melanoma: III. Family History, Actinic Damage and Phenotypic Factors ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 41 (14): 2040-59. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.03.034>.
- Gao, Jianjun, Lewis Zhichang Shi, Hao Zhao, Jianfeng Chen, Liangwen Xiong, Qiuming He, Tenghui Chen, et al. 2016. « Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy ». *Cell* 167 (2): 397-404.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.069>.
- Garcia-Diaz, Angel, Daniel Sanghoon Shin, Blanca Homet Moreno, Justin Saco, Helena Escuin-Ordinas, Gabriel Abril Rodriguez, Jesse M. Zaretsky, et al. 2017. « Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression ». *Cell reports* 19 (6): 1189-1201. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031>.
- Garraway, Levi A., Hans R. Widlund, Mark A. Rubin, Gad Getz, Aaron J. Berger, Sridhar Ramaswamy, Rameen Beroukhi, et al. 2005. « Integrative Genomic Analyses Identify MITF as a Lineage Survival Oncogene Amplified in Malignant Melanoma ». *Nature* 436 (7047): 117-22. <https://doi.org/10.1038/nature03664>.
- Gascard, Philippe, et Thea D. Tlsty. 2016. « Carcinoma-Associated Fibroblasts: Orchestrating the Composition of Malignancy ». *Genes & Development* 30 (9): 1002-19. <https://doi.org/10.1101/gad.279737.116>.
- « Genomic Classification of Cutaneous Melanoma ». 2015. *Cell* 161 (7): 1681-96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>.
- Gerstenblith, Meg R., Alisa M. Goldstein, Maria Concetta Fargnoli, Ketty Peris, et Maria Teresa Landi. 2007. « Comprehensive Evaluation of Allele Frequency Differences of MC1R Variants across Populations ». *Human Mutation* 28 (5): 495-505. <https://doi.org/10.1002/humu.20476>.
- Gesbert, Franck, et Lionel Larue. 2018. « Le mélanome cutané - Des modèles rationalisés aux soins des patients ». *médecine/sciences* 34 (5): 407-16. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183405013>.
- Gibney, Geoffrey T., et Keiran S.M. Smalley. 2013. « An unholy alliance: co-operation between BRAF and NF1 in melanoma development and BRAF inhibitor resistance ». *Cancer discovery* 3 (3): 260-63. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0017>.
- Gilkes, Daniele, Saumendra Bajpai, Carmen Chak-Lui Wong, Pallavi Chaturvedi, Maimon E. Hubbi, Denis Wirtz, et Gregg L. Semenza. 2013. « Procollagen Lysyl Hydroxylase 2 is Essential for Hypoxia-Induced Breast Cancer Metastasis ». *Molecular cancer research: MCR* 11 (5): 456-66. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0629>.

- Girard, Christophe, Margaux Lecacheur, Rania Ben Jouira, Ilona Berestjuk, Serena Diazzi, Virginie Prod'Homme, Aude Mallavialle, et al. 2020. « A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma ». *Cancer Research* 80 (10): 1927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2914>.
- Giuliano, Sandy, Yann Cheli, Mickaël Ohanna, Caroline Bonet, Laurent Beuret, Karine Bille, Agnès Loubat, et al. 2010. « Microphthalmia-Associated Transcription Factor Controls the DNA Damage Response and a Lineage-Specific Senescence Program in Melanomas ». *Cancer Research* 70 (9): 3813-22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2913>.
- Givel, Anne-Marie, Yann Kieffer, Alix Scholer-Dahirel, Philemon Sirven, Melissa Cardon, Floriane Pelon, Ilaria Magagna, et al. 2018. « miR200-Regulated CXCL12 β Promotes Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppression in Ovarian Cancers ». *Nature Communications* 9 (1): 1056. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03348-z>.
- Go, Eden P., Hee-Jung Moon, Minae Mure, et Heather Desaire. 2018. « Recombinant Human Lysyl Oxidase-like 2 Secreted from Human Embryonic Kidney Cells Displays Complex and Acidic Glycans at All Three N-Linked Glycosylation Sites ». *Journal of Proteome Research* 17 (5): 1826-32. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00849>.
- Goding, C. R. 2000. « Mitf from Neural Crest to Melanoma: Signal Transduction and Transcription in the Melanocyte Lineage ». *Genes & Development* 14 (14): 1712-28.
- Goldstein, Alisa M., May Chan, Mark Harland, Nicholas K. Hayward, Florence Demenais, D. Timothy Bishop, Esther Azizi, et al. 2007. « Features Associated with Germline CDKN2A Mutations: A GenoMEL Study of Melanoma-Prone Families from Three Continents ». *Journal of Medical Genetics* 44 (2): 99-106. <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.043802>.
- Gong, Lanqi, Yu Zhang, Yuma Yang, Qian Yan, Jifeng Ren, Jie Luo, Yuen Chak Tiu, et al. 2022. « Inhibition of Lysyl Oxidase-like 2 Overcomes Adhesion-Dependent Drug Resistance in the Collagen-Enriched Liver Cancer Microenvironment ». *Hepatology Communications* 6 (11): 3194-3211. <https://doi.org/10.1002/hep4.1966>.
- Greene, Alison G, Sarah B Eivers, Edward W. J. Dervan, Colm J O'Brien, et Deborah M Wallace. 2020. « Lysyl Oxidase Like 1: Biological Roles and Regulation ». *Experimental Eye Research* 193 (avril): 107975. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.107975>.
- Griffin, Merope, Daniele Scotto, Debra H. Josephs, Silvia Mele, Silvia Crescioli, Heather J. Bax, Giulia Pellizzari, et al. 2017. « BRAF inhibitors: resistance and the promise of combination treatments for melanoma ». *Oncotarget* 8 (44): 78174-92. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19836>.
- Griss, Johannes, Wolfgang Bauer, Christine Wagner, Martin Simon, Minyi Chen, Katharina Grabmeier-Pfistershammer, Margarita Maurer-Granofszky, et al. 2019. « B Cells Sustain Inflammation and Predict Response to Immune Checkpoint Blockade in Human Melanoma ». *Nature Communications* 10 (1): 4186. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12160-2>.
- Grossman, Moran, Nir Ben-Chetrit, Alina Zhuravlev, Ran Afik, Elad Bassat, Inna Solomonov, Yosef Yarden, et Irit Sagi. 2016. « Tumor Cell Invasion Can Be Blocked by Modulators of Collagen Fibril Alignment That Control Assembly of the Extracellular Matrix ». *Cancer Research* 76 (14): 4249-58. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2813>.
- Grzywa, Tomasz M., Wiktor Paskal, et Paweł K. Włodarski. 2017. « Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma ». *Translational Oncology* 10 (6): 956-75. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.09.007>.
- Haas, Lisa, Anais Elewaut, Camille L. Gerard, Christian Umkehrer, Lukas Leiendecker, Malin Pedersen, Izabela Krecioch, et al. 2021. « Acquired Resistance to Anti-MAPK Targeted Therapy Confers an Immune-Evasive Tumor Microenvironment and Cross-Resistance to Immunotherapy in Melanoma ». *Nature Cancer* 2

(7): 693-708. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00221-9>.

Han, Weijing, Shaohua Chen, Wei Yuan, Qihui Fan, Jianxiang Tian, Xiaochen Wang, Longqing Chen, et al. 2016. « Oriented collagen fibers direct tumor cell intravasation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (40): 11208-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610347113>.

Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Haqq, Christopher, Mehdi Nosrati, Daniel Sudilovsky, Julia Crothers, Daniel Khodabakhsh, Brian L. Pulliam, Scot Federman, et al. 2005. « The Gene Expression Signatures of Melanoma Progression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (17): 6092-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501564102>.

Harbst, Katja, Martin Lauss, Helena Cirenajwis, Christof Winter, Jillian Howlin, Therese Törngren, Anders Kvist, et al. 2014. « Molecular and Genetic Diversity in the Metastatic Process of Melanoma ». *The Journal of Pathology* 233 (1): 39-50. <https://doi.org/10.1002/path.4318>.

Harrison, Stephen A., Manal F. Abdelmalek, Stephen Caldwell, Mitchell L. Shiffman, Anna Mae Diehl, Reem Ghalib, Eric J. Lawitz, et al. 2018. « Simtuzumab Is Ineffective for Patients With Bridging Fibrosis or Compensated Cirrhosis Caused by Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Gastroenterology* 155 (4): 1140-53. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.006>.

Hase, Hiroaki, Kentaro Jingushi, Yuko Ueda, Kaori Kitae, Hiroshi Egawa, Ikumi Ohshio, Ryoji Kawakami, et al. 2014. « LOXL2 Status Correlates with Tumor Stage and Regulates Integrin Levels to Promote Tumor Progression in ccRCC ». *Molecular Cancer Research: MCR* 12 (12): 1807-17. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0233>.

Hecht, J. Randolph, Al B. Benson, Dmitry Vyushkov, Yingsi Yang, Johanna Bendell, et Udit Verma. 2017. « A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Simtuzumab in Combination with FOLFIRI for the Second-Line Treatment of Metastatic KRAS Mutant Colorectal Adenocarcinoma ». *The Oncologist* 22 (3): 243-e23. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0479>.

Heldin, Carl-Henrik, et Aristidis Moustakas. 2016. « Signaling Receptors for TGF- β Family Members ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (8): a022053. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022053>.

Herranz, Nicolás, Natàlia Dave, Alba Millanes-Romero, Laura Pascual-Reguant, Lluís Morey, Víctor M. Díaz, Víctor Lórenz-Fonfría, et al. 2016. « Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Oxidizes Trimethylated Lysine 4 in Histone H3 ». *The FEBS Journal* 283 (23): 4263-73. <https://doi.org/10.1111/febs.13922>.

Hirata, Eishu, Maria Romina Girotti, Amaya Viros, Steven Hooper, Bradley Spencer-Dene, Michiyuki Matsuda, James Larkin, Richard Marais, et Erik Sahai. 2015. « Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin B1/FAK Signaling ». *Cancer Cell* 27 (4): 574-88. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.008>.

Ho, Allen W., et Hensin Tsao. 2015. « Targeted therapies in melanoma: Translational research at its finest ». *The Journal of investigative dermatology* 135 (8): 1929-33. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.14>.

Hobbs, G. Aaron, Channing J. Der, et Kent L. Rossman. 2016. « RAS Isoforms and Mutations in Cancer at a Glance ». *Journal of Cell Science* 129 (7): 1287-92. <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>.

Hodgkinson, C. A., K. J. Moore, A. Nakayama, E. Steingrímsson, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, et H. Arnheiter. 1993. « Mutations at the Mouse Microphthalmia Locus Are Associated with Defects in a Gene Encoding a Novel Basic-Helix-Loop-Helix-Zipper Protein ». *Cell* 74 (2): 395-404. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90429-t](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90429-t).

Hodi, F. Stephen, Steven J. O'Day, David F. McDermott, Robert W. Weber, Jeffrey A. Sosman, John B.

- Haanen, Rene Gonzalez, et al. 2010. « Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 363 (8): 711-23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>.
- Hoek, Keith S., Ossia M. Eichhoff, Natalie C. Schlegel, Udo Döbbling, 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>.
- Hoek, Keith S., Natalie C. Schlegel, Patricia Brafford, Antje Sucker, Selma Ugurel, Rajiv Kumar, Barbara L. Weber, et al. 2006. « Metastatic Potential of Melanomas Defined by Specific Gene Expression Profiles with No BRAF Signature ». *Pigment Cell Research* 19 (4): 290-302. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00322.x>.
- Hollosi, Peter, Jana K. Yakushiji, Keith S. K. Fong, Katalin Csiszar, et Sheri F. T. Fong. 2009. « Lysyl Oxidase-like 2 Promotes Migration in Noninvasive Breast Cancer Cells but Not in Normal Breast Epithelial Cells ». *International Journal of Cancer* 125 (2): 318-27. <https://doi.org/10.1002/ijc.24308>.
- Horn, Susanne, Adina Figl, P. Sivaramakrishna Rachakonda, Christine Fischer, Antje Sucker, Andreas Gast, Stephanie Kadel, et al. 2013. « TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6122): 959-61. <https://doi.org/10.1126/science.1230062>.
- Hornstra, Ian K., Shonyale Birge, Barry Starcher, Allen J. Bailey, Robert P. Mecham, et Steven D. Shapiro. 2003. « Lysyl Oxidase Is Required for Vascular and Diaphragmatic Development in Mice * ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 14387-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210144200>.
- Hsieh, Chyi-Song, Hyang-Mi Lee, et Chan-Wang J. Lio. 2012. « Selection of Regulatory T Cells in the Thymus ». *Nature Reviews Immunology* 12 (3): 157-67. <https://doi.org/10.1038/nri3155>.
- Hu, Lin, Jing Wang, Yunliang Wang, Linpeng Wu, Chao Wu, Bo Mao, E. Maruthi Prasad, Yuhong Wang, et Y. Eugene Chin. 2020. « LOXL1 modulates the malignant progression of colorectal cancer by inhibiting the transcriptional activity of YAP ». *Cell Communication and Signaling: CCS* 18 (septembre): 148. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00639-1>.
- Huang, Bo, Ping-Ying Pan, Qingsheng Li, Alice I. Sato, David E. Levy, Jonathan Bromberg, Celia M. Divino, et Shu-Hsia Chen. 2006. « Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host ». *Cancer Research* 66 (2): 1123-31. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1299>.
- Hughes, A. E., V. E. Newton, X. Z. Liu, et A. P. Read. 1994. « A Gene for Waardenburg Syndrome Type 2 Maps Close to the Human Homologue of the Microphthalmia Gene at Chromosome 3p12-P14.1 ». *Nature Genetics* 7 (4): 509-12. <https://doi.org/10.1038/ng0894-509>.
- Hugo, Willy, Hubing Shi, Lu Sun, Marco Piva, Chunying Song, Xiangju Kong, Gatien Moriceau, et al. 2015a. « Non-Genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance ». *Cell* 162 (6): 1271-85. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.061>.
- Hugo, Willy, Hubing Shi, Lu Sun, Marco Piva, Chunying Song, Xiangju Kong, Gatien Moriceau, et al. 2015b. « Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance ». *Cell* 162 (6): 1271-85. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.061>.
- Hugo, Willy, Jesse M. Zaretsky, Lu Sun, Chunying Song, Blanca Homet Moreno, Siwen Hu-Lieskovan, Beata Berent-Maoz, et al. 2016. « Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma ». *Cell* 165 (1): 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.065>.
- Huijbers, Ivo J., Marjan Iravani, Sergey Popov, David Robertson, Safa Al-Sarraj, Chris Jones, et Clare M. Isacke. 2010. « A Role for Fibrillar Collagen Deposition and the Collagen Internalization Receptor Endo180 in Glioma Invasion ». *PLoS One* 5 (3): e9808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009808>.

- Ikenaga, Naoki, Zhen-Wei Peng, Kahini A. Vaid, Susan B. Liu, Shuhei Yoshida, Deanna Y. Sverdllov, Amanda Mikels-Vigdal, Victoria Smith, Detlef Schuppan, et Yury V. Popov. 2017. « Selective Targeting of Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Suppresses Hepatic Fibrosis Progression and Accelerates Its Reversal ». *Gut* 66 (9): 1697-1708. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312473>.
- Ishikawa, Taichi, Zenebech Wondimu, Yuko Oikawa, Giusy Gentilcore, Rolf Kiessling, Suzanne Egyhazi Brage, Johan Hansson, et Manuel Patarroyo. 2014. « Laminins 411 and 421 Differentially Promote Tumor Cell Migration via A6 β 1 Integrin and MCAM (CD146) ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 38 (septembre): 69-83. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.06.002>.
- Ito, Tomoki, Maria Yang, Yui-Hsi Wang, Roberto Lande, Josh Gregorio, Olivia A Perng, Xiao-Feng Qin, Yong-Jun Liu, et Michel Gilliet. 2007. « Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (1): 105-15. <https://doi.org/10.1084/jem.20061660>.
- Janeczek Portalska, Karolina, Anne Leferink, Nathalie Groen, Hugo Fernandes, Lorenzo Moroni, Clemens van Blitterswijk, et Jan de Boer. 2012. « Endothelial Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells ». *PLoS ONE* 7 (10): e46842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046842>.
- Janyasupab, Metini, Ying-Hui Lee, Yuan Zhang, Chen W. Liu, Jieyi Cai, Adriana Popa, Anna C. Samia, et al. 2015. « Detection of Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2), a Biomarker of Metastasis from Breast Cancers Using Human Blood Samples ». *Recent Patents on Biomarkers* 5 (2): 93-100. <https://doi.org/10.2174/2210309005666150804195033>.
- Javelaud, Delphine, Vasileia-Ismini Alexaki, et Alain Mauviel. 2008. « Transforming Growth Factor- β in Cutaneous Melanoma ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 21 (2): 123-32. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00450.x>.
- Jeggo, Penny A., Laurence H. Pearl, et Antony M. Carr. 2016. « DNA Repair, Genome Stability and Cancer: A Historical Perspective ». *Nature Reviews. Cancer* 16 (1): 35-42. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.4>.
- Jiang, Hong, Samarth Hegde, et David G. DeNardo. 2017. « Tumor-associated fibrosis as a regulator of tumor immunity and response to immunotherapy ». *Cancer immunology, immunotherapy: CII* 66 (8): 1037-48. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2003-1>.
- Jiang, Li, Haihong Jin, Shan Gong, Kun Han, Ze Li, Weihu Zhang, et Jing Tian. 2022. « LncRNA KCNQ1OT1-Mediated Cervical Cancer Progression by Sponging miR-1270 as a ceRNA of LOXL2 through PI3k/Akt Pathway ». *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 48 (4): 1001-10. <https://doi.org/10.1111/jog.15177>.
- Jin, Tiefeng, Hoe Suk Kim, Sul Ki Choi, Eun Hye Hwang, Jisu Woo, Han Suk Ryu, Kwangsoo Kim, Aree Moon, et Woo Kyung Moon. 2017. « microRNA-200c/141 Upregulates SerpinB2 to Promote Breast Cancer Cell Metastasis and Reduce Patient Survival ». *Oncotarget* 8 (20): 32769-82. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15680>.
- Johannessen, Cory M., Laura A. Johnson, Federica Piccioni, Aisha Townes, Dennie T. Frederick, Melanie K. Donahue, Rajiv Narayan, et al. 2013. « A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition ». *Nature* 504 (7478): 138-42. <https://doi.org/10.1038/nature12688>.
- Jong, Olivier G. de, Lizet M. van der Waals, Farah R. W. Kools, Marianne C. Verhaar, et Bas W. M. van Balkom. 2019. « Lysyl Oxidase-like 2 Is a Regulator of Angiogenesis through Modulation of Endothelial-to-Mesenchymal Transition ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (7): 10260-69. <https://doi.org/10.1002/jcp.27695>.
- Joyce, Johanna A., et Jeffrey W. Pollard. 2009. « Microenvironmental Regulation of Metastasis ». *Nature Reviews Cancer* 9 (4): 239-52. <https://doi.org/10.1038/nrc2618>.

- Kakadia, Sunilkumar, Naveen Yarlagadda, Ramez Awad, Madappa Kundranda, Jiaxin Niu, Boris Naraev, Lida Mina, Tomislav Dragovich, Mark Gimbel, et Fade Mahmoud. 2018. « Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma ». *OncoTargets and therapy* 11 (octobre): 7095-7107. <https://doi.org/10.2147/OTT.S182721>.
- Kalluri, Raghu. 2003. « Basement Membranes: Structure, Assembly and Role in Tumour Angiogenesis ». *Nature Reviews. Cancer* 3 (6): 422-33. <https://doi.org/10.1038/nrc1094>.
- Kalluri, Raghu. 2016. « The Biology and Function of Fibroblasts in Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 16 (9): 582-98. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>.
- Kalluri, Raghu, et Michael Zeisberg. 2006. « Fibroblasts in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 6 (5): 392-401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>.
- Kamikawaji, Kazuto, Naohiko Seki, Masaki Watanabe, Hiroko Mataka, Tomohiro Kumamoto, Koichiro Takagi, Keiko Mizuno, et Hiromasa Inoue. 2016. « Regulation of LOXL2 and SERPINH1 by Antitumor microRNA-29a in Lung Cancer with Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Journal of Human Genetics* 61 (12): 985-93. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.99>.
- Kaneda, Atsushi, Kuniko Wakazono, Tetsuya Tsukamoto, Naoko Watanabe, Yukiko Yagi, Masae Tatematsu, Michio Kaminishi, Takashi Sugimura, et Toshikazu Ushijima. 2004. « Lysyl Oxidase Is a Tumor Suppressor Gene Inactivated by Methylation and Loss of Heterozygosity in Human Gastric Cancers ». *Cancer Research* 64 (18): 6410-15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1543>.
- Kannan, Karuppiiah, Norman E. Sharpless, Jin Xu, Ronan C. O'Hagan, Marcus Bosenberg, et Lynda Chin. 2003. « Components of the Rb Pathway Are Critical Targets of UV Mutagenesis in a Murine Melanoma Model ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (3): 1221-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.0336397100>.
- Kaplan, David R., Malcolm Whitman, Brian Schaffhausen, David C. Pallas, Morris White, Lewis Cantley, et Thomas M. Roberts. 1987. « Common Elements in Growth Factor Stimulation and Oncogenic Transformation: 85 Kd Phosphoprotein and Phosphatidylinositol Kinase Activity ». *Cell* 50 (7): 1021-29. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90168-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90168-1).
- Kaplan, Rosandra N., Shahin Rafii, et David Lyden. 2006. « Preparing the “Soil”: The Premetastatic Niche ». *Cancer Research* 66 (23): 11089-93. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2407>.
- Kaplon, Joanna, Cornelia Hömig-Hölzel, Linda Gao, Katrin Meissl, Els M. E. Verdegaal, Sjoerd H. van der Burg, Remco van Doorn, et Daniel S. Peeper. 2014. « Near-Genomewide RNAi Screening for Regulators of BRAF(V600E) -Induced Senescence Identifies RASEF, a Gene Epigenetically Silenced in Melanoma ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 27 (4): 640-52. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12248>.
- Kasprzycka, M., C. Hammarström, et G. Haraldsen. 2015. « Tenascins in Fibrotic Disorders-from Bench to Bedside ». *Cell Adhesion & Migration* 9 (1-2): 83-89. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.994901>.
- Kato, Mayuko, Akira Kurozumi, Yusuke Goto, Ryosuke Matsushita, Atsushi Okato, Rika Nishikawa, Ichiro Fukumoto, Keiichi Koshizuka, Tomohiko Ichikawa, et Naohiko Seki. 2017. « Regulation of Metastasis-Promoting LOXL2 Gene Expression by Antitumor microRNAs in Prostate Cancer ». *Journal of Human Genetics* 62 (1): 123-32. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.68>.
- Kaupilla, S., F. Stenbäck, J. Risteli, A. Jukkola, et L. Risteli. 1998. « Aberrant Type I and Type III Collagen Gene Expression in Human Breast Cancer in Vivo ». *The Journal of Pathology* 186 (3): 262-68. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(1998110\)186:3<262::AID-PATH191>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<262::AID-PATH191>3.0.CO;2-3).
- Kaur, Amanpreet, Marie R. Webster, Katie Marchbank, Reeti Behera, Abibatou Ndoeye, Curtis H. Kugel, Vanessa M. Dang, et al. 2016. « sFRP2 in the Aged Microenvironment Drives Melanoma Metastasis and

Therapy Resistance ». *Nature* 532 (7598): 250-54. <https://doi.org/10.1038/nature17392>.

Kehrl, J. H., A. B. Roberts, L. M. Wakefield, S. Jakowlew, M. B. Sporn, et A. S. Fauci. 1986. « Transforming Growth Factor Beta Is an Important Immunomodulatory Protein for Human B Lymphocytes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 137 (12): 3855-60.

Kehrl, J. H., L. M. Wakefield, A. B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M. B. Sporn, et A. S. Fauci. 1986. « Production of Transforming Growth Factor Beta by Human T Lymphocytes and Its Potential Role in the Regulation of T Cell Growth ». *The Journal of Experimental Medicine* 163 (5): 1037-50. <https://doi.org/10.1084/jem.163.5.1037>.

Khalili, Jahan S., Shujuan Liu, Tania G. Rodríguez-Cruz, Mayra Whittington, Seth Wardell, Chengwen Liu, Mingying Zhang, et al. 2012. « Oncogenic BRAF(V600E) Promotes Stromal Cell-Mediated Immunosuppression via Induction of Interleukin-1 in Melanoma ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (19): 5329-40. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1632>.

Kieffer, Yann, Hocine R. Hocine, Géraldine Gentric, Floriane Pelon, Charles Bernard, Brigitte Bourachot, Sonia Lameiras, et al. 2020. « Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer ». *Cancer Discovery* 10 (9): 1330-51. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1384>.

Kielosto, Mari, Johanna Eriksson, Pirjo Nummela, Miao Yin, et Erkki Hölttä. 2018. « Divergent Roles of Lysyl Oxidase Family Members in Ornithine Decarboxylase- and RAS-Transformed Mouse Fibroblasts and Human Melanoma Cells ». *Oncotarget* 9 (102): 37733-52. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26508>.

Kim, Boh-Ram, Seung Myung Dong, Seung Hee Seo, Ji-Hae Lee, Jae Myun Lee, Seung-Hoon Lee, et Seung Bae Rho. 2014. « Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Controls Tumor-Associated Cell Proliferation through the Interaction with MARCKSL1 ». *Cellular Signalling* 26 (9): 1765-73. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.05.010>.

Kim, Im-Kyung, Yun Sun Lee, Hyung Sun Kim, Seung Myung Dong, Joon Seong Park, et Dong Sup Yoon. 2019. « Specific Protein 1(SP1) Regulates the Epithelial-Mesenchymal Transition via Lysyl Oxidase-like 2(LOXL2) in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *Scientific Reports* 9 (1): 5933. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42501-6>.

Kim, Min Hwan, Chang Gon Kim, Sang-Kyum Kim, Sang Joon Shin, Eun Ah Choe, Su-Hyung Park, Eui-Cheol Shin, et Joon Kim. 2018. « YAP-Induced PD-L1 Expression Drives Immune Evasion in BRAFi-Resistant Melanoma ». *Cancer Immunology Research* 6 (3): 255-66. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0320>.

Kim, Min Hwan, Jongshin Kim, Hyowon Hong, Si-Hyung Lee, June-Koo Lee, Eunji Jung, et Joon Kim. 2016. « Actin Remodeling Confers BRAF Inhibitor Resistance to Melanoma Cells through YAP/TAZ Activation ». *The EMBO Journal* 35 (5): 462-78. <https://doi.org/10.15252/embj.201592081>.

Kim, Wook, Yong Seok Kang, Jin Soo Kim, Nah-Young Shin, Steven K. Hanks, et Woo Keun Song. 2008. « The Integrin-coupled Signaling Adaptor p130Cas Suppresses Smad3 Function in Transforming Growth Factor- β Signaling ». *Molecular Biology of the Cell* 19 (5): 2135-46. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-10-0991>.

Kirschmann, Dawn A., Elisabeth A. Seftor, Sheri F. T. Fong, Daniel R. C. Nieva, Colleen M. Sullivan, Elijah M. Edwards, Pascal Sommer, Katalin Csiszar, et Mary J. C. Hendrix. 2002. « A Molecular Role for Lysyl Oxidase in Breast Cancer Invasion ». *Cancer Research* 62 (15): 4478-83.

Klein, B., X. G. Zhang, Z. Y. Lu, et R. Bataille. 1995. « Interleukin-6 in Human Multiple Myeloma ». *Blood* 85 (4): 863-72.

Koga, Mitsuhsa, Hisashi Kai, Kimiyasu Egami, Toyooki Murohara, Ayami Ikeda, Suguru Yasuoka, Kensuke

- Egashira, et al. 2008. « Mutant MCP-1 Therapy Inhibits Tumor Angiogenesis and Growth of Malignant Melanoma in Mice ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 365 (2): 279-84. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.182>.
- Kong, Yan, Lu Si, Yiqian Li, Xiaowen Wu, Xiaowei Xu, Jie Dai, Huan Tang, et al. 2016. « Analysis of mTOR Gene Aberrations in Melanoma Patients and Evaluation of Their Sensitivity to PI3K–AKT–mTOR Pathway Inhibitors ». *Clinical Cancer Research* 22 (4): 1018-27. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1110>.
- Kozar, Ines, Christiane Margue, Sonja Rothengatter, Claude Haan, et Stephanie Kreis. 2019. « Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1871 (2): 313-22. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.02.002>.
- Kumari, Neeraj, B. S. Dwarakanath, Asmita Das, et Anant Narayan Bhatt. 2016. « Role of Interleukin-6 in Cancer Progression and Therapeutic Resistance ». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (9): 11553-72. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5098-7>.
- Kumari, Suchitra, Tarun Kumar Panda, et Tapaswini Pradhan. 2017. « Lysyl Oxidase: Its Diversity in Health and Diseases ». *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 32 (2): 134-41. <https://doi.org/10.1007/s12291-016-0576-7>.
- Kusmartsev, Sergei, Yulia Nefedova, Daniel Yoder, et Dmitry I. Gabrilovich. 2004. « Antigen-Specific Inhibition of CD8+ T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen Species ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (2): 989-99. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.989>.
- Lamar, John M., Patrick Stern, Hui Liu, Jeffrey W. Schindler, Zhi-Gang Jiang, et Richard O. Hynes. 2012. « The Hippo Pathway Target, YAP, Promotes Metastasis through Its TEAD-Interaction Domain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (37): E2441-2450. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212021109>.
- Langness, U., et S. Udenfriend. 1974. « Collagen Biosynthesis in Nonfibroblastic Cell Lines ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (1): 50-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.1.50>.
- Larkin, James, Paolo A. Ascierto, Brigitte Dréno, Victoria Atkinson, Gabriella Liskay, Michele Maio, Mario Mandalà, et al. 2014. « Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma ». *The New England Journal of Medicine* 371 (20): 1867-76. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408868>.
- Lazard, D, X Sastre, M G Frid, M A Glukhova, J P Thiery, et V E Kotliansky. 1993. « Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (3): 999-1003.
- Le Calvé, Benjamin, Audrey Griveau, David Vindrieux, Raphaël Maréchal, Clotilde Wiel, Magali Svrcek, Johann Gout, et al. 2016. « Lysyl Oxidase Family Activity Promotes Resistance of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma to Chemotherapy by Limiting the Intratumoral Anticancer Drug Distribution ». *Oncotarget* 7 (22): 32100-112. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8527>.
- Lecacheur, Margaux, Christophe A. Girard, Marcel Deckert, et Sophie Tartare-Deckert. 2020. « [Melanoma therapeutic escape: the biomechanical track] ». *Medecine Sciences: M/S* 36 (11): 961-65. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020201>.
- Lee, Choong-Kun, Seung-Hwan Jeong, Cholsoon Jang, Hosung Bae, Yoo Hyung Kim, Intae Park, Sang Kyum Kim, et Gou Young Koh. 2019. « Tumor Metastasis to Lymph Nodes Requires YAP-Dependent Metabolic Adaptation ». *Science (New York, N.Y.)* 363 (6427): 644-49. <https://doi.org/10.1126/science.aav0173>.
- Lee, Kwang Youl, et Suk-Chul Bae. 2002. « TGF-Beta-Dependent Cell Growth Arrest and Apoptosis ». *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35 (1): 47-53. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2002.35.1.047>.

Leight, Jennifer L., Michele A. Wozniak, Sophia Chen, Michelle L. Lynch, et Christopher S. Chen. 2012. « Matrix rigidity regulates a switch between TGF- β 1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition ». *Molecular Biology of the Cell* 23 (5): 781-91. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0537>.

Leitinger, Birgit, et Erhard Hohenester. 2007. « Mammalian Collagen Receptors ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 26 (3): 146-55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.10.007>.

Lenselink, Ellie A. 2015. « Role of Fibronectin in Normal Wound Healing ». *International Wound Journal* 12 (3): 313-16. <https://doi.org/10.1111/iwj.12109>.

Leslie, Michael C., et Menashe Bar-Eli. 2005. « Regulation of Gene Expression in Melanoma: New Approaches for Treatment ». *Journal of Cellular Biochemistry* 94 (1): 25-38. <https://doi.org/10.1002/jcb.20296>.

Leung, Leo, Dan Niculescu-Duvaz, Deborah Smithen, Filipa Lopes, Cedric Callens, Robert McLeary, Grazia Saturno, et al. 2019. « Anti-metastatic Inhibitors of Lysyl Oxidase (LOX): Design and Structure-Activity Relationships ». *Journal of Medicinal Chemistry* 62 (12): 5863-84. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00335>.

Levental, Kandice R., Hongmei Yu, Laura Kass, Johnathon N. Lakins, Mikala Egeblad, Janine T. Erler, Sheri F.T. Fong, et al. 2009. « Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin signaling ». *Cell* 139 (5): 891-906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>.

Li, Qing, Qing Chao, Yue Liu, Jiayu Fang, Jing Xie, Jing Zhen, Yongqi Ding, et al. 2021. « Deubiquitinase ZRANB1 Drives Hepatocellular Carcinoma Progression through SP1-LOXL2 Axis ». *American Journal of Cancer Research* 11 (10): 4807-25.

Li, Rongkun, Yahui Wang, Xiaoxin Zhang, Mingxuan Feng, Jun Ma, Jun Li, Xiaomei Yang, et al. 2019. « Exosome-mediated secretion of LOXL4 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis ». *Molecular Cancer* 18 (janvier): 18. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0948-8>.

Lin, Luping, Amit J. Sabnis, Elton Chan, Victor Olivas, Lindsay Cade, Evangelos Pazarentzos, Saurabh Asthana, et al. 2015. « The Hippo Effector YAP Promotes Resistance to RAF- and MEK-Targeted Cancer Therapies ». *Nature Genetics* 47 (3): 250-56. <https://doi.org/10.1038/ng.3218>.

Lin, William M., et David E. Fisher. 2017. « Signaling and Immune Regulation in Melanoma Development and Responses to Therapy ». *Annual Review of Pathology* 12 (janvier): 75-102. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100208>.

Liu, Chao, Theresa Guo, Akihiro Sakai, Shuling Ren, Takahito Fukusumi, Mizuo Ando, Sayed Sadat, Yuki Saito, et Joseph A. Califano. 2020. « A Novel Splice Variant of LOXL2 Promotes Progression of Human Papillomavirus-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma ». *Cancer* 126 (4): 737-48. <https://doi.org/10.1002/cncr.32610>.

Liu, Chengwen, Weiyi Peng, Chunyu Xu, Yanyan Lou, Mingying Zhang, Jennifer A. Wargo, Jie Qing Chen, et al. 2013. « BRAF Inhibition Increases Tumor Infiltration by T cells and Enhances the Anti-tumor Activity of Adoptive Immunotherapy in Mice ». *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (2): 393-403. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1626>.

Liu, Fang, Juxiang Cao, Jinxiang Wu, Kayleigh Sullivan, James Shen, Byungwoo Ryu, Zhixiang Xu, Wenyi Wei, et Rutao Cui. 2013. « Stat3-Targeted Therapies Overcome the Acquired Resistance to Vemurafenib in Melanomas ». *The Journal of Investigative Dermatology* 133 (8): 2041-49. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.32>.

Liu, Jianglan, Mizuho Fukunaga-Kalabis, Ling Li, et Meenhard Herlyn. 2014. « Developmental Pathways Activated in Melanocytes and Melanoma ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 563 (décembre): 13-21.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.023>.

Liu, Jieqiong, Shan Liao, Benjamin Diop-Frimpong, Wei Chen, Shom Goel, Kamila Naxerova, Marek Ancukiewicz, Yves Boucher, Rakesh K. Jain, et Lei Xu. 2012. « TGF- β blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma by normalizing the tumor stroma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (41): 16618-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117610109>.

Liu, Na, Thomas R. Cox, Weiyinqi Cui, Gunnar Adell, Birgitta Holmlund, Jie Ping, Ingvar Jarlsfelt, Janine T. Erler, et Xiao-Feng Sun. 2016. « Nuclear expression of lysyl oxidase enzyme is an independent prognostic factor in rectal cancer patients ». *Oncotarget* 8 (36): 60015-24. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9623>.

Liu, Pixu, Hailing Cheng, Thomas M. Roberts, et Jean J. Zhao. 2009. « Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer ». *Nature reviews. Drug discovery* 8 (8): 627-44. <https://doi.org/10.1038/nrd2926>.

Liu, Tianju, Myoung Ja Chung, Matthew Ullenbruch, Hongfeng Yu, Hong Jin, Biao Hu, Yoon Young Choi, Fuyuki Ishikawa, et Sem H. Phan. 2007. « Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 117 (12): 3800-3809. <https://doi.org/10.1172/JCI32369>.

Liu, Xin, Tong Liu, Lanyue Hu, Tinghui Jiang, Hao Liu, Yitao Wang, Yunlong Lei, Jiang Zhu, et Youquan Bu. 2020. « Identification and Characterization of the Promoter of Cancer-Related Gene LOXL2 ». *Experimental Cell Research* 387 (2): 111786. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111786>.

Long, Georgina V., Uwe Trefzer, Michael A. Davies, Richard F. Kefford, Paolo A. Ascierto, Paul B. Chapman, Igor Puzanov, et al. 2012. « Dabrafenib in Patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-Mutant Melanoma Metastatic to the Brain (BREAK-MB): A Multicentre, Open-Label, Phase 2 Trial ». *The Lancet. Oncology* 13 (11): 1087-95. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70431-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70431-X).

Lorentzen, Henrik F. 2019. « Targeted Therapy for Malignant Melanoma ». *Current Opinion in Pharmacology* 46 (juin): 116-21. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.05.010>.

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>.

Lu, Pengfei, Ken Takai, Valerie M. Weaver, et Zena Werb. 2011. « Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (12): a005058. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>.

Lu, Pengfei, Valerie M. Weaver, et Zena Werb. 2012. « The Extracellular Matrix: A Dynamic Niche in Cancer Progression ». *The Journal of Cell Biology* 196 (4): 395-406. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>.

Lucero, H. A., et H. M. Kagan. 2006. « Lysyl Oxidase: An Oxidative Enzyme and Effector of Cell Function ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63 (19): 2304-16. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6149-9>.

Lui, Philip, Richard Cashin, Márcio Machado, Michiel Hemels, Patricia K. Corey-Lisle, et Thomas R. Einarson. 2007. « Treatments for Metastatic Melanoma: Synthesis of Evidence from Randomized Trials ». *Cancer Treatment Reviews* 33 (8): 665-80. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.06.004>.

Luo, Weibo, Ryan Chang, Jun Zhong, Akhilesh Pandey, et Gregg L. Semenza. 2012. « Histone Demethylase JMJD2C Is a Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1 That Is Required for Breast Cancer Progression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (49): E3367-3376. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217394109>.

Lv, Guo-Qing, Hai-Ying Zou, Lian-Di Liao, Hui-Hui Cao, Fa-Min Zeng, Bing-Li Wu, Jian-Jun Xie, Wang-

Kai Fang, Li-Yan Xu, et En-Min Li. 2014. « Identification of a novel lysyl oxidase-like 2 alternative splicing isoform, LOXL2 Δ e13, in esophageal squamous cell carcinoma ». *Biochemistry and Cell Biology* 92 (5): 379-89. <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0046>.

Magnon, Claire, Simon J. Hall, Juan Lin, Xiaonan Xue, Leah Gerber, Stephen J. Freedland, et Paul S. Frenette. 2013. « Autonomic Nerve Development Contributes to Prostate Cancer Progression ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6142): 1236361. <https://doi.org/10.1126/science.1236361>.

Mäki, Joni M., Raija Sormunen, Sari Lippo, Riitta Kaarteenaho-Wiik, Raija Soinen, et Johanna Myllyharju. 2005. « Lysyl Oxidase Is Essential for Normal Development and Function of the Respiratory System and for the Integrity of Elastic and Collagen Fibers in Various Tissues ». *The American Journal of Pathology* 167 (4): 927-36.

Mäki, Joni M., Hilka Tikkanen, et Kari I. Kivirikko. 2001. « Cloning and Characterization of a Fifth Human Lysyl Oxidase Isoenzyme: The Third Member of the Lysyl Oxidase-Related Subfamily with Four Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domains ». *Matrix Biology* 20 (7): 493-96. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00157-3).

Mariathasan, Sanjeev, Shannon J. Turley, Dorothee Nickles, Alessandra Castiglioni, Kobe Yuen, Yulei Wang, Edward E. Kadel, et al. 2018. « TGF- β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells ». *Nature* 554 (7693): 544-48. <https://doi.org/10.1038/nature25501>.

Marine, Jean-Christophe, Sarah-Jane Dawson, et Mark A. Dawson. 2020. « Non-Genetic Mechanisms of Therapeutic Resistance in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 20 (12): 743-56. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00302-4>.

Martin, Alberto, Fernando Salvador, Gema Moreno-Bueno, Alfredo Floristán, Cristina Ruiz-Herguido, Eva P Cuevas, Saleta Morales, et al. 2015. « Lysyl oxidase-like 2 represses Notch1 expression in the skin to promote squamous cell carcinoma progression ». *The EMBO Journal* 34 (8): 1090-1109. <https://doi.org/10.15252/embj.201489975>.

Martino, Fabiana, Ana R. Perestrelo, Vladimír Vinarský, Stefania Pagliari, et Giancarlo Forte. 2018. « Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function ». *Frontiers in Physiology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00824>.

Marusak, Charles, Varsha Thakur, Yuan Li, Juliano T. Freitas, Patrick M. Zmina, Vijay S. Thakur, Mayland Chang, et al. 2020. « Targeting Extracellular Matrix Remodeling Restores BRAF Inhibitor Sensitivity in BRAFi-resistant Melanoma ». *Clinical Cancer Research* 26 (22): 6039-50. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2773>.

Massagué, Joan, et Anna C. Obenauf. 2016. « Metastatic Colonization by Circulating Tumour Cells ». *Nature* 529 (7586): 298-306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>.

Massella, Daniele, Monica Argenziano, Ada Ferri, Jinping Guan, Stéphane Giraud, Roberta Cavalli, Antonello A. Barresi, et Fabien Salaün. 2019. « Bio-Functional Textiles: Combining Pharmaceutical Nanocarriers with Fibrous Materials for Innovative Dermatological Therapies ». *Pharmaceutics* 11 (8): 403. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080403>.

Matsuo, Ayako, Ryota Tanida, Shigehisa Yanagi, Hironobu Tsubouchi, Ayako Miura, Takafumi Shigekusa, Nobuhiro Matsumoto, et Masamitsu Nakazato. 2021. « Significance of Nuclear LOXL2 Inhibition in Fibroblasts and Myofibroblasts in the Fibrotic Process of Acute Respiratory Distress Syndrome ». *European Journal of Pharmacology* 892 (février): 173754. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173754>.

Matsuoka, Kazuhiko, Latifa Bakiri, Lena I. Wolff, Markus Linder, Amanda Mikels-Vigdal, Ana Patiño-García, Fernando Lecanda, Christine Hartmann, Maria Sibilía, et Erwin F. Wagner. 2020. « Wnt Signaling and Loxl2 Promote Aggressive Osteosarcoma ». *Cell Research* 30 (10): 885-901. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0370-1>.

- McArthur, Grant A., Paul B. Chapman, Caroline Robert, James Larkin, John B. Haanen, Reinhard Dummer, Antoni Ribas, et al. 2014. « Safety and Efficacy of Vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) Mutation-Positive Melanoma (BRIM-3): Extended Follow-up of a Phase 3, Randomised, Open-Label Study ». *The Lancet. Oncology* 15 (3): 323-32. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70012-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70012-9).
- McCormack, Valerie A., et Isabel dos Santos Silva. 2006. « Breast Density and Parenchymal Patterns as Markers of Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis ». *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 15 (6): 1159-69. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0034>.
- McGill, Gaël G., Martin Horstmann, Hans R. Widlund, Jinyan Du, Gabriela Motyckova, Emi K. Nishimura, Yi-Ling Lin, et al. 2002. « Bcl2 Regulation by the Melanocyte Master Regulator Mitf Modulates Lineage Survival and Melanoma Cell Viability ». *Cell* 109 (6): 707-18. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00762-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00762-6).
- McGranahan, Nicholas, et Charles Swanton. 2015. « Biological and Therapeutic Impact of Intratumor Heterogeneity in Cancer Evolution ». *Cancer Cell* 27 (1): 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.12.001>.
- Meads, Mark B., Robert A. Gatenby, et William S. Dalton. 2009. « Environment-Mediated Drug Resistance: A Major Contributor to Minimal Residual Disease ». *Nature Reviews Cancer* 9 (9): 665-74. <https://doi.org/10.1038/nrc2714>.
- Meyaard, Linde. 2008. « The Inhibitory Collagen Receptor LAIR-1 (CD305) ». *Journal of Leukocyte Biology* 83 (4): 799-803. <https://doi.org/10.1189/jlb.0907609>.
- Mhaidly, Rana, et Fatima Mechta-Grigoriou. 2020. « Fibroblast Heterogeneity in Tumor Micro-Environment: Role in Immunosuppression and New Therapies ». *Seminars in Immunology* 48 (avril): 101417. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101417>.
- Micallef, Ludovic, Nicolas Vedrenne, Fabrice Billet, Bernard Coulomb, Ian A Darby, et Alexis Desmoulière. 2012. « The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair ». *Fibrogenesis & Tissue Repair* 5 (Suppl 1): S5. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-S1-S5>.
- Michaloglou, C., L. C. W. Vredeveld, Maria S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, Cmam van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, W. J. Mooi, et D. S. Peeper. 2005. « BRAF(E600)-Associated Senescence-like Cell Cycle Arrest of Human Naevi ». *Nature*, août. <https://doi.org/10.1038/nature03890>.
- Midwood, Kim S., Matthias Chiquet, Richard P. Tucker, et Gertraud Orend. 2016. « Tenascin-C at a Glance ». *Journal of Cell Science* 129 (23): 4321-27. <https://doi.org/10.1242/jcs.190546>.
- Millanes-Romero, Alba, Nicolás Herranz, Valentina Perrera, Ane Iturbide, Jordina Loubat-Casanovas, Jesús Gil, Thomas Jenuwein, Antonio García de Herreros, et Sandra Peiró. 2013. « Regulation of Heterochromatin Transcription by Snail1/LOXL2 during Epithelial-to-Mesenchymal Transition ». *Molecular Cell* 52 (5): 746-57. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.015>.
- Miller, Arlo J., et Martin C. Mihm. 2006. « Melanoma ». *The New England Journal of Medicine* 355 (1): 51-65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052166>.
- Miller, Bryan W, Jennifer P Morton, Mark Pinese, Grazia Saturno, Nigel B Jamieson, Ewan McGhee, Paul Timpson, et al. 2015. « Targeting the LOX/hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy ». *EMBO Molecular Medicine* 7 (8): 1063-76. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404827>.
- Min, Chengyin, Ziyang Yu, Kathrin H. Kirsch, Yingshe Zhao, Siddharth R. Vora, Philip C. Trackman, Douglas B. Spicer, Lynn Rosenberg, Julie R. Palmer, et Gail E. Sonenshein. 2009. « A loss of function polymorphism in the propeptide domain of the LOX gene and breast cancer ». *Cancer research* 69 (16): 6685-93.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4818>.

Miroshnikova, Y. A., G. I. Rozenberg, L. Cassereau, M. Pickup, J. K. Mouw, G. Ou, K. L. Templeman, et al. 2017. « $\alpha 5\beta 1$ -Integrin promotes tension-dependent mammary epithelial cell invasion by engaging the fibronectin synergy site ». *Molecular Biology of the Cell* 28 (22): 2958-77. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-02-0126>.

Miskolczi, Zsafia, Michael P. Smith, Emily J. Rowling, Jennifer Ferguson, Jorge Barriuso, et Claudia Wellbrock. 2018. « Collagen Abundance Controls Melanoma Phenotypes through Lineage-Specific Microenvironment Sensing ». *Oncogene* 37 (23): 3166-82. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0209-0>.

Mohammad, Khalid S., Delphine Javelaud, Pierrick G. J. Fournier, Maria Niewolna, C. Ryan McKenna, Xiang H. Peng, Vu Duong, Lauren K. Dunn, Alain Mauviel, et Theresa A. Guise. 2011. « TGF- β -RI Kinase Inhibitor SD-208 Reduces the Development and Progression of Melanoma Bone Metastases ». *Cancer research* 71 (1): 175-84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2651>.

Möller, Katrin, Sara Sigurbjornsdottir, Asgeir O. Arnthorsson, Vivian Pogenberg, Ramile Dilshat, Valerie Fock, Solveig H. Brynjolfsdottir, et al. 2019. « MITF has a central role in regulating starvation-induced autophagy in melanoma ». *Scientific Reports* 9 (janvier): 1055. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37522-6>.

Moon, Hee-Jung, Joel Finney, Li Xu, David Moore, Danny R. Welch, et Minae Mure. 2013a. « MCF-7 Cells Expressing Nuclear Associated Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Exhibit an Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Phenotype and Are Highly Invasive in Vitro ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (42): 30000-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.502310>.

Morad, Golnaz, Beth A. Helmink, Padmanee Sharma, et Jennifer A. Wargo. 2021. « Hallmarks of Response, Resistance, and Toxicity to Immune Checkpoint Blockade ». *Cell* 184 (21): 5309-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.020>.

Moreno-Bueno, Gema, Fernando Salvador, Alberto Martín, Alfredo Floristán, Eva P. Cuevas, Vanesa Santos, Amalia Montes, et al. 2011. « Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas ». *EMBO Molecular Medicine* 3 (9): 528-44. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100156>.

Moriceau, Gatien, Willy Hugo, Aayoung Hong, Hubing Shi, Xiangju Kong, Clarissa C. Yu, Richard C. Koya, et al. 2015. « Tunable-combinatorial Mechanisms of Acquired Resistance Limit the Efficacy of BRAF/MEK Co-targeting but Result in Melanoma Drug Addiction ». *Cancer cell* 27 (2): 240-56. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.018>.

Mousset, Alexandra, Enora Lecorgne, Isabelle Bourget, Pascal Lopez, Kitti Jenovai, Julien Cherfils-Vicini, Chloé Dominici, et al. 2023. « Neutrophil Extracellular Traps Formed during Chemotherapy Confer Treatment Resistance via TGF- β Activation ». *Cancer Cell* 41 (4): 757-775.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.03.008>.

Mouw, Janna K., Guanqing Ou, et Valerie M. Weaver. 2014. « Extracellular Matrix Assembly: A Multiscale Deconstruction ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (12): 771-85. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>.

Muir, Andrew J., Cynthia Levy, Harry L. A. Janssen, Aldo J. Montano-Loza, Mitchell L. Shiffman, Stephen Caldwell, Velimir Luketic, et al. 2019. « Simtuzumab for Primary Sclerosing Cholangitis: Phase 2 Study Results With Insights on the Natural History of the Disease ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 69 (2): 684-98. <https://doi.org/10.1002/hep.30237>.

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>.

Pickup, Mouw et Weaver 2014. « X ». *EMBO Reports* 15 (12). <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>.

- Naba, Alexandra, Karl R. Clauser, Sebastian Hoersch, Hui Liu, Steven A. Carr, et Richard O. Hynes. 2012. « The Matrisome: In Silico Definition and in Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 11 (4): M111.014647. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014647>.
- Nallet-Staub, Flore, Véronique Marsaud, Ling Li, Cristèle Gilbert, Sophie Dodier, Véronique Bataille, Marius Sudol, Meenhard Herlyn, et Alain Mauviel. 2014. « Pro-Invasive Activity of the Hippo Pathway Effectors YAP and TAZ in Cutaneous Melanoma ». *Journal of Investigative Dermatology* 134 (1): 123-32. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.319>.
- Nazarian, Ramin, Hubing Shi, Qi Wang, Xiangju Kong, Richard C. Koya, Hane Lee, Zugen Chen, et al. 2010. « Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation ». *Nature* 468 (7326): 773-77. <https://doi.org/10.1038/nature09626>.
- Nefedova, Y., T. H. Landowski, et W. S. Dalton. 2003. « Bone Marrow Stromal-Derived Soluble Factors and Direct Cell Contact Contribute to de Novo Drug Resistance of Myeloma Cells by Distinct Mechanisms ». *Leukemia* 17 (6): 1175-82. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402924>.
- Neuzillet, Cindy, Annemiläi Tijeras-Raballand, Romain Cohen, Jérôme Cros, Sandrine Faivre, Eric Raymond, et Armand de Gramont. 2015. « Targeting the TGFβ Pathway for Cancer Therapy ». *Pharmacology & Therapeutics* 147 (mars): 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.001>.
- Neve, Anna, Francesco Paolo Cantatore, Nicola Maruotti, Addolorata Corrado, et Domenico Ribatti. 2014. « Extracellular Matrix Modulates Angiogenesis in Physiological and Pathological Conditions ». *BioMed Research International* 2014: 756078. <https://doi.org/10.1155/2014/756078>.
- Nicolas-Boluda, Alba, Javier Vaquero, Lene Vimeux, Thomas Guilbert, Sarah Barrin, Chahrazade Kantari-Mimoun, Matteo Ponzio, et al. s. d. « Tumor stiffening reversion through collagen crosslinking inhibition improves T cell migration and anti-PD-1 treatment ». *eLife* 10: e58688. <https://doi.org/10.7554/eLife.58688>.
- Ninomiya, Go, Suguru Yamada, Masamichi Hayashi, Shigeomi Takeda, Masaya Suenaga, Hideki Takami, Mitsuro Kanda, et al. 2018. « Significance of Lysyl Oxidase-like 2 Gene Expression on the Epithelial-mesenchymal Status of Hepatocellular Carcinoma ». *Oncology Reports* 39 (6): 2664-72. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6349>.
- Nishikawa, Rika, Takeshi Chiyomaru, Hideki Enokida, Satoru Inoguchi, Tomoaki Ishihara, Ryosuke Matsushita, Yusuke Goto, Ichiro Fukumoto, Masayuki Nakagawa, et Naohiko Seki. 2015. « Tumour-Suppressive microRNA-29s Directly Regulate LOXL2 Expression and Inhibit Cancer Cell Migration and Invasion in Renal Cell Carcinoma ». *FEBS Letters* 589 (16): 2136-45. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.005>.
- Norris, J. L., et A. S. Baldwin. 1999. « Oncogenic Ras Enhances NF-kappaB Transcriptional Activity through Raf-Dependent and Raf-Independent Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (20): 13841-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.13841>.
- Obenauf, Anna C., Yilong Zou, Andrew L. Ji, Sakari Vanharanta, Weiping Shu, Hubing Shi, Xiangju Kong, et al. 2015. « Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression ». *Nature* 520 (7547): 368-72. <https://doi.org/10.1038/nature14336>.
- Öhlund, Daniel, Abram Handly-Santana, Giulia Biffi, Ela Elyada, Ana S. Almeida, Mariano Ponz-Sarvisé, Vincenzo Corbo, et al. 2017. « Distinct Populations of Inflammatory Fibroblasts and Myofibroblasts in Pancreatic Cancer ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (3): 579-96. <https://doi.org/10.1084/jem.20162024>.
- Okada, Kazushi, Hee-Jung Moon, Joel Finney, Alex Meier, et Minae Mure. 2018. « Extracellular Processing of Lysyl Oxidase-like 2 and Its Effect on Amine Oxidase Activity ». *Biochemistry* 57 (51): 6973-83.

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01008>.

O'Keeffe, Martina B., Andrea H. Devlin, Alan J. Burns, Tom A. Gardiner, Ian D. Logan, David G. Hirst, et Stephanie R. McKeown. 2008. « Investigation of Pericytes, Hypoxia, and Vascularity in Bladder Tumors: Association with Clinical Outcomes ». *Oncology Research* 17 (3): 93-101. <https://doi.org/10.3727/096504008785055530>.

Olkhanud, Purevdorj B., Bazarragchaa Damdinsuren, Monica Bodogai, Ronald E. Gress, Ranjan Sen, Katarzyna Wejksza, Enkhzol Malchinkhuu, Robert P. Wersto, et Arya Biragyn. 2011. « Tumor-Evoked Regulatory B Cells Promote Breast Cancer Metastasis by Converting Resting CD4⁺ T Cells to T-Regulatory Cells ». *Cancer Research* 71 (10): 3505-15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4316>.

Omholt, Katarina, Doris Kröckel, Ulrik Ringborg, et Johan Hansson. 2006. « Mutations of PIK3CA Are Rare in Cutaneous Melanoma ». *Melanoma Research* 16 (2): 197-200. <https://doi.org/10.1097/01.cmr.0000200488.77970.e3>.

Orgaz, Jose L., Eva Crosas-Molist, Amine Sadok, Anna Perdrix-Rosell, Oscar Maiques, Irene Rodriguez-Hernandez, Jo Monger, et al. 2020. « Myosin II Reactivation and Cytoskeletal Remodeling as a Hallmark and a Vulnerability in Melanoma Therapy Resistance ». *Cancer Cell* 37 (1): 85-103.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.12.003>.

Orimo, Akira, Piyush B. Gupta, Dennis C. Sgroi, Fernando Arenzana-Seisdedos, Thierry Delaunay, Rizwan Naeem, Vincent J. Carey, Andrea L. Richardson, et Robert A. Weinberg. 2005. « Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion ». *Cell* 121 (3): 335-48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>.

Österreicher, Christoph H., Melitta Penz-Österreicher, Sergei I. Grivennikov, Monica Guma, Ekaterina K. Koltsova, Christian Datz, Roman Sasik, Gary Hardiman, Michael Karin, et David A. Brenner. 2011. « Fibroblast-Specific Protein 1 Identifies an Inflammatory Subpopulation of Macrophages in the Liver ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (1): 308-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017547108>.

Ott, Patrick A., Anne Hamilton, Christina Min, Sara Safarzadeh-Amiri, Lauren Goldberg, Joanne Yoon, Herman Yee, et al. 2010. « A Phase II Trial of Sorafenib in Metastatic Melanoma with Tissue Correlates ». *PloS One* 5 (12): e15588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015588>.

Özdemir, Berna C., Tsvetelina Pentcheva-Hoang, Julienne L. Carstens, Xiaofeng Zheng, Chia-Chin Wu, Tyler R. Simpson, Hanane Laklai, et al. 2014. « Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival ». *Cancer Cell* 25 (6): 719-34. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.005>.

Paget, S. 1889. « The Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. 1889 ». *Cancer Metastasis Reviews* 8 (2): 98-101.

Paluncic, Jasmina, Zaklina Kovacevic, Patric J. Jansson, Danuta Kalinowski, Angelika M. Merlot, Michael L.-H. Huang, Hiu Chuen Lok, Sumit Sahni, Darius J. R. Lane, et Des R. Richardson. 2016. « Roads to Melanoma: Key Pathways and Emerging Players in Melanoma Progression and Oncogenic Signaling ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1863 (4): 770-84. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.025>.

Pandol, Stephen, Mouad Edderkaoui, Ilya Gukovsky, Aurelia Lugea, et Anna Gukovskaya. 2009. « Desmoplasia of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 7 (11 0): S44-47. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.07.039>.

Park, Pil-Gu, Su Ji Jo, Min Jung Kim, Hyun Jeong Kim, Ji Hae Lee, Cheol Keun Park, Hyunki Kim, et al. 2017. « Role of LOXL2 in the Epithelial-Mesenchymal Transition and Colorectal Cancer Metastasis ». *Oncotarget* 8 (46): 80325-35. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18170>.

- Park, Sung-Joo, Takayuki Nakagawa, Hidemitsu Kitamura, Toru Atsumi, Hokuto Kamon, Shin-Ichiro Sawa, Daisuke Kamimura, et al. 2004. « IL-6 Regulates in Vivo Dendritic Cell Differentiation through STAT3 Activation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (6): 3844-54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3844>.
- Patarroyo, Manuel, Karl Tryggvason, et Ismo Virtanen. 2002. « Laminin Isoforms in Tumor Invasion, Angiogenesis and Metastasis ». *Seminars in Cancer Biology* 12 (3): 197-207. [https://doi.org/10.1016/S1044-579X\(02\)00023-8](https://doi.org/10.1016/S1044-579X(02)00023-8).
- Peinado, Héctor, Maša Alečković, Simon Lavotshkin, Irina Matei, Bruno Costa-Silva, Gema Moreno-Bueno, Marta Hergueta-Redondo, et al. 2012. « Melanoma Exosomes Educate Bone Marrow Progenitor Cells toward a Pro-Metastatic Phenotype through MET ». *Nature Medicine* 18 (6): 883-91. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>.
- Peinado, Héctor, Maria Del Carmen Iglesias-de la Cruz, David Olmeda, Katalin Csiszar, Keith S. K. Fong, Sonia Vega, Maria Angela Nieto, Amparo Cano, et Francisco Portillo. 2005. « A Molecular Role for Lysyl Oxidase-like 2 Enzyme in Snail Regulation and Tumor Progression ». *The EMBO Journal* 24 (19): 3446-58. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600781>.
- Peinado, Héctor, Gema Moreno-Bueno, David Hardisson, Eduardo Pérez-Gómez, Vanesa Santos, Marta Mendiola, Juan Ignacio de Diego, et al. 2008. « Lysyl Oxidase-like 2 as a New Poor Prognosis Marker of Squamous Cell Carcinomas ». *Cancer Research* 68 (12): 4541-50. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6345>.
- Peinado, Héctor, Francisco Portillo, et Amparo Cano. 2005. « Switching On-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 4 (12): 1749-52. <https://doi.org/10.4161/cc.4.12.2224>.
- Peinado, Héctor, Haiying Zhang, Irina R. Matei, Bruno Costa-Silva, Ayuko Hoshino, Goncalo Rodrigues, Bethan Psaila, et al. 2017. « Pre-Metastatic Niches: Organ-Specific Homes for Metastases ». *Nature Reviews. Cancer* 17 (5): 302-17. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.6>.
- Pelon, Floriane, Brigitte Bourachot, Yann Kieffer, Ilaria Magagna, Fanny Mermet-Meillon, Isabelle Bonnet, Ana Costa, et al. 2020. « Cancer-Associated Fibroblast Heterogeneity in Axillary Lymph Nodes Drives Metastases in Breast Cancer through Complementary Mechanisms ». *Nature Communications* 11 (1): 404. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14134-w>.
- Peng, D. H., C. Ungewiss, P. Tong, L. A. Byers, J. Wang, J. R. Canales, P. A. Villalobos, et al. 2017. « ZEB1 Induces LOXL2-Mediated Collagen Stabilization and Deposition in the Extracellular Matrix to Drive Lung Cancer Invasion and Metastasis ». *Oncogene* 36 (14): 1925-38. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.358>.
- Peng, David H., Bertha Leticia Rodriguez, Lixia Diao, Limo Chen, Jing Wang, Lauren A. Byers, Ying Wei, et al. 2020. « Collagen Promotes Anti-PD-1/PD-L1 Resistance in Cancer through LAIR1-Dependent CD8+ T Cell Exhaustion ». *Nature Communications* 11 (1): 4520. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18298-8>.
- Peng, Liang, Yu-Liang Ran, Hai Hu, Long Yu, Qian Liu, Zhuan Zhou, Yue-Min Sun, et al. 2009. « Secreted LOXL2 Is a Novel Therapeutic Target That Promotes Gastric Cancer Metastasis via the Src/FAK Pathway ». *Carcinogenesis* 30 (10): 1660-69. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp178>.
- Peng, Tao, Xiang Deng, Feng Tian, Zhonghu Li, Peng Jiang, Xin Zhao, Guangyu Chen, et al. 2019. « The Interaction of LOXL2 with GATA6 Induces VEGFA Expression and Angiogenesis in Cholangiocarcinoma ». *International Journal of Oncology* 55 (3): 657-70. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4837>.
- Peng, Weiyi, Jie Qing Chen, Chengwen Liu, Shruti Malu, Caitlin Creasy, Michael T. Tetzlaff, Chunyu Xu, et al. 2016. « Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy ». *Cancer Discovery* 6 (2): 202-16. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0283>.

- Peranzoni, Elisa, Ana Rivas-Caicedo, Houcine Bougherara, Hélène Salmon, et Emmanuel Donnadieu. 2013. « Positive and Negative Influence of the Matrix Architecture on Antitumor Immune Surveillance ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 70 (23): 4431-48. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1339-8>.
- Perrot, Carole Yolande, Delphine Javelaud, et Alain Mauviel. 2013. « Insights into the Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Cutaneous Melanoma ». *Annals of Dermatology* 25 (2): 135-44. <https://doi.org/10.5021/ad.2013.25.2.135>.
- Petersen, Ole William, Helga Lind Nielsen, Thorarinn Gudjonsson, Ren e Villadsen, Fritz Rank, Erik Niebuhr, Mina J. Bissell, et Lone R onnov-Jessen. 2003. « Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer Can Provide a Nonmalignant Stroma ». *The American Journal of Pathology* 162 (2): 391-402. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63834-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63834-5).
- Pickup, Michael W., Hanane Laklai, Irene Acerbi, Philip Owens, Agnieszka E. Gorska, Anna Chytil, Mary Aakre, Valerie M. Weaver, et Harold L. Moses. 2013a. « Stromally Derived Lysyl Oxidase Promotes Metastasis of Transforming Growth Factor- β Deficient Mouse Mammary Carcinomas ». *Cancer research* 73 (17): 5336-46. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0012>.
- Pickup, Michael W, Janna K Mouw, et Valerie M Weaver. 2014. « The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer ». *EMBO Reports* 15 (12): 1243-53. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, et D. R. Marshak. 1999. « Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411): 143-47. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
- Plaschka, Maud, Valentin Benboubker, Maxime Grimont, Justine Berthet, Laurie Tonon, Jonathan Lopez, Myrtille Le-Bouar, et al. 2022. « ZEB1 transcription factor promotes immune escape in melanoma ». *Journal for Immunotherapy of Cancer* 10 (3): e003484. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003484>.
- Polydorou, Christiana, Fotios Mpekris, Panagiotis Papageorgis, Chrysovalantis Voutouri, et Triantafyllos Stylianopoulos. 2017. « Pirfenidone normalizes the tumor microenvironment to improve chemotherapy ». *Oncotarget* 8 (15): 24506-17. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15534>.
- Poulikakos, Poulikos I., Yogindra Persaud, Manickam Janakiraman, Xiangju Kong, Charles Ng, Gatien Moriceau, Hubing Shi, et al. 2011. « RAF Inhibitor Resistance Is Mediated by Dimerization of Aberrantly Spliced BRAF(V600E) ». *Nature* 480 (7377): 387-90. <https://doi.org/10.1038/nature10662>.
- Provenzano, Paolo P., Carlos Cuevas, Amy E. Chang, Vikas K. Goel, Daniel D. Von Hoff, et Sunil R. Hingorani. 2012. « Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *Cancer Cell* 21 (3): 418-29. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007>.
- Provenzano, Paolo P, David R Inman, Kevin W Eliceiri, Justin G Knittel, Long Yan, Curtis T Rueden, John G White, et Patricia J Keely. 2008. « Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression ». *BMC Medicine* 6 (avril): 11. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-6-11>.
- Psaila, Bethan, et David Lyden. 2009. « The Metastatic Niche: Adapting the Foreign Soil ». *Nature Reviews. Cancer* 9 (4): 285-93. <https://doi.org/10.1038/nrc2621>.
- Puente, Angela, Jose Ignacio Fortea, Joaquin Cabezas, Maria Teresa Arias Loste, Paula Iruzubieta, Susana Llerena, Patricia Huelin, Emilio F abrega, et Javier Crespo. 2019. « LOXL2—A New Target in Antifibrogenic Therapy? » *International Journal of Molecular Sciences* 20 (7): 1634. <https://doi.org/10.3390/ijms20071634>.
- Puissant, Alexandre, Maeva Dufies, Nina Fenouille, Issam Ben Sahra, Arnaud Jacquel, Guillaume Robert, Thomas Cluzeau, et al. 2012. « Imatinib triggers mesenchymal-like conversion of CML cells associated with increased aggressiveness ». *Journal of Molecular Cell Biology* 4 (4): 207-20. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs010>.

Punternvoll, Hanne Eknes, Xiaohong R. Yang, Hildegunn Høberg Vetti, Ingeborg M. Bachmann, Marie Françoise Avril, Meriem Benfodda, Caterina Catricalà, et al. 2013. « Melanoma Prone Families with CDK4 Germline Mutation: Phenotypic Profile and Associations with MC1R Variants ». *Journal of Medical Genetics* 50 (4): 264-70. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101455>.

Pylyayeva, Yuliya, Kelly M. Gillen, William Gerald, Hilary E. Beggs, Louis F. Reichardt, et Filippo G. Giancotti. 2009. « Ras- and PI3K-Dependent Breast Tumorigenesis in Mice and Humans Requires Focal Adhesion Kinase Signaling ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (2): 252-66. <https://doi.org/10.1172/JCI37160>.

Qin, Z., G. Richter, T. Schüler, S. Ibe, X. Cao, et T. Blankenstein. 1998. « B Cells Inhibit Induction of T Cell-Dependent Tumor Immunity ». *Nature Medicine* 4 (5): 627-30. <https://doi.org/10.1038/nm0598-627>.

Qiu, Zhize, Shiqi Qiu, Wenli Mao, Wu Lin, Qiqi Peng, et Hao Chang. 2022. « LOXL2 Reduces 5-FU Sensitivity through the Hedgehog/BCL2 Signaling Pathway in Colorectal Cancer ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, décembre, 15353702221139203. <https://doi.org/10.1177/15353702221139203>.

Quante, Michael, Shui Ping Tu, Hiroyuki Tomita, Tamas Gonda, Sophie S. W. Wang, Shigeo Takashi, Gwang Ho Baik, et al. 2011. « Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth ». *Cancer Cell* 19 (2): 257-72. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.020>.

Rambow, Florian, Jean-Christophe Marine, et Colin R. Goding. 2019. « Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities ». *Genes & Development* 33 (19-20): 1295-1318. <https://doi.org/10.1101/gad.329771.119>.

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>.

Rathore, M., C. Girard, M. Ohanna, M. Tichet, R. Ben Jouira, E. Garcia, F. Larbret, et al. 2019. « Cancer Cell-Derived Long Pentraxin 3 (PTX3) Promotes Melanoma Migration through a Toll-like Receptor 4 (TLR4)/NF- κ B Signaling Pathway ». *Oncogene* 38 (30): 5873-89. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0848-9>.

Reger de Moura, Coralie, Maxime Battistella, Anjum Sohail, Anne Caudron, Jean Paul Feugeas, Marie-Pierre Podgorniak, Cecile Pages, et al. 2019. « Discoidin Domain Receptors: A Promising Target in Melanoma ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 32 (5): 697-707. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12809>.

Ren, Pengyu, Xiaorong Niu, Ruimin Zhao, Junsong Liu, Wanli Ren, Hao Dai, Jiayu Chen, et al. 2022. « Long Non-Coding RNA AGAP2-AS1 Promotes Cell Proliferation and Invasion through Regulating miR-193a-3p/LOXL4 Axis in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 21 (7): 697-707. <https://doi.org/10.1080/15384101.2021.2016197>.

Restivo, Gaetana, Johanna Diener, Phil F. Cheng, Gregor Kiowski, Mario Bonalli, Thomas Biedermann, Ernst Reichmann, Mitchell P. Levesque, Reinhard Dummer, et Lukas Sommer. 2017. « The low affinity neurotrophin receptor CD271 regulates phenotype switching in melanoma ». *Nature Communications* 8 (décembre): 1988. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01573-6>.

Ribas, Antoni. 2007. « Anti-CTLA4 Antibody Clinical Trials in Melanoma ». *Update on cancer therapeutics* 2 (3): 133-39. <https://doi.org/10.1016/j.uct.2007.09.001>.

Ribas, Antoni. 2012. « Tumor Immunotherapy Directed at PD-1 ». *The New England Journal of Medicine* 366 (26): 2517-19. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1205943>.

Ribas, Antoni, Begoña Comin-Anduix, James S. Economou, Timothy R. Donahue, Pilar de la Rocha, Lilah F. Morris, Jason Jalil, et al. 2009. « Intratumoral Immune Cell Infiltrates, FoxP3, and Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Patients with Melanoma Undergoing CTLA4 Blockade ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (1): 390-99.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0783>.

Richard, Geoffrey, Stéphane Dalle, Marie-Ambre Monet, Maud Ligier, Amélie Boespflug, Roxane M. Pommier, Arnaud de la Fouchardière, et al. 2016. « ZEB1-Mediated Melanoma Cell Plasticity Enhances Resistance to MAPK Inhibitors ». *EMBO Molecular Medicine* 8 (10): 1143-61. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505971>.

Riching, Kristin M., Benjamin L. Cox, Max R. Salick, Carolyn Pehlke, Andrew S. Riching, Susan M. Ponik, Benjamin R. Bass, et al. 2014. « 3D Collagen Alignment Limits Protrusions to Enhance Breast Cancer Cell Persistence ». *Biophysical Journal* 107 (11): 2546-58. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.10.035>.

Richmond, Ann. 2002. « NF- κ B, CHEMOKINE GENE TRANSCRIPTION AND TUMOUR GROWTH ». *Nature reviews. Immunology* 2 (9): 664-74. <https://doi.org/10.1038/nri887>.

Rick, Jonathan W., Ankush Chandra, Cecilia Dalle Ore, Alan T. Nguyen, Garima Yagnik, et Manish K. Aghi. 2019. « Fibronectin in Malignancy: Cancer-Specific Alterations, Protumoral Effects, and Therapeutic Implications ». *Seminars in Oncology* 46 (3): 284-90. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.08.002>.

Ridge, Sarah M., Francis J. Sullivan, et Sharon A. Glynn. 2017. « Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression ». *Molecular Cancer* 16 (1): 31. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0597-8>.

Riedel, Angela, David Shorthouse, Lisa Haas, Benjamin A Hall, et Jacqueline Shields. 2016. « Tumor Induced Stromal Reprogramming Drives Lymph Node Transformation ». *Nature immunology* 17 (9): 1118-27. <https://doi.org/10.1038/ni.3492>.

Riesenberg, Stefanie, Angela Groetchen, Robert Siddaway, Tobias Bald, Julia Reinhardt, Denise Smorra, Judith Kohlmeyer, et al. 2015. « MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment ». *Nature Communications* 6 (novembre): 8755. <https://doi.org/10.1038/ncomms9755>.

Robert, Caroline, Jean J. Grob, Daniil Stroyakovskiy, Boguslawa Karaszewska, Axel Hauschild, Evgeny Levchenko, Vanna Chiarion Sileni, et al. 2019. « Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma ». *The New England Journal of Medicine* 381 (7): 626-36. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1904059>.

Robert, Caroline, et Christine Mateus. 2011. « [Anti-CTLA-4 monoclonal antibody: a major step in the treatment of metastatic melanoma] ». *Medecine Sciences: M/S* 27 (10): 850-58. <https://doi.org/10.1051/medsci/20112710013>.

Robert, Caroline, Antoni Ribas, Jedd D. Wolchok, F. Stephen Hodi, Omid Hamid, Richard Kefford, Jeffrey S. Weber, et al. 2014. « Anti-Programmed-Death-Receptor-1 Treatment with Pembrolizumab in Ipilimumab-Refractory Advanced Melanoma: A Randomised Dose-Comparison Cohort of a Phase 1 Trial ». *Lancet (London, England)* 384 (9948): 1109-17. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60958-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60958-2).

Robert, Caroline, Jacob Schachter, Georgina V. Long, Ana Arance, Jean Jacques Grob, Laurent Mortier, Adil Daud, et al. 2015. « Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 372 (26): 2521-32. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503093>.

Robert, Guillaume, Cédric Gaggioli, Olivier Baillet, Carine Chavey, Patricia Abbe, Edith Aberdam, Emilie Sabatié, et al. 2006. « SPARC Represses E-Cadherin and Induces Mesenchymal Transition during Melanoma Development ». *Cancer Research* 66 (15): 7516-23. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3189>.

Roberts, P. J., et C. J. Der. 2007. « Targeting the Raf-MEK-ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade for the Treatment of Cancer ». *Oncogene* 26 (22): 3291-3310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>.

Robles-Espinoza, Carla Daniela, Mark Harland, Andrew J. Ramsay, Lauren G. Aoude, Víctor Quesada, Zhihao Ding, Karen A. Pooley, et al. 2014. « POT1 Loss-of-Function Variants Predispose to Familial Melanoma ». *Nature Genetics* 46 (5): 478-81. <https://doi.org/10.1038/ng.2947>.

Rodriguez, Hector M., Maria Vaysberg, Amanda Mikels, Scott McCauley, Arleene C. Velayo, Carlos Garcia, et Victoria Smith. 2010. « Modulation of Lysyl Oxidase-like 2 Enzymatic Activity by an Allosteric Antibody Inhibitor ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (27): 20964-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094136>.

Roesch, A. 2015. « Tumor Heterogeneity and Plasticity as Elusive Drivers for Resistance to MAPK Pathway Inhibition in Melanoma ». *Oncogene* 34 (23): 2951-57. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.249>.

Rossow, Leonie, Simona Veitl, Sandra Vorlová, Jacqueline K. Wax, Anja E. Kuhn, Verena Maltzahn, Berin Upcin, et al. 2018. « LOX-catalyzed collagen stabilization is a proximal cause for intrinsic resistance to chemotherapy ». *Oncogene* 37 (36): 4921-40. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0320-2>.

Rovera, Christopher, Iona Berestjuk, Margaux Lecacheur, Cassandre Tavernier, Serena Diazzi, Sabrina Pisano, Marie Irondelle, et al. 2022. « Secretion of IL1 by Dedifferentiated Melanoma Cells Inhibits JAK1-STAT3–Driven Actomyosin Contractility of Lymph Node Fibroblastic Reticular Cells ». *Cancer Research* 82 (9): 1774-88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-0501>.

Rowbottom, Martin W., Gretchen Bain, Imelda Calderon, Taylor Lasof, David Lonergan, Andiliy Lai, Fei Huang, et al. 2017. « Identification of 4-(Aminomethyl)-6-(Trifluoromethyl)-2-(Phenoxy)Pyridine Derivatives as Potent, Selective, and Orally Efficacious Inhibitors of the Copper-Dependent Amine Oxidase, Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2) ». *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (10): 4403-23. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00345>.

Rozario, Tania, et Douglas W. DeSimone. 2010. « The Extracellular Matrix in Development and Morphogenesis: A Dynamic View ». *Developmental Biology* 341 (1): 126-40. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>.

Ruiter, Dirk, Thomas Bogenrieder, David Elder, et Meenhard Herlyn. 2002. « Melanoma-Stroma Interactions: Structural and Functional Aspects ». *The Lancet. Oncology* 3 (1): 35-43. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(01\)00620-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(01)00620-9).

Sáez-Ayala, Magali, María F. Montenegro, Luis Sánchez-Del-Campo, María Piedad Fernández-Pérez, Soledad Chazarra, Rasmus Freter, Mark Middleton, et al. 2013. « Directed Phenotype Switching as an Effective Antimelanoma Strategy ». *Cancer Cell* 24 (1): 105-19. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.009>.

Sahai, Erik, Igor Astsaturov, Edna Cukierman, David G. DeNardo, Mikala Egeblad, Ronald M. Evans, Douglas Fearon, et al. 2020. « A Framework for Advancing Our Understanding of Cancer-Associated Fibroblasts ». *Nature Reviews Cancer* 20 (3): 174-86. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>.

Salmon, Hélène, Katarzyna Franciszkiewicz, Diane Damotte, Marie-Caroline Dieu-Nosjean, Pierre Validire, Alain Trautmann, Fathia Mami-Chouaib, et Emmanuel Donnadieu. 2012. « Matrix Architecture Defines the Preferential Localization and Migration of T Cells into the Stroma of Human Lung Tumors ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (3): 899-910. <https://doi.org/10.1172/JCI45817>.

Salvador, Fernando, Alberto Martin, Celia López-Menéndez, Gema Moreno-Bueno, Vanesa Santos, Alberto Vázquez-Naharro, Patricia G. Santamaria, et al. 2017. « Lysyl Oxidase-like Protein LOXL2 Promotes Lung Metastasis of Breast Cancer ». *Cancer Research* 77 (21): 5846-59. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3152>.

Sample, Ashley, et Yu-Ying He. 2018. « Mechanisms and Prevention of UV-Induced Melanoma ». *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 34 (1): 13-24. <https://doi.org/10.1111/phpp.12329>.

Sandri, Silvana, Fernanda Faião-Flores, Manoela Tiago, Paula Comune Pennacchi, Renato Ramos Massaro, Débora Kristina Alves-Fernandes, Gustavo Noriz Berardinelli, et al. 2016. « Vemurafenib Resistance Increases Melanoma Invasiveness and Modulates the Tumor Microenvironment by MMP-2 Upregulation ». *Pharmacological Research* 111 (septembre): 523-33. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.017>.

Santamaría, Patricia G., Pierre Dubus, José Bustos-Tauler, Alfredo Floristán, Alberto Vázquez-Naharro, Saleta Morales, Amparo Cano, et Francisco Portillo. 2022. « Loxl2 and Loxl3 Paralogues Play Redundant Roles during Mouse Development ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (10): 5730. <https://doi.org/10.3390/ijms23105730>.

Santamaría, Patricia G., Alfredo Floristán, Bárbara Fontanals-Cirera, Alberto Vázquez-Naharro, Vanesa Santos, Saleta Morales, Lourdes Yuste, et al. 2018. « Lysyl oxidase-like 3 is required for melanoma cell survival by maintaining genomic stability ». *Cell Death and Differentiation* 25 (5): 935-50. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0030-2>.

Saux, Claude Jourdan-Le, Heike Tronecker, Ljubica Bogic, Gillian D. Bryant-Greenwood, Charles D. Boyd, et Katalin Csiszar. 1999. « The LOXL2 Gene Encodes a New Lysyl Oxidase-like Protein and Is Expressed at High Levels in Reproductive Tissues * ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (18): 12939-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12939>.

Schaefer, Liliana, et Roland M. Schaefer. 2010. « Proteoglycans: From Structural Compounds to Signaling Molecules ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 237-46. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0821-y>.

Schietke, Ruth, Christina Warnecke, Ingrid Wacker, Johannes Schödel, David R. Mole, Valentina Campan, Kerstin Amann, et al. 2010. « The Lysyl Oxidases LOX and LOXL2 Are Necessary and Sufficient to Repress E-cadherin in Hypoxia ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (9): 6658-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.042424>.

Schilter, Heidi, Alison D. Findlay, Lara Perryman, Tin T. Yow, Joshua Moses, Amna Zahoor, Craig I. Turner, et al. 2019. « The Lysyl Oxidase like 2/3 Enzymatic Inhibitor, PXS-5153A, Reduces Crosslinks and Ameliorates Fibrosis ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23 (3): 1759-70. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14074>.

Schütze, Friedrich, Florian Röhrig, Sandra Vorlová, Sabine Gätzner, Anja Kuhn, Süleyman Ergün, et Erik Henke. 2015. « Inhibition of Lysyl Oxidases Improves Drug Diffusion and Increases Efficacy of Cytotoxic Treatment in 3D Tumor Models ». *Scientific Reports* 5 (décembre): 17576. <https://doi.org/10.1038/srep17576>.

Schwartz, M. A., et R. K. Assoian. 2001. « Integrins and Cell Proliferation: Regulation of Cyclin-Dependent Kinases via Cytoplasmic Signaling Pathways ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 14): 2553-60. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.14.2553>.

Schwarzbauer, Jean E. 1991. « Alternative Splicing of Fibronectin: Three Variants, Three Functions ». *BioEssays* 13 (10): 527-33. <https://doi.org/10.1002/bies.950131006>.

Seip, Kotryna, Karianne G. Fleten, Anna Barkovskaya, Vigdis Nygaard, Mads H. Haugen, Birgit Ø Engesæter, Gunhild M. Mælandsmo, et Lina Prasmickaite. 2016. « Fibroblast-Induced Switching to the Mesenchymal-like Phenotype and PI3K/mTOR Signaling Protects Melanoma Cells from BRAF Inhibitors ». *Oncotarget* 7 (15): 19997-15. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7671>.

Semenza, Gregg L. 2012. « Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells ». *Trends in molecular medicine* 18 (9): 534-43. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.08.001>.

Shackleton, Mark. 2010. « Moving Targets That Drive Cancer Progression ». *New England Journal of Medicine* 363 (9): 885-86. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1006328>.

Shain, A. Hunter, et Boris C. Bastian. 2016. « From Melanocytes to Melanomas ». *Nature Reviews. Cancer* 16 (6): 345-58. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>.

Shain, Kenneth H., Danielle N. Yarde, Mark B. Meads, Mei Huang, Richard Jove, Lori A. Hazlehurst, et William S. Dalton. 2009. « Beta1 Integrin Adhesion Enhances IL-6-Mediated STAT3 Signaling in Myeloma Cells: Implications for Microenvironment Influence on Tumor Survival and Proliferation ». *Cancer Research* 69 (3): 1009-15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2419>.

Shao, Yongping, et Andrew E. Aplin. 2010. « Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells ». *Cancer research* 70 (16): 6670-81. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4471>.

Sharma, Padmanee, Siwen Hu-Lieskovan, Jennifer A. Wargo, et Antoni Ribas. 2017. « Primary, Adaptive and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy ». *Cell* 168 (4): 707-23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>.

Shaul, Yoav D., et Rony Seger. 2007. « The MEK/ERK Cascade: From Signaling Specificity to Diverse Functions ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1773 (8): 1213-26. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.005>.
Shi, Hubing, Willy Hugo, Xiangju Kong, Aayoung Hong, Richard C. Koya, Gatien Moriceau, Thine Chodon, et al. 2014. « Acquired Resistance and Clonal Evolution in Melanoma during BRAF Inhibitor Therapy ». *Cancer Discovery* 4 (1): 80-93. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0642>.

Shi, Hubing, Gatien Moriceau, Xiangju Kong, Mi-Kyung Lee, Hane Lee, Richard C. Koya, Charles Ng, et al. 2012. « Melanoma Whole-Exome Sequencing Identifies (V600E)B-RAF Amplification-Mediated Acquired B-RAF Inhibitor Resistance ». *Nature Communications* 3 (mars): 724. <https://doi.org/10.1038/ncomms1727>.

Sica, Antonio, et Vincenzo Bronte. 2007. « Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (5): 1155-66. <https://doi.org/10.1172/JCI31422>.

Sinha, Pratima, Virginia K. Clements, Stephanie K. Bunt, Steven M. Albelda, et Suzanne Ostrand-Rosenberg. 2007. « Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Macrophages Subverts Tumor Immunity toward a Type 2 Response ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (2): 977-83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.977>.

Skobe, M., L. M. Hamberg, T. Hawighorst, M. Schirner, G. L. Wolf, K. Alitalo, et M. Detmar. 2001. « Concurrent Induction of Lymphangiogenesis, Angiogenesis, and Macrophage Recruitment by Vascular Endothelial Growth Factor-C in Melanoma ». *The American Journal of Pathology* 159 (3): 893-903. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61765-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61765-8).

Smith, Michael P., Berta Sanchez-Laorden, Kate O'Brien, Holly Brunton, Jennifer Ferguson, Helen Young, Nathalie Dhomen, et al. 2014. « The Immune Microenvironment Confers Resistance to MAPK Pathway Inhibitors through Macrophage-Derived TNF α ». *Cancer Discovery* 4 (10): 1214-29. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-1007>.

Soler-Cardona, Ana, Agnes Forsthuber, Katharina Lipp, Stefanie Ebersberger, Magdalena Heinz, Klaudia Schossleitner, Elisabeth Buchberger, et al. 2018. « CXCL5 Facilitates Melanoma Cell-Neutrophil Interaction and Lymph Node Metastasis ». *The Journal of Investigative Dermatology* 138 (7): 1627-35. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.01.035>.

Somasundaram, Rajasekharan, Gao Zhang, Mizuho Fukunaga-Kalabis, Michela Perego, Clemens Krepler, Xiaowei Xu, Christine Wagner, et al. 2017. « Tumor-Associated B-Cells Induce Tumor Heterogeneity and Therapy Resistance ». *Nature Communications* 8 (1): 607. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00452-4>.

Song, Kai, Jenna K. Minami, Arthur Huang, Siavash R. Dehkordi, Shirley H. Lomeli, Jens Luebeck, Mark H. Goodman, et al. 2022. « Plasticity of Extrachromosomal and Intrachromosomal BRAF Amplifications in Overcoming Targeted Therapy Dosage Challenges ». *Cancer Discovery* 12 (4): 1046-69. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0936>.

Sosman, Jeffrey A., Kevin B. Kim, Lynn Schuchter, Rene Gonzalez, Anna C. Pavlick, Jeffrey S. Weber, Grant A. McArthur, et al. 2012. « Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib ». *The New England journal of medicine* 366 (8): 707-14. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112302>.

Sottile, Jane, et Denise C. Hocking. 2002. « Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell-Matrix Adhesions ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (10):

3546-59. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-01-0048>.

Spranger, Stefani, Riyue Bao, et Thomas F. Gajewski. 2015. « Melanoma-Intrinsic β -Catenin Signalling Prevents Anti-Tumour Immunity ». *Nature* 523 (7559): 231-35. <https://doi.org/10.1038/nature14404>.

Stahtea, Xanthi N., Andeas E. Roussidis, Ioannis Kanakis, George N. Tzanakakis, George Chalkiadakis, Dimitris Mavroudis, Dimitris Kletsas, et Nikos K. Karamanos. 2007. « Imatinib Inhibits Colorectal Cancer Cell Growth and Suppresses Stromal-Induced Growth Stimulation, MT1-MMP Expression and pro-MMP2 Activation ». *International Journal of Cancer* 121 (12): 2808-14. <https://doi.org/10.1002/ijc.23029>.

Stramer, Brian M., Ryoichi Mori, et Paul Martin. 2007. « The Inflammation-Fibrosis Link? A Jekyll and Hyde Role for Blood Cells during Wound Repair ». *The Journal of Investigative Dermatology* 127 (5): 1009-17. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700811>.

Straussman, Ravid, Teppei Morikawa, Kevin Shee, Michal Barzily-Rokni, Zhi Rong Qian, Jinyan Du, Ashli Davis, et al. 2012. « Tumor microenvironment induces innate RAF-inhibitor resistance through HGF secretion ». *Nature* 487 (7408): 500-504. <https://doi.org/10.1038/nature11183>.

Su, Shicheng, Jianing Chen, Herui Yao, Jiang Liu, Shubin Yu, Liyan Lao, Minghui Wang, et al. 2018. « CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness ». *Cell* 172 (4): 841-856.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.009>.

Sun, Chong, Liqin Wang, Sidong Huang, Guus J. J. E. Heynen, Anirudh Prahallad, Caroline Robert, John Haanen, et al. 2014. « Reversible and Adaptive Resistance to BRAF(V600E) Inhibition in Melanoma ». *Nature* 508 (7494): 118-22. <https://doi.org/10.1038/nature13121>.

Tachibana, Tsuyoshi, Hisashi Onodera, Tatsuaki Tsuruyama, Akira Mori, Satoshi Nagayama, Hiroshi Hiai, et Masayuki Imamura. 2005. « Increased Intratumor α 24-Positive Natural Killer T Cells: A Prognostic Factor for Primary Colorectal Carcinomas ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (20): 7322-27. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0877>.

Tai, Yu-Ling, Lih-Chyang Chen, et Tang-Long Shen. 2015. « Emerging Roles of Focal Adhesion Kinase in Cancer ». *BioMed Research International* 2015: 690690. <https://doi.org/10.1155/2015/690690>.

Tan, Jin-Dian, Mei-Feng Zhou, Song Yang, et Jian-Ping Lin. 2022. « Long Noncoding RNA HCP5 Promotes Osteosarcoma Cell Proliferation, Invasion, and Migration via the miR-29b-3p-LOXL2 Axis ». *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 38 (10): 960-70. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12577>.

Tanaka, Nobutake, Suguru Yamada, Fuminori Sonohara, Masaya Suenaga, Masamichi Hayashi, Hideki Takami, Yukiko Niwa, et al. 2018. « Clinical Implications of Lysyl Oxidase-Like Protein 2 Expression in Pancreatic Cancer ». *Scientific Reports* 8 (1): 9846. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28253-9>.

Tang, S. S., P. C. Trackman, et H. M. Kagan. 1983. « Reaction of Aortic Lysyl Oxidase with Beta-Aminopropionitrile ». *The Journal of Biological Chemistry* 258 (7): 4331-38.

Theocharis, Achilleas D., Spyros S. Skandalis, Chrysostomi Gialeli, et Nikos K. Karamanos. 2016. « Extracellular Matrix Structure ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 97 (février): 4-27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.

Tian, Jing, He-Xi Sun, Ying-Chun Li, Li Jiang, Shan-Ling Zhang, et Quan Hao. 2019. « LOXL 2 Promotes The Epithelial-Mesenchymal Transition And Malignant Progression Of Cervical Cancer ». *OncoTargets and Therapy* 12: 8947-54. <https://doi.org/10.2147/OTT.S217794>.

Tichet, Mélanie, Virginie Prod'Homme, Nina Fenouille, Damien Ambrosetti, Aude Mallavialle, Michael Cerezo, Mickaël Ohanna, et al. 2015. « Tumour-Derived SPARC Drives Vascular Permeability and Extravasation through Endothelial VCAM1 Signalling to Promote Metastasis ». *Nature Communications* 6 (1): 6993. <https://doi.org/10.1038/ncomms7993>.

- Tirosh, Itay, Benjamin Izar, Sanjay M. Prakadan, Marc H. Wadsworth, Daniel Treacy, John J. Trombetta, Asaf Rotem, et al. 2016. « Dissecting the Multicellular Ecosystem of Metastatic Melanoma by Single-Cell RNA-Seq ». *Science (New York, N.Y.)* 352 (6282): 189-96. <https://doi.org/10.1126/science.aad0501>.
- Titus-Ernstoff, Linda, Ann E. Perry, Steven K. Spencer, Jennifer J. Gibson, Bernard F. Cole, et Marc S. Ernstoff. 2005. « Pigmentary Characteristics and Moles in Relation to Melanoma Risk ». *International Journal of Cancer* 116 (1): 144-49. <https://doi.org/10.1002/ijc.21001>.
- Titz, Bjoern, Anastasia Lomova, Allison Le, Willy Hugo, Xiangju Kong, Johanna ten Hoeve, Michael Friedman, et al. 2016. « JUN Dependency in Distinct Early and Late BRAF Inhibition Adaptation States of Melanoma ». *Cell Discovery* 2 (1): 1-19. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2016.28>.
- Tjin, Gavin, Eric S. White, Alen Faiz, Delphine Sicard, Daniel J. Tschumperlin, Annabelle Mahar, Eleanor P. W. Kable, et Janette K. Burgess. 2017. « Lysyl Oxidases Regulate Fibrillar Collagen Remodelling in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Disease Models & Mechanisms* 10 (11): 1301-12. <https://doi.org/10.1242/dmm.030114>.
- Tommelein, Joke, Laurine Verset, Tom Boterberg, Pieter Demetter, Marc Bracke, et Olivier De Wever. 2015. « Cancer-Associated Fibroblasts Connect Metastasis-Promoting Communication in Colorectal Cancer ». *Frontiers in Oncology* 5: 63. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00063>.
- Torres-Collado, Antoni Xavier, Jeffrey Knott, et Ali R. Jazirehi. 2018. « Reversal of Resistance in Targeted Therapy of Metastatic Melanoma: Lessons Learned from Vemurafenib (BRAFFV600E-Specific Inhibitor) ». *Cancers* 10 (6): 157. <https://doi.org/10.3390/cancers10060157>.
- Tsao, H., X. Zhang, E. Benoit, et F. G. Haluska. 1998. « Identification of PTEN/MMAC1 Alterations in Uncultured Melanomas and Melanoma Cell Lines ». *Oncogene* 16 (26): 3397-3402. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201881>.
- Tsao, Hensin, Lynda Chin, Levi A. Garraway, et David E. Fisher. 2012. « Melanoma: from mutations to medicine ». *Genes & Development* 26 (11): 1131-55. <https://doi.org/10.1101/gad.191999.112>.
- 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>.
- Tu, Megan M., Francis Y. F. Lee, Robert T. Jones, Abigail K. Kimball, Elizabeth Saravia, Robert F. Graziano, Brianne Coleman, et al. 2019. « Targeting DDR2 Enhances Tumor Response to Anti-PD-1 Immunotherapy ». *Science Advances* 5 (2): eaav2437. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav2437>.
- Turajlic, S., S. J. Furney, G. Stamp, S. Rana, G. Ricken, Y. Oduko, G. Saturno, et al. 2014. « Whole-Genome Sequencing Reveals Complex Mechanisms of Intrinsic Resistance to BRAF Inhibition ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 25 (5): 959-67. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu049>.
- Turajlic, Samra, Andrea Sottoriva, Trevor Graham, et Charles Swanton. 2019. « Resolving Genetic Heterogeneity in Cancer ». *Nature Reviews Genetics* 20 (7): 404-16. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0114-6>.
- Turley, Shannon J., Viviana Cremasco, et Jillian L. Astarita. 2015. « Immunological Hallmarks of Stromal Cells in the Tumour Microenvironment ». *Nature Reviews Immunology* 15 (11): 669-82. <https://doi.org/10.1038/nri3902>.
- Ugurel, Selma, Joachim Röhm, Paolo A. Ascierto, Keith T. Flaherty, Jean Jacques Grob, Axel Hauschild, James Larkin, et al. 2017. « Survival of Patients with Advanced Metastatic Melanoma: The Impact of Novel Therapies—Update 2017 ». *European Journal of Cancer* 83 (septembre): 247-57.

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.06.028>.

Valiente, Manuel, Anna C. Obenauf, Xin Jin, Qing Chen, Xiang H.-F. Zhang, Derek J. Lee, Jamie E. Chaft, et al. 2014. « Serpins Promote Cancer Cell Survival and Vascular Cooption in Brain Metastasis ». *Cell* 156 (5): 1002-16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.040>.

Vallet, Sylvain D., Coline Berthollier, Romain Salza, Laurent Muller, et Sylvie Ricard-Blum. 2020. « The Interactome of Cancer-Related Lysyl Oxidase and Lysyl Oxidase-Like Proteins ». *Cancers* 13 (1): 71. <https://doi.org/10.3390/cancers13010071>.

Van Allen, Eliezer M., Nikhil Wagle, Antje Sucker, Daniel Treacy, Cory Johannessen, Eva M. Goetz, Chelsea S. Place, et al. 2014. « The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma ». *Cancer discovery* 4 (1): 94-109. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0617>.

Van Belle, P., U. Rodeck, I. Nuamah, A. C. Halpern, et D. E. Elder. 1996. « Melanoma-associated expression of transforming growth factor-beta isoforms. » *The American Journal of Pathology* 148 (6): 1887-94.

Van Obberghen-Schilling, Ellen, Richard P. Tucker, Falk Saupe, Isabelle Gasser, Botond Cseh, et Gertraud Orend. 2011. « Fibronectin and Tenascin-C: Accomplices in Vascular Morphogenesis during Development and Tumor Growth ». *The International Journal of Developmental Biology* 55 (4-5): 511-25. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103243eo>.

Vandamme, Niels, Geertrui Denecker, Kenneth Bruneel, Gillian Blancke, Özden Akay, Joachim Taminau, Jordy De Coninck, et al. 2020. « The EMT Transcription Factor ZEB2 Promotes Proliferation of Primary and Metastatic Melanoma While Suppressing an Invasive, Mesenchymal-Like Phenotype ». *Cancer Research* 80 (14): 2983-95. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2373>.

Vandenbroucke, Roosmarijn E., et Claude Libert. 2014. « Is There New Hope for Therapeutic Matrix Metalloproteinase Inhibition? » *Nature Reviews. Drug Discovery* 13 (12): 904-27. <https://doi.org/10.1038/nrd4390>.

Vaupel, Peter, Arnulf Mayer, et Michael Höckel. 2004. « Tumor Hypoxia and Malignant Progression ». *Methods in Enzymology* 381: 335-54. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)81023-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)81023-1).

Vázquez-Naharro, Alberto, José Bustos-Tauler, Alfredo Floristán, Lourdes Yuste, Sara S. Oltra, Antònia Vinyals, Gema Moreno-Bueno, et al. 2022. « Loxl3 Promotes Melanoma Progression and Dissemination Influencing Cell Plasticity and Survival ». *Cancers* 14 (5): 1200. <https://doi.org/10.3390/cancers14051200>.

Verfaillie, Annelien, Hana Imrichova, Zeynep Kalender Atak, Michael Dewaele, Florian Rambow, Gert Hulselmans, Valerie Christiaens, et al. 2015. « Decoding the Regulatory Landscape of Melanoma Reveals TEADS as Regulators of the Invasive Cell State ». *Nature Communications* 6 (1): 6683. <https://doi.org/10.1038/ncomms7683>.

Vihinen, Pia, et Veli-Matti Kähäri. 2002. « Matrix Metalloproteinases in Cancer: Prognostic Markers and Therapeutic Targets ». *International Journal of Cancer* 99 (2): 157-66. <https://doi.org/10.1002/ijc.10329>.

Villanueva, Jessie, Adina Vultur, et Meenhard Herlyn. 2011. « Resistance to BRAF Inhibitors: Unraveling Mechanisms and Future Treatment Options ». *Cancer Research* 71 (23): 7137-40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1243>.

Villanueva, Jessie, Adina Vultur, John T. Lee, Rajasekharan Somasundaram, Mizuho Fukunaga-Kalabis, Angela K. Cipolla, Bradley Wubbenhorst, et al. 2010. « Acquired Resistance to BRAF Inhibitors Mediated by a RAF Kinase Switch in Melanoma Can Be Overcome by Cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K ». *Cancer Cell* 18 (6): 683-95. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.023>.

Visse, Robert, et Hideaki Nagase. 2003. « Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry ». *Circulation Research* 92 (8): 827-39.

<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>.

Waizenegger, Irene C., Anke Baum, Steffen Steurer, Heinz Stadtmüller, Gerd Bader, Otmar Schaaf, Pilar Garin-Chesa, et al. 2016. « A Novel RAF Kinase Inhibitor with DFG-Out-Binding Mode: High Efficacy in BRAF-Mutant Tumor Xenograft Models in the Absence of Normal Tissue Hyperproliferation ». *Molecular Cancer Therapeutics* 15 (3): 354-65. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0617>.

Wang, Fan, Guiyin Sun, Chunfang Peng, Jiangyan Chen, Jin Quan, Chunrong Wu, Xiaojuan Lian, Weijun Tang, et Debing Xiang. 2021. « ZEB1 Promotes Colorectal Cancer Cell Invasion and Disease Progression by Enhanced LOXL2 Transcription ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 14 (1): 9-23.

Wang, Meili, Xiulan Zhao, Dongwang Zhu, Tiejun Liu, Xiaohui Liang, Fang Liu, Yanhui Zhang, Xueyi Dong, et Baocun Sun. 2017. « HIF-1 α promoted vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma through LOXL2 up-regulation in hypoxic tumor microenvironment ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 36 (avril): 60. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0533-1>.

Wang, Tao, Min Xiao, Yingbin Ge, Clemens Krepler, Eric Belser, Alfonso Lopez-Coral, Xiaowei Xu, et al. 2015. « BRAF Inhibition Stimulates Melanoma-Associated Macrophages to Drive Tumor Growth ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (7): 1652-64. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1554>.

Wang, Xiaokang, Shulong Wu, Yi Yang, et Jingjing Zhao. 2022. « LncRNA CARMN Affects Hepatocellular Carcinoma Prognosis by Regulating the miR-192-5p/LOXL2 Axis ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2022: 9277360. <https://doi.org/10.1155/2022/9277360>.

Wang, Yu, et Mark A. McNiven. 2012. « Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex ». *The Journal of Cell Biology* 196 (3): 375-85. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105153>.

Watanabe, Yukihide, Susumu Itoh, Toshiyasu Goto, Eriko Ohnishi, Masako Inamitsu, Fumiko Itoh, Kiyotoshi Satoh, et al. 2010. « TMEPAI, a Transmembrane TGF-Beta-Inducible Protein, Sequesters Smad Proteins from Active Participation in TGF-Beta Signaling ». *Molecular Cell* 37 (1): 123-34. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.10.028>.

Wculek, Stefanie K., Francisco J. Cueto, Adriana M. Mujal, Ignacio Melero, Matthew F. Krummel, et David Sancho. 2020. « Dendritic Cells in Cancer Immunology and Immunotherapy ». *Nature Reviews Immunology* 20 (1): 7-24. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0210-z>.

Welch, Danny R., et Douglas R. Hurst. 2019. « Defining the Hallmarks of Metastasis ». *Cancer Research* 79 (12): 3011-27. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458>.

Wellbrock, Claudia, et Imanol Arozarena. 2015. « Microphthalmia-Associated Transcription Factor in Melanoma Development and MAP-Kinase Pathway Targeted Therapy ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 28 (4): 390-406. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12370>.

Wellbrock, Claudia, et Richard Marais. 2005. « Elevated Expression of MITF Counteracts B-RAF-Stimulated Melanocyte and Melanoma Cell Proliferation ». *The Journal of Cell Biology* 170 (5): 703-8. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505059>.

Wells, J. Michael, Amit Gaggar, et J. Edwin Blalock. 2015. « MMP Generated Matrikines ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 44-46: 122-29. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.016>.

Wen, Bing, Li-Yan Xu, et En-Min Li. 2020. « LOXL2 in Cancer: Regulation, Downstream Effectors and Novel Roles ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer* 1874 (2): 188435. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188435>.

Whittaker, Steven R., Jean-Philippe Theurillat, Eliezer Van Allen, Nikhil Wagle, Jessica Hsiao, Glenn S. Cowley, Dirk Schadendorf, David E. Root, et Levi A. Garraway. 2013. « A Genome-Scale RNA Interference Screen Implicates NF1 Loss in Resistance to RAF Inhibition ». *Cancer Discovery* 3 (3): 350-62. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0470>.

Wick, M. J., L. Q. Dong, R. A. Riojas, F. J. Ramos, et F. Liu. 2000. « Mechanism of Phosphorylation of Protein Kinase B/Akt by a Constitutively Active 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (51): 40400-406. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003937200>.

Widmer, Daniel S., Phil F. Cheng, Ossia M. Eichhoff, Benedetta C. Belloni, Marie C. Zipsler, Natalie C. Schlegel, Delphine Javelaud, Alain Mauviel, Reinhard Dummer, et Keith S. Hoek. 2012. « Systematic Classification of Melanoma Cells by Phenotype-Specific Gene Expression Mapping ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 25 (3): 343-53. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2012.00986.x>.

Wiel, C., A. Augert, D. F. Vincent, D. Gitenay, D. Vindrieux, B. Le Calvé, V. Arfi, et al. 2013. « Lysyl Oxidase Activity Regulates Oncogenic Stress Response and Tumorigenesis ». *Cell Death & Disease* 4 (10): e855. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.382>.

Wilson, C., L. Qiu, Y. Hong, T. Karnik, G. Tadros, B. Mau, T. Ma, et al. 2017. « The Histone Demethylase KDM4B Regulates Peritoneal Seeding of Ovarian Cancer ». *Oncogene* 36 (18): 2565-76. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.412>.

Wilson, R. E., T. P. Dooley, et I. R. Hart. 1989. « Induction of Tumorigenicity and Lack of in Vitro Growth Requirement for 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate by Transfection of Murine Melanocytes with v-Ha-Ras ». *Cancer Research* 49 (3): 711-16.

Wolchok, Jedd D, Bart Neyns, Gerald Linette, Sylvie Negrier, Jose Lutzky, Luc Thomas, William Waterfield, et al. 2010. « Ipilimumab Monotherapy in Patients with Pretreated Advanced Melanoma: A Randomised, Double-Blind, Multicentre, Phase 2, Dose-Ranging Study ». *The Lancet Oncology* 11 (2): 155-64. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70334-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70334-1).

Wong, Carmen Chak-Lui, Aki Pui-Wah Tse, Yan-Ping Huang, Yan-Ting Zhu, David Kung-Chun Chiu, Robin Kit-Ho Lai, Sandy Leung-Kuen Au, et al. 2014. « Lysyl Oxidase-like 2 Is Critical to Tumor Microenvironment and Metastatic Niche Formation in Hepatocellular Carcinoma ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 60 (5): 1645-58. <https://doi.org/10.1002/hep.27320>.

Wouters, Jasper, Zeynep Kalender-Atak, Liesbeth Minnoye, Katina I. Spanier, Maxime De Waegeneer, Carmen Bravo González-Blas, David Mauduit, et al. 2020. « Robust Gene Expression Programs Underlie Recurrent Cell States and Phenotype Switching in Melanoma ». *Nature Cell Biology* 22 (8): 986-98. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0547-3>.

Wu, Bing-Li, Guo-Qing Lv, Hai-Ying Zou, Ze-Peng Du, Jian-Yi Wu, Pi-Xian Zhang, Li-Yan Xu, et En-Min Li. 2014. « Exploration of Potential Roles of a New LOXL2 Splicing Variant Using Network Knowledge in Esophageal Squamous Cell Carcinoma ». *TheScientificWorldJournal* 2014: 431792. <https://doi.org/10.1155/2014/431792>.

Wu, Bing-Li, Hai-Ying Zou, Guo-Qing Lv, Ze-Peng Du, Jian-Yi Wu, Pi-Xian Zhang, Li-Yan Xu, et En-Min Li. 2014. « Protein-Protein Interaction Network Analyses for Elucidating the Roles of LOXL2-Delta72 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 15 (5): 2345-51. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.5.2345>.

Wu, Sifan, Qiongdan Zheng, Xiaoxia Xing, Yinying Dong, Yaohui Wang, Yang You, Rongxin Chen, et al. 2018. « Matrix Stiffness-Upregulated LOXL2 Promotes Fibronectin Production, MMP9 and CXCL12 Expression and BMDCs Recruitment to Assist Pre-Metastatic Niche Formation ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 37 (1): 99. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0761-z>.

Wu, Xiongyan, Xuehua Chen, Quan Zhou, Pu Li, Beiqin Yu, Jianfang Li, Ying Qu, et al. 2013. « Hepatocyte

- Growth Factor Activates Tumor Stromal Fibroblasts to Promote Tumorigenesis in Gastric Cancer ». *Cancer Letters* 335 (1): 128-35. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.002>.
- Wyszko, Eliza, Katarzyna Rolle, Stanislaw Nowak, Ryszard Zukiel, Monika Nowak, Rafał Piestrzeniewicz, Iwona Gawrońska, Mirosława Z. Barciszewska, et Jan Barciszewski. 2008. « A Multivariate Analysis of Patients with Brain Tumors Treated with ATN-RNA ». *Acta Poloniae Pharmaceutica* 65 (6): 677-84.
- Xiao, Qian, Donger Zhou, Agnieszka A. Rucki, Jamila Williams, Jiaojiao Zhou, Guanglan Mo, Adrian Murphy, et al. 2016. « Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Cancer Are Reprogrammed by Tumor-Induced Alterations in Genomic DNA Methylation ». *Cancer Research* 76 (18): 5395-5404. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3264>.
- Xing, F., Y. Persaud, C. A. Pratilas, B. S. Taylor, M. Janakiraman, Q.-B. She, H. Gallardo, et al. 2012. « Concurrent Loss of the PTEN and RB1 Tumor Suppressors Attenuates RAF Dependence in Melanomas Harboring (V600E)BRAF ». *Oncogene* 31 (4): 446-57. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.250>.
- Xouri, Georgia, et Sven Christian. 2010. « Origin and Function of Tumor Stroma Fibroblasts ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Tumor-Stroma Interactions, 21 (1): 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.11.017>.
- Xu, Li, Eden P. Go, Joel Finney, HeeJung Moon, Mason Lantz, Kathryn Rebecchi, Heather Desaire, et Minae Mure. 2013. « Post-translational Modifications of Recombinant Human Lysyl Oxidase-like 2 (rhLOXL2) Secreted from Drosophila S2 Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (8): 5357-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.421768>.
- Yang, Hui, Yue-Hang Geng, Peng Wang, Yan-Ting Zhou, Han Yang, Yan-Fei Huo, Hong-Quan Zhang, et al. 2019. « Extracellular ATP Promotes Breast Cancer Invasion and Epithelial-Mesenchymal Transition via Hypoxia-Inducible Factor 2 α Signaling ». *Cancer Science* 110 (8): 2456-70. <https://doi.org/10.1111/cas.14086>.
- Yang, Li, Yanli Pang, et Harold L. Moses. 2010. « TGF-Beta and Immune Cells: An Important Regulatory Axis in the Tumor Microenvironment and Progression ». *Trends in Immunology* 31 (6): 220-27. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.04.002>.
- Yang, Xiaoxiao, Shifeng Li, Wande Li, Jingkao Chen, Xiao Xiao, Youqiong Wang, Guangmei Yan, et Lijun Chen. 2013. « Inactivation of Lysyl Oxidase by β -Aminopropionitrile Inhibits Hypoxia-Induced Invasion and Migration of Cervical Cancer Cells ». *Oncology Reports* 29 (2): 541-48. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2146>.
- Ye, Ming-Fan, Ji-Guang Zhang, Tian-Xing Guo, et Xiao-Jie Pan. 2018. « MiR-504 Inhibits Cell Proliferation and Invasion by Targeting LOXL2 in Non Small Cell Lung Cancer ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 97 (janvier): 1289-95. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.005>.
- Yin, Huilong, Yidi Wang, Ye Wu, Xiang Zhang, Xiaofang Zhang, Jun Liu, Ting Wang, et al. 2020. « EZH2-Mediated Epigenetic Silencing of miR-29/miR-30 Targets LOXL4 and Contributes to Tumorigenesis, Metastasis, and Immune Microenvironment Remodeling in Breast Cancer ». *Theranostics* 10 (19): 8494-8512. <https://doi.org/10.7150/thno.44849>.
- Yokoyama, Satoru, Susan L. Woods, Glen M. Boyle, Lauren G. Aoude, Stuart MacGregor, Victoria Zismann, Michael Gartside, et al. 2011. « A Novel Recurrent Mutation in MITF Predisposes to Familial and Sporadic Melanoma ». *Nature* 480 (7375): 99-103. <https://doi.org/10.1038/nature10630>.
- Yonenaga, Yoshikuni, Akira Mori, Hisashi Onodera, Seiichi Yasuda, Hideaki Oe, Akihisa Fujimoto, Tsuyoshi Tachibana, et Masayuki Imamura. 2005. « Absence of Smooth Muscle Actin-Positive Pericyte Coverage of Tumor Vessels Correlates with Hematogenous Metastasis and Prognosis of Colorectal Cancer Patients ». *Oncology* 69 (2): 159-66. <https://doi.org/10.1159/000087840>.
- Young, Helen L., Emily J. Rowling, Mattia Bugatti, Emanuele Giurisato, Nadia Luheshi, Imanol Arozarena,

Juan-Carlos Acosta, et al. 2017. « An Adaptive Signaling Network in Melanoma Inflammatory Niches Confers Tolerance to MAPK Signaling Inhibition ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (6): 1691-1710. <https://doi.org/10.1084/jem.20160855>.

Yu, Q., et I. Stamenkovic. 2000. « Cell Surface-Localized Matrix Metalloproteinase-9 Proteolytically Activates TGF-Beta and Promotes Tumor Invasion and Angiogenesis ». *Genes & Development* 14 (2): 163-76.

Zaffryar-Eilot, Shelly, Derek Marshall, Tali Voloshin, Avinoam Bar-Zion, Rhyannon Spangler, Ofra Kessler, Haben Ghermazien, et al. 2013. « Lysyl Oxidase-like-2 Promotes Tumour Angiogenesis and Is a Potential Therapeutic Target in Angiogenic Tumours ». *Carcinogenesis* 34 (10): 2370-79. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt241>.

Zamarron, Brian F., et WanJun Chen. 2011. « Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression ». *International Journal of Biological Sciences* 7 (5): 651-58.

Zaretsky, Jesse M., Angel Garcia-Diaz, Daniel S. Shin, Helena Escuin-Ordinas, Willy Hugo, Siwen Hu-Lieskovan, Davis Y. Torrejon, et al. 2016. « Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma ». *The New England journal of medicine* 375 (9): 819-29. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1604958>.

Zeisberg, Elisabeth M., Scott Potenta, Liang Xie, Michael Zeisberg, et Raghu Kalluri. 2007. « Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts ». *Cancer Research* 67 (21): 10123-28. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3127>.

Zhan, Xiu-Hui, Ji-Wei Jiao, Hai-Feng Zhang, Xiu-E. Xu, Jian-Zhong He, Run-Liu Li, Hai-Ying Zou, et al. 2019. « LOXL2 Upregulates Phosphorylation of Ezrin to Promote Cytoskeletal Reorganization and Tumor Cell Invasion ». *Cancer Research* 79 (19): 4951-64. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0860>.

Zhang, Jian, Rui Yang, Ziyi Liu, Congzhe Hou, Wen Zong, Aizhen Zhang, Xiaoyang Sun, et Jiangang Gao. 2015. « Loss of lysyl oxidase-like 3 causes cleft palate and spinal deformity in mice ». *Human Molecular Genetics* 24 (21): 6174-85. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv333>.

Zhang, Jing, et Jinsong Liu. 2013. « Tumor Stroma as Targets for Cancer Therapy ». *Pharmacology & Therapeutics* 137 (2): 200-215. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.10.003>.

Zhang, Lijuan. 2010. « Glycosaminoglycans in Development, Health and Disease. Preface ». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 93: xvii-xviii. [https://doi.org/10.1016/S1877-1173\(10\)93026-3](https://doi.org/10.1016/S1877-1173(10)93026-3).

Zhang, Wei, et Hui Tu Liu. 2002. « MAPK Signal Pathways in the Regulation of Cell Proliferation in Mammalian Cells ». *Cell Research* 12 (1): 9-18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>.

Zhang, Ying, Wan-Li Jiang, Jun-Yuan Yang, Jie Huang, Ganjun Kang, Hai-Bo Hu, et Songpig Xie. 2019. « Downregulation of Lysyl Oxidase-like 4 LOXL4 by miR-135a-5p Promotes Lung Cancer Progression in Vitro and in Vivo ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (10): 18679-87. <https://doi.org/10.1002/jcp.28508>.

Zhao, L., et P. K. Vogt. 2008. « Class I PI3K in Oncogenic Cellular Transformation ». *Oncogene* 27 (41): 5486-96. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.244>.

Zhao, Lei, Haiya Niu, Yutao Liu, Lei Wang, Ning Zhang, Gaiqiang Zhang, Rongqing Liu, et Mei Han. 2019. « LOX Inhibition Downregulates MMP-2 and MMP-9 in Gastric Cancer Tissues and Cells ». *Journal of Cancer* 10 (26): 6481-90. <https://doi.org/10.7150/jca.33223>.

Zhao, Nan, Chen Chen, Yuhong Guo, Tiejun Liu, Na Che, Danfang Zhang, Xiaohui Liang, Yanhui Zhang, et Xiulan Zhao. 2023. « LOXL2 Serves as a Prognostic Biomarker for Hepatocellular Carcinoma by Mediating Immune Infiltration and Vasculogenic Mimicry ». *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 55 (5): 661-72. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2022.09.003>.

Zhao, Yingshe, Chengyin Min, Siddharth R. Vora, Philip C. Trackman, Gail E. Sonenshein, et Kathrin H. Kirsch. 2009. « The Lysyl Oxidase Pro-peptide Attenuates Fibronectin-mediated Activation of Focal Adhesion Kinase and p130Cas in Breast Cancer Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (3): 1385-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802612200>.

Zheng, Gui-Li, Yu-Lin Liu, Ze-Xuan Yan, Xiao-Ye Xie, Zhuo Xiang, Li Yin, Qing-Qing Wang, et al. 2021. « Elevated LOXL2 Expression by LINC01347/miR-328-5p Axis Contributes to 5-FU Chemotherapy Resistance of Colorectal Cancer ». *American Journal of Cancer Research* 11 (4): 1572-85.

Zhou, Linli, Kun Yang, Thomas Andl, R. Randall Wickett, et Yuhang Zhang. 2015. « Perspective of Targeting Cancer-Associated Fibroblasts in Melanoma ». *Journal of Cancer* 6 (8): 717-26. <https://doi.org/10.7150/jca.10865>.

Zhou, Yi, Xiaoxu Guan, Huiming Wang, Zhuoli Zhu, Chiquan Li, Shu Wu, et Haiyang Yu. 2013. « Hypoxia Induces Osteogenic/Angiogenic Responses of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Seeded on Bone-Derived Scaffolds via ERK1/2 and P38 Pathways ». *Biotechnology and Bioengineering* 110 (6): 1794-1804. <https://doi.org/10.1002/bit.24827>.

Zhu, Ying, Meng-Xiao Zhu, Xiao-Dan Zhang, Xiu-E. Xu, Zhi-Yong Wu, Lian-Di Liao, Li-Yan Li, et al. 2016. « SMYD3 Stimulates EZR and LOXL2 Transcription to Enhance Proliferation, Migration, and Invasion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma ». *Human Pathology* 52 (juin): 153-63. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.01.012>.

Zollinger, Alicia J., et Michael L. Smith. 2017. « Fibronectin, the Extracellular Glue ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 60-61 (juillet): 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.07.011>.

Zou, Hai-Ying, Guo-Qing Lv, Li-Hua Dai, Xiu-Hui Zhan, Ji-Wei Jiao, Lian-Di Liao, Tai-Mei Zhou, et al. 2016. « A Truncated Splice Variant of Human Lysyl Oxidase-like 2 Promotes Migration and Invasion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 75 (juin): 85-98. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.04.003>.

Annexes

Articles originaux :

Biber P, **Carminati A**, Girard C, Mohager W, Ohanna M, Lecacheur M, Bouvet O, Audebert S, Khaled M, Tartare-Deckert S, Deckert M. The mechanically activated deubiquitinase USP9X controls melanoma invasiveness and drug response through YAP stabilization. *En preparation*.

Lecacheur M, Berestjuk I, **Carminati A**, Diazzi S, Biber P, Rovera C, Irondelle M, Larbret F, Dewaele M, Marine JC, Prod'Homme V, Deckert M*, Girard CA*, Tartare-Deckert S* co-last author. Mechanical activation of the collagen receptors DDR1 and DDR2 promotes dedifferentiated melanoma cell aggressiveness through actomyosine/YAP pathway. *En preparation*.

Diazzi S, Baeri A, Fassy F, Lecacheur M, Marin-Bejar O, Girard CA, Lefevre L, Lacoux C, Irondelle M, Mounier C, Truchi M, Couralet M, **Carminati A**, Berestjuk I, Larbret F, Vassaux G, JC, Deckert M, Mari* B, and Tartare-Deckert* S. *Embo. Mol. Med.*, 2022. Blockade of pro-fibrotic response mediated by the miR-143/-145 cluster prevents targeted therapy-induced phenotypic plasticity and resistance in melanoma. *EMBO Mol. Med.*, 2022. DOI: 10.15252/emmm.202115295

Berestjuk I, Lecacheur M, **Carminati A**, Diazzi S, Rovera C, Prod'homme V, Mallavialle A, Lambert F, Pisano S, Audebert S, Passeron T, Gaggioli C, Girard CA, Marcel Deckert* M, Tartare-Deckert* S. *EMBO Mol. Med.*, 2022. Targeting Discoidin Domain Receptors DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated tumor cell adaptation and tolerance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *co-derniers. DOI: <https://doi.org/10.15252/emmm.201911814>

Conférence dans le cadre des séminaires internes du C3M :

“Role of the ECM remodeling enzyme LOXL2 in melanoma” **Alexandrine Carminati** (Mai 2021).

Communications dans le cadre de symposium et congrès :

Carminati A, Diazzi S, Biber P, Lecacheur M, Girard CA, Khaled M, Tartare-Deckert *S, and Deckert*M. *equal contribution. Role of Lysyl OXidase Like 2 (LOXL2) enzyme in stromal matrix remodeling and invasive properties of dedifferentiated melanoma cells. 5th Labex SIGNALIFE Meeting Nice, Novembre 2022. **Communication orale**.

Carminati A, Girard C, Biber P, Kahil M, Lecacheur M, Bouvet O, Khaled M, Michel G, Audebert S, Tartare-Deckert S*, Deckert M*. *equal contribution. Role of the matrix remodeling enzyme LOXL2 in migration properties and therapeutic response of melanoma cells. 27^{ème} journées jeunes chercheurs en cancérologie. ARC Paris, Octobre 2023. **Communication orale**.

Carminati A, Diazzi S., Biber P., Lecacheur M., Tartare-Deckert* S. and Deckert* M. * equal contribution. A role for the Lysyl OXidase Like 2 (LOXL2) enzyme in stromal matrix remodeling and invasive properties of dedifferentiated mesenchymal-like melanoma cells. Journées de l'Ecole Doctorale de Nice, Mai 2021. **Communication orale**.

Carminati A, Diazi S, Biber P, Lecacheur M, Tartare-Deckert *S, and Deckert*M. *equal contribution. Role for the Lysyl OXidase Like 2 (LOXL2) enzyme in stromal matrix remodeling and invasive properties of dedifferentiated melanoma cells. « Séminaire du Cancéropôle Provence-Alpes-Côte d'Azur », Juillet 2021. **Prix du meilleur poster 2021.**

Carminati A, Diazi S, Biber P, Lecacheur M, Khaled M, Tartare-Deckert *S, and Deckert*M. *equal contribution. Role for the Lysyl OXidase Like 2 (LOXL2) enzyme in stromal matrix remodeling and invasive properties of dedifferentiated melanoma cells. EACR 2022, Seville Espagne, Juin 2022

Carminati A, Diazi S, Biber P, Lecacheur M, Tartare-Deckert *S, and Deckert*M. *equal contribution. Role for the Lysyl OXidase Like 2 (LOXL2) enzyme in stromal matrix remodeling and invasive properties of dedifferentiated melanoma cells. « Séminaire du Cancéropôle Provence-Alpes-Côte d'Azur », Juillet 2022. **Prix du meilleur poster 2022.**

Carminati A, Diazi S, Biber P, Lecacheur M, Khaled M, Tartare-Deckert *S, and Deckert*M. *equal contribution. Role for the Lysyl OXidase Like 2 (LOXL2) enzyme in stromal matrix remodeling and invasive properties of dedifferentiated melanoma cells. 5th International Cancer Symposium CRCL Lyon, Novembre 2022.

Carminati A, Girard C, Biber P, Kahil M, Lecacheur M, Khaled M, Audebert S, Michel G, Tartare-Deckert *S, and Deckert*M. *equal contribution. Role for the Lysyl OXidase Like 2 (LOXL2) enzyme in stromal matrix remodeling and invasive properties of dedifferentiated melanoma cells. « Séminaire du Cancéropôle Provence-Alpes-Côte d'Azur », Juillet 2023. **Prix du meilleur poster 2023.**

Biber P, Ohanna M, **Carminati A**, Lecacheur M, Mohager W, Irondelle M, Tartare-Deckert S, and Deckert M. The deubiquitinase USP9X controls melanoma cell migration and mechanotransduction through YAP stabilization. Journées de l'École Doctorale de Nice, Mai 2021.

Biber P, Ohanna M, **Carminati A**, Lecacheur M, Mohager W, Khaled M, Tartare-Deckert S, and Deckert M. The deubiquitinase USP9X controls melanoma cell migration and mechano- transduction through YAP stabilization. « Séminaire du Cancéropôle Provence-Alpes-Côte d'Azur », Juillet 2021.

Lecacheur M, Girard C.A.J, Berestjuk I, **Carminati A**, Biber P, Diazi S, Irondelle M, Deckert M, Tartare-Deckert S. Mechanical activation of the collagen receptors DDR1 and DDR2 promotes melanoma aggressiveness through YAP pathway. French-German Matrix Biology Meeting. Extracellular matrix architecture and signalling in health and disease (virtual edition), May 26-28, 2021.

Lecacheur M, Girard C.A.J, Berestjuk I, **Carminati A**, Biber P, Diazi S, Irondelle M, Deckert M, Tartare-Deckert S. Mechanical activation of the collagen receptors DDR1 and DDR2 promotes melanoma aggressiveness through YAP pathway. Beatson International Cancer Conference: The Cartography of Cancer: Mapping Tumours in 3D (12-13 July 2021).

Diazi S., Baeri A., Fassy J., Lecacheur M., Marin-Bejar O., Girard C., Lefevre L., Lacoux C., Irondelle M., Mounier C., Truchi M., Couralet M., **Carminati A**, Berestjuk I., Larbret F., Vassaux G., Marine J.-C., Deckert M., Mari B., Tartare-Deckert S. The miR-143/145 cluster promotes mesenchymal phenotypic plasticity associated with resistance to targeted therapies in melanoma. Tumor Heterogeneity, Plasticity and Therapy (virtual edition) May 2021-VIB Conferences.






Diazi S., Baeri A., Fassy J., Lecacheur M., Marin-Bejar O., Girard C., Lefevre L., Lacoux C., Irondelle M., Mounier C., Truchi M., Couralet M., **Carminati A**, Berestjuk I., Larbret F., Vassaux G., Marine J.-C., Deckert M., Tartare-Deckert S., Mari B. The miR-143/145 cluster promotes mesenchymal phenotypic plasticity

associated with resistance to targeted therapies in melanoma. Noncoding RNA World: From Mechanism to Therapy. Online 21-23 July 2021.

Festival des Sciences, Nice (FRANCE) : Préparation d'un stand et présentation au grand public des rôles de la matrice extracellulaire à l'aide d'un poster et d'un jeu pour les enfants. Octobre 2021 et Octobre 2022.

Annexe 1 : Targeting DDR1 and DDR2 overcomes matrix- mediated melanoma cell adaptation to BRAF- targeted therapy

Targeting Discoidin Domain Receptors DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated tumor cell adaptation and tolerance to BRAF-targeted therapy in melanoma

Ilona Berestjuk^{1,2}, Margaux Lecacheur^{1,2} , Alexandrine Carminati^{1,2}, Serena Diazzi^{1,2}, Christopher Rovera^{1,2}, Virginie Prod'homme^{1,2} , Mickael Ohanna^{1,2} , Ana Popovic^{1,2}, Aude Mallavialle^{1,2}, Frédéric Larbret^{1,2}, Sabrina Pisano³ , Stéphane Audebert⁴ , Thierry Passeron^{1,5}, Cédric Gaggioli³, Christophe A Girard^{1,2}, Marcel Deckert^{1,2,*†}  & Sophie Tartare-Deckert^{1,2,**†} 

Abstract

Resistance to BRAF/MEK inhibitor therapy in BRAF^{V600}-mutated advanced melanoma remains a major obstacle that limits patient benefit. Microenvironment components including the extracellular matrix (ECM) can support tumor cell adaptation and tolerance to targeted therapy; however, the underlying mechanisms remain poorly understood. Here, we investigated the process of matrix-mediated drug resistance (MMDR) in response to BRAF^{V600} pathway inhibition in melanoma. We demonstrate that physical and structural cues from fibroblast-derived ECM abrogate anti-proliferative responses to BRAF/MEK inhibition. MMDR is mediated by drug-induced linear clustering of phosphorylated DDR1 and DDR2, two tyrosine kinase collagen receptors. Depletion and pharmacological targeting of DDR1 and DDR2 overcome ECM-mediated resistance to BRAF-targeted therapy. In xenografts, targeting DDR with imatinib enhances BRAF inhibitor efficacy, counteracts drug-induced collagen remodeling, and delays tumor relapse. Mechanistically, DDR-dependent MMDR fosters a targetable pro-survival NIK/IKK α /NF- κ B2 pathway. These findings reveal a novel role for a collagen-rich matrix and DDR in tumor cell adaptation and resistance. They also provide important insights into environment-mediated drug resistance and a preclinical rationale for targeting DDR signaling in combination with targeted therapy in melanoma.

Keywords DDR; extracellular matrix; melanoma; NF- κ B2; therapeutic resistance

Subject Categories Cancer; Skin

DOI 10.15252/emmm.201911814 | Received 26 November 2019 | Revised 8 December 2021 | Accepted 9 December 2021 | Published online 27 December 2021

EMBO Mol Med (2022) 14: e11814

Introduction

One of the hallmarks of cancer cells is their remarkable ability to adapt to microenvironmental influences, such as the nature of the stroma including the extracellular matrix (ECM) and therapeutic stress (Pickup *et al*, 2014). This is particularly true for malignant cutaneous melanoma, which is one of the most aggressive and refractory human cancers (Shain & Bastian, 2016). Approximately 50% of melanoma carries activating mutations in the *BRAF* oncogene, leading to the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK pathway. Inhibition of the BRAF^{V600E/K} oncoprotein by BRAF inhibitors (BRAFi) such as vemurafenib or dabrafenib has markedly improved clinical outcome of patients (Flaherty *et al*, 2012). Despite this, durable responses are rare as most patients relapse within a year of beginning the treatment. Significant prolonged benefit can be achieved by combining BRAFi and MEK (MAPK/ERK kinase) inhibitors (MEKi) such as cobimetinib or trametinib, yet the development of drug resistance remains the most common clinical outcome (Robert *et al*, 2019). Acquired resistance to targeted therapies involves genetic alterations in key intracellular regulators of the MAPK signaling pathway. This leads to the restoration of the pathway and non-genetic alterations that are commonly

1 Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France

2 Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, Team MicroCan, Nice, France

3 Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, IRCAN, Nice, France

4 Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille, France

5 Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Department of Dermatology, Nice, France

*Corresponding author. Tel: +33 489153850; E-mail: deckert@unice.fr

**Corresponding author. Tel: +33 489153851; E-mail: tartare@unice.fr

†These authors contributed equally to this work as senior authors

associated with transcriptional reprogramming and phenotype switching from a melanocytic to an invasive undifferentiated mesenchymal-like cell state, which is characterized by lower expression levels of MITF and SOX10 and higher levels of AXL (Muller *et al*, 2014; Rambow *et al*, 2019). Such adaptive responses to BRAF oncogenic pathway inhibition are thought to precede mutation-driven acquired resistance (Smith *et al*, 2016).

However, in addition to mechanisms of resistance intrinsic to cancer cells, dynamic, *de novo* mechanisms exist, which are orchestrated by the tumor microenvironment and occur during the cancer cell's adaptation to therapy. Environment-mediated drug resistance (EMDR) thus appears as an important contributor to how cancer cells escape therapies (Meads *et al*, 2009). This process has initially been described in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies and was shown related to minimal residual disease. This phenomenon is gaining importance in the field of melanoma with several studies reporting the involvement of stroma-derived factors in adaptive response and resistance to targeted therapies (Straussman *et al*, 2012; Fedorenko *et al*, 2015; Hirata *et al*, 2015; Kaur *et al*, 2016; Young *et al*, 2017). Given the key role of EMDR enabling the emergence of genetic resistance, an understanding and further identification of EMDR mechanisms in melanoma may assist with the development of more effective therapeutic strategies, thereby increasing the efficacy of targeted therapies.

Tumors are complex and adaptive ecosystems that are affected by numerous stromal components, which enhance tumor phenotypes and therapy resistance. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are activated fibroblasts and the primary producers of ECM. The ECM is a highly dynamic structural framework of macromolecules, providing both biochemical and biomechanical cues, which are required for tumor progression (Kalluri, 2016). The ECM is primarily composed of fibrillar and non-fibrillar collagens, hyaluronic acid, proteoglycans, and adhesive glycoproteins such as fibronectin, thrombospondins, and SPARC. It also contains matrix-remodeling enzymes and other ECM-associated proteins and acts as a reservoir for cytokines and growth factors (Hynes & Naba, 2012; Mouw *et al*, 2014). ECM composition, fiber orientation, and physical characteristics are profoundly altered in the vast majority of solid tumors (Pickup *et al*, 2014). Interactions between cells and the ECM elicit intracellular signaling pathways and regulate gene transcription, mainly through cell-surface adhesion receptors including integrins and discoidin domain receptors (DDR). DDR1 and DDR2 belong to a unique subfamily of receptor tyrosine kinases and have been identified as non-integrin collagen receptors (Shrivastava *et al*, 1997; Vogel *et al*, 1997; Leitinger, 2014). They are distinguished from each other by their relative affinity for different types of collagens, as DDR1 is activated by both fibrillar and non-fibrillar collagens, whereas DDR2 is only activated by fibrillar collagens. Furthermore, their expression and function are associated with fibrotic disease and cancer (Valiathan *et al*, 2012; Leitinger, 2014). DDR1 or DDR2 is known to control tumor cell proliferation and invasion, depending on the tumor type and the nature of the microenvironment (Valiathan *et al*, 2012). However, the functional role of DDR activity in mediating sensitivity to anti-cancer therapies and tumor resistance is poorly documented.

Adhesion of tumor cells to the ECM is a key component of EMDR. However, the influence of matrix-mediated drug resistance (MMDR) in response to targeted therapies and the nature of ECM

receptors driving the MMDR phenotype in melanoma have not yet been addressed in detail. To model the contribution of the ECM in melanoma cell responses to BRAF and MEK inhibition, we generated fibroblast-derived 3D ECM from melanoma-associated fibroblasts (MAFs), which were isolated from patient-derived biopsies and analyzed the MMDR mechanism with the aim to identify novel opportunities for microenvironment-targeted therapies. Here, we show that DDR1 and DDR2 are key mediators of MMDR in melanoma, through the pro-survival non-canonical NF- κ B2 pathway. Our findings reveal a novel role for these collagen-activated tyrosine kinase receptors, in mediating BRAF inhibitor tolerance. These data therefore support the rationale to inhibit DDR1 and DDR2 signaling, to disrupt the therapy-resisting properties conferred by the ECM in the microenvironment. We propose that the use of DDR inhibitors as a novel combinatorial therapeutic strategy may be beneficial for melanoma patients in overcoming resistance to MAPK-targeted therapy.

Results

Fibroblast-derived 3D ECM confers drug-protective action to melanoma cells against anti-BRAF^{V600E} therapies

To investigate the potential contribution of MMDR to targeted therapy in BRAF-mutated melanoma cells, we employed an *in vitro* model based on live cell-derived 3D ECMs. These matrices mimic many structural and biomolecular features, which are typically found *in vivo* (Cukierman *et al*, 2001). We selected human primary fibroblasts obtained from healthy individuals or MAFs isolated from patient metastatic melanoma biopsies (MAFs) in either the skin or lymph nodes (LN). The different fibroblast cultures were functionally tested in a 3D collagen matrix contraction assay, which showed that unlike human dermal fibroblasts (HDF), skin and LN MAF displayed actomyosin contractile activity. Similar to MAFs, LN normal fibroblasts known as fibroblastic reticular cells (FRC) are myofibroblast-like cells (Fletcher *et al*, 2015), which also showed a high propensity to contract collagen (Fig 1A). Cell-derived matrices were then generated and de-cellularized, and their composition, architecture, and rigidity were analyzed using proteomic and microscopic approaches. In our experimental conditions, compared to HDF, skin and LN MAF, as well as FRC, produced and assembled a dense 3D ECM composed of oriented collagen and fibronectin fibers, as shown by picrosirius red and immunofluorescence staining of the ECMs (Fig 1B). Proteomic analysis of the different fibroblast-derived ECMs further documented the molecular composition of these matrices, showing enrichment for several types of collagens and core matrix components including glycoproteins, proteoglycans, and ECM regulators and ECM-associated proteins (Appendix Fig S1). Atomic force microscopy (AFM) analysis of ECM stiffness revealed values for MAF and HDF matrices that were within the range of previous observations (Kaukonen *et al*, 2016; Fig 1C). We noticed that matrices generated from FRC and MAF were stiffer than HDF-derived ECM. Collectively, these observations validate the use of our experimentally derived matrices for functional studies. Next, we tested the effectiveness of the fibroblast-derived ECMs generated from HDF, FRC, or MAF to protect BRAF^{V600E}-mutated melanoma cells against the anti-proliferative effect of MAPK pathway

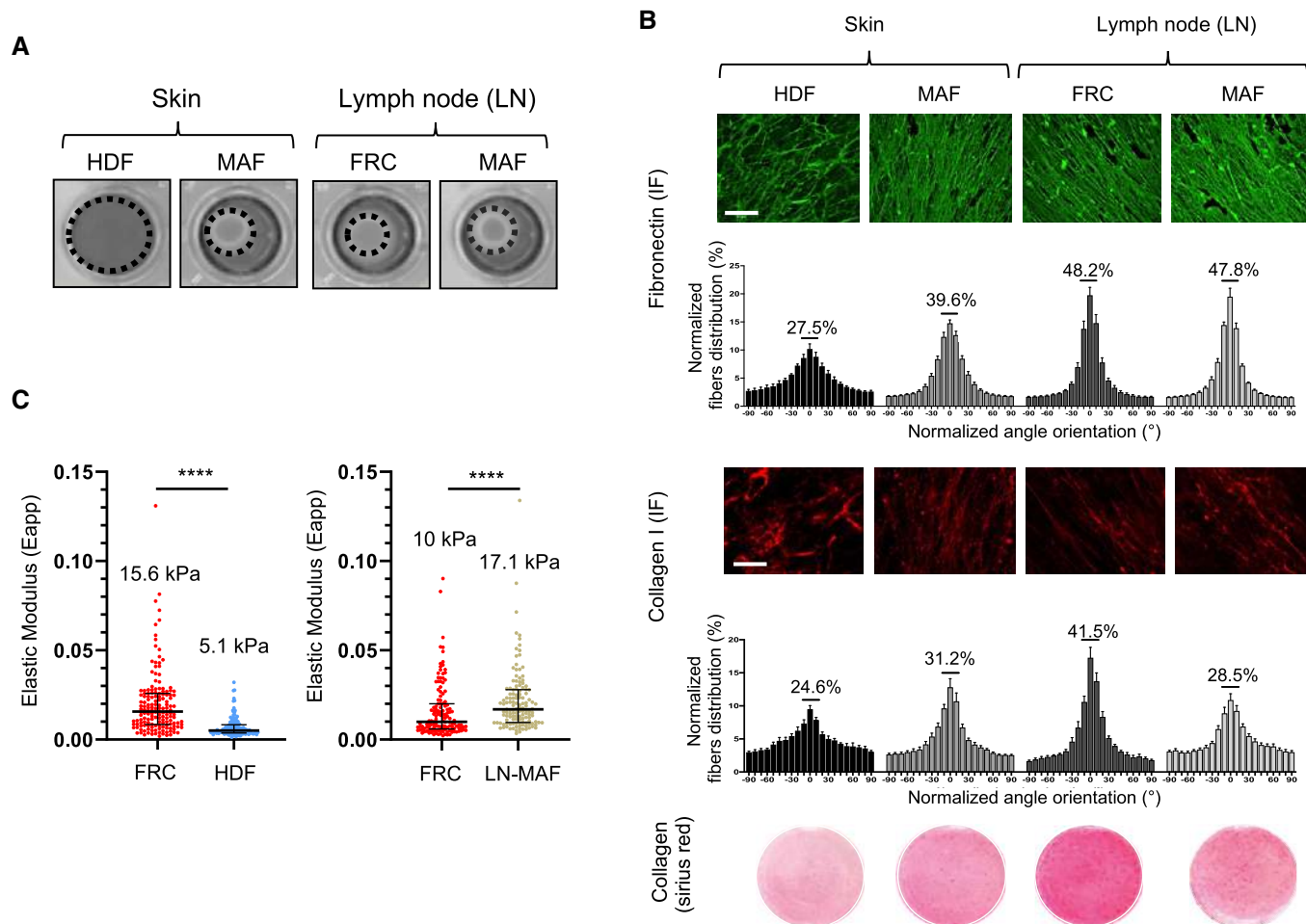


Figure 1. Composition, topology, and mechanical properties of fibroblast-derived 3D ECMs.

A Images show collagen matrix gel contraction by HDF (human dermal fibroblasts), skin-MAF (melanoma-associated fibroblasts isolated from skin lesions), LN-FRC (lymph node fibroblast reticular cells), and LN MAF (melanoma-associated fibroblasts isolated from metastatic lymph node). Dashed circles represent the diameter of the gel. Data are representative of $n = 3$ independent experiments.

B Immunofluorescence analysis of fibronectin (green) and collagen (red) fibers on de-cellularized ECM produced by human fibroblasts. Fiber orientation was quantified using ImageJ software. Percentages indicate oriented fibers accumulated in a range of $\pm 21^\circ$ around the modal angle. Data are represented as mean \pm s.d. ($n = 10$ random fields from 2 independent determinations). Scale bar, 50 μm . A representative image of picrosirius red staining from 10 analyzed images is shown for each condition.

C Atomic force microscopy (AFM) measurement of the elastic properties (apparent Young's modulus, E_{app}) of fibroblast-derived ECMs. Each dot represents a specific Young's modulus obtained by fitting the corresponding individual force curve acquired on a determined point of the sample. A representative experiment from 2 independent experiments is shown. Scatter plots show mean \pm SEM. The black bars represent the median and the interquartile range. **** $P < 0.0001$, two-tailed Mann-Whitney test.

inhibition. We therefore developed a drug-protective assay based on the culture of melanoma cells that stably expressed a fluorescent nuclear label, cultured on top of fibroblast-derived ECMs (Fig 2A). Tumor cells were then treated with drugs targeting the mutant BRAF/MAPK pathway using BRAFi alone or in combination with MEKi (Fig 2B). Cell proliferation was monitored using live cell time-lapse imaging and quantified by counting the number of fluorescent nuclei. Cell growth inhibition induced by BRAFi alone (vemurafenib) or in combination with MEKi (trametinib) was abrogated when 1205Lu melanoma cells were cultured on top of fibroblast-derived ECMs, in sharp contrast to standard cell culture conditions where cells were plated either on plastic or on purified collagen 1

(Coll-1) (Figs 2C and D, and EV1A). In line with the organization of the 3D matrices depicted in Fig 1, drug-protective assays against BRAFi or BRAFi/MEKi combo-therapy revealed that MAF- and FRC-derived matrices display higher protective abilities compared to HDF-derived ECMs and conferred increased protection (Figs 2D and EV1A). Similar protective effects were observed with the SKMEL5 cell line and the MM099 patient-derived short-term melanoma culture when these cells were plated on the different experimental ECM settings (Figs 2E and EV1B). These data suggest that MMDR relies on the topological and molecular features of the ECM. Cell cycle analysis in SKMEL5 and MM099 cells further showed that experimentally produced ECM from HDF, MAF, or FRC prevented

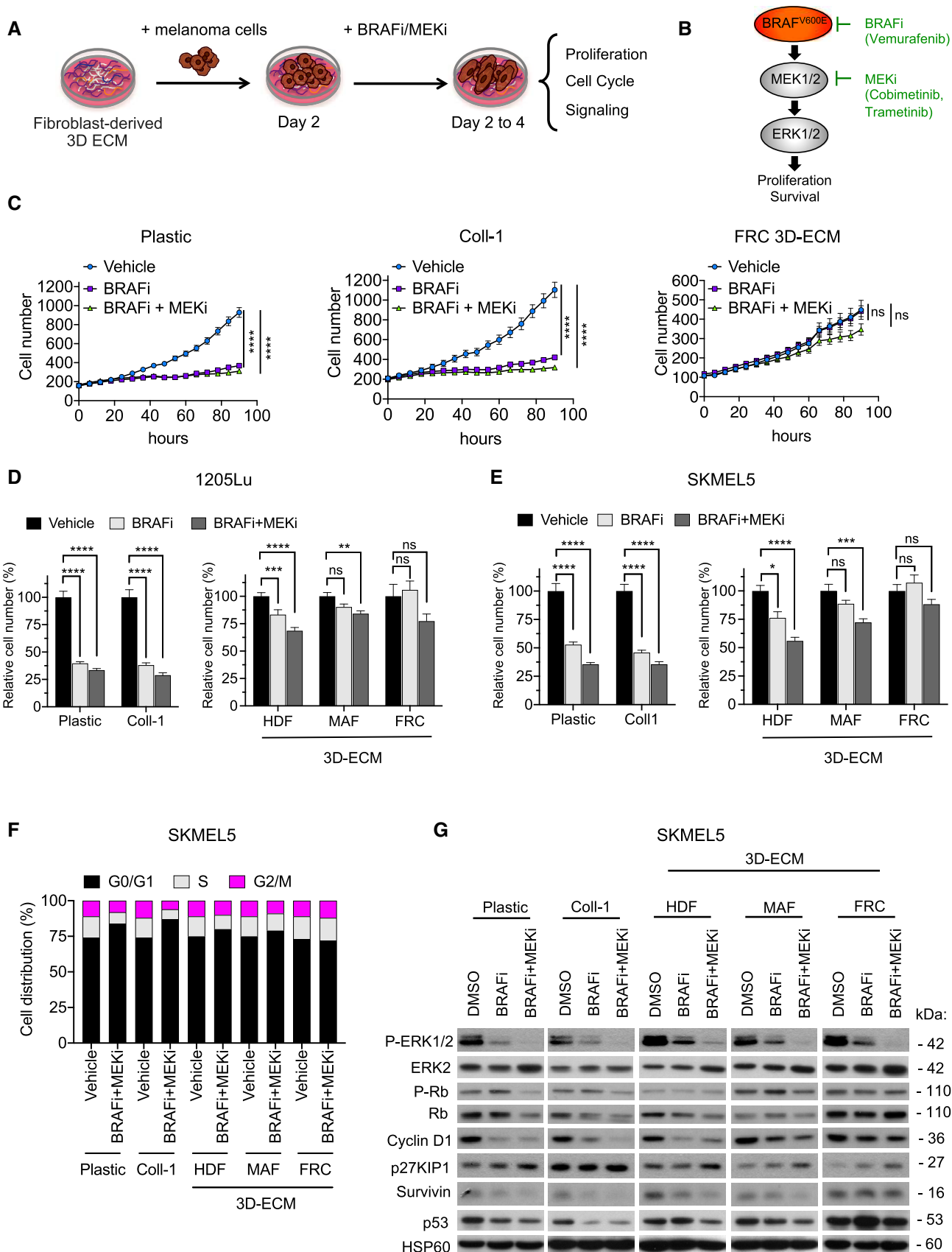


Figure 2.

Figure 2. Fibroblast-derived 3D ECM confers drug-protective action to melanoma cells against anti-BRAF^{V600} therapies.

- A Scheme of the ECM-mediated drug-protective assay.
- B Illustration of the BRAF^{V600E} pathway and the MAPK pathway inhibitors used in the study.
- C Time-lapse imaging of proliferation of NucLight-labeled 1205Lu cells plated on plastic (left panel), Coll-1 (collagen 1; middle panel), or FRC-derived ECM (right panel) and treated with vehicle, 5 μ M BRAFi, or 2 μ M BRAFi plus 0.01 μ M MEKi using the IncuCyte ZOOM system. Each data point represents the mean of NucLight red nuclear objects per field \pm SEM. **** P < 0.0001, two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. Data are representative of $n = 3$ independent experiments.
- D, E Quantification of proliferation of 1205Lu (D) and SKMEL5 (E) cells plated for 48 h on plastic, Coll-1, or the indicated fibroblast-derived ECMs prior to a 96-h treatment with vehicle, 5 μ M BRAFi, or 2 μ M BRAFi plus 0.01 μ M MEKi. Cells were counted by Hoechst-labeled nuclei staining. Data are represented as bar plots with mean \pm SEM normalized to vehicle of 3 independent experiments. (D) ** P = 0.015, *** P = 0.0009, and **** P < 0.0001; and (E) * P = 0.0204, *** P = 0.0006, and **** P < 0.0001, the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.
- F Flow cytometry analysis of cell cycle distribution of SKMEL5 cells cultured on plastic, Coll-1, or the indicated fibroblast-derived ECMs and treated with vehicle or 2 μ M BRAFi combined with 0.01 μ M MEKi. The percentage of cells in different phases of the cell cycle is indicated.
- G Immunoblotting of protein extracts from SKMEL5 cells cultivated as described above on plastic, Coll-1, or the indicated fibroblast-derived ECMs in the presence or not of BRAFi or BRAFi/MEKi for 96 h, using antibodies against p-ERK1/2, ERK2, or cell cycle markers (p-Rb, Rb, cyclin D1, p27KIP1, survivin, and p53). HSP60, loading control.

Source data are available online for this figure.

the G0/G1 cell cycle arrest, induced by the BRAFi/MEKi cocktail in contrast to the cell culture conditions on plastic or Coll-1-plated dishes (Figs 2F and EV1C). The ECM therefore transmits signals that prevent the cytostatic action of MAPK pathway inhibitors. At the molecular level, ECM-mediated therapeutic escape of SKMEL5, 1205Lu, and MM099 cells from BRAF pathway inhibition was associated with sustained levels of the proliferation markers phosphorylated Rb, cyclin D1, and survivin, and lower levels of the cell cycle inhibitor p27KIP1, although ERK1/2 phosphorylation was similarly decreased in the presence of the targeted drugs in all culture conditions (Figs 2G and EV1D). Immunoblot analysis also suggested that upon BRAF inhibition, the levels of proliferative markers were higher in melanoma cells on MAF- and FRC-derived ECMs than on HDF-derived ECMs. In contrast, no significant changes in p53 levels were observed. Together, these results indicate that fibroblasts assembled and remodeled matrices that provide a drug-tolerant environment for BRAF mutant melanoma cell lines and short-term cultures.

Expression of the collagen receptors DDR1 and DDR2 in melanoma

Previous studies have demonstrated the critical role of ECM receptors belonging to the integrin family in drug resistance (Seguin *et al*, 2015). Moreover, BRAF inhibition has been described to generate a drug-protective stroma with high β 1 integrin/FAK signaling, as a

result of the paradoxical action of BRAFi on MAF (Hirata *et al*, 2015). Yet, in our experimental conditions, we were unable to show a significant implication of the β 1 integrin/FAK axis in drug protection conferred by fibroblast-derived ECMs. Indeed, the addition of blocking β 1 integrin antibodies and the depletion of FAK both failed to prevent the protective properties of fibroblast-derived ECM against the growth and survival inhibitory signals induced by BRAFi (Appendix Fig S2).

This finding prompted us to interrogate the contribution of other ECM receptors in targeted therapy resistance. Keeping in mind the elevated levels of fibrillar collagens found in fibroblast-derived ECMs (Fig 1B; Appendix Fig S1), we examined the functional implication of the collagen tyrosine kinase receptors DDR1 and DDR2 (Shrivastava *et al*, 1997; Vogel *et al*, 1997). The analysis of TCGA datasets for cutaneous melanoma showed that the *DDR1* and *DDR2* genes were genetically altered in 20% and 13% of melanoma cases, respectively. Interestingly, a significant fraction of melanomas was found to be associated with an amplification of DNA copy number and higher mRNA levels of *DDR1* and *DDR2* (respectively 13% and 10% of samples) (Fig 3A). This is consistent with the notion that these collagen receptors may play an important role in melanoma pathogenesis. Immunohistochemical analysis of *DDR1* and *DDR2* expression in benign nevi and malignant primary and metastatic melanocytic skin lesions further showed that *DDR1* and *DDR2* levels significantly increased during melanoma progression, indicating that *DDR1* and *DDR2* may represent novel prognostic factors for

Figure 3. Expression of DDR1 and DDR2 in human melanoma.

- A Meta-analysis of 363 cutaneous melanoma from TCGA (skin cutaneous melanoma, PanCancer Atlas) (<http://www.cbioportal.org/>) showing the percentage of samples with genetic alterations in *DDR1* and *DDR2*. Cases with missense (green) and truncating (blue) mutations, amplification (red), and mRNA overexpression (pink) are indicated; gray, individual cases.
- B Immunohistochemical analysis of *DDR1* and *DDR2* levels on human melanoma tissue microarrays. Representative IHC images and quantification (right bar histograms) of *DDR1* and *DDR2* expression in normal skin, nevus, primary melanoma (PM), and lymph node melanoma metastases (MM). Scale bar, 100 μ m. Histological scoring of the samples was performed in a blinded fashion. Samples were scored as low, medium, or high for *DDR1* or *DDR2* expression (nevus, $n = 12$; PM, $n = 30$; and MM, $n = 20$).
- C–E Immunoblotting of equal amounts of protein extracts from melanoma cell lines (C), patient-derived short-term cell cultures (D), or isogenic pairs of parental-sensitive and BRAFi-resistant cell lines (E) using antibodies against *DDR1*, *DDR2*, or markers of the melanoma cell differentiation *AXL*, *MITF*, or *SOX10*. ERK2, loading control.
- F *DDR1* and *DDR2* levels increase in de-differentiated melanoma cells. Box-and-whisker plots show *DDR1*, *DDR2*, *MITF*, *AXL*, and *SOX10* expression among four differentiation melanoma cell states (U, undifferentiated, $n = 10$; NC, neural crest-like, $n = 14$; T, transitory, $n = 12$; and M, melanocytic, $n = 17$) (GSE80829). The expression of *AXL*, *MITF*, and *SOX10* is shown as control markers of cell differentiation. n , number of cell lines representative of each cell state. Central bars represent the median, and the whiskers, the 10th to 90th percentile of the boxplot. Multiple comparisons were performed using ordinary one-way ANOVA.

Source data are available online for this figure.

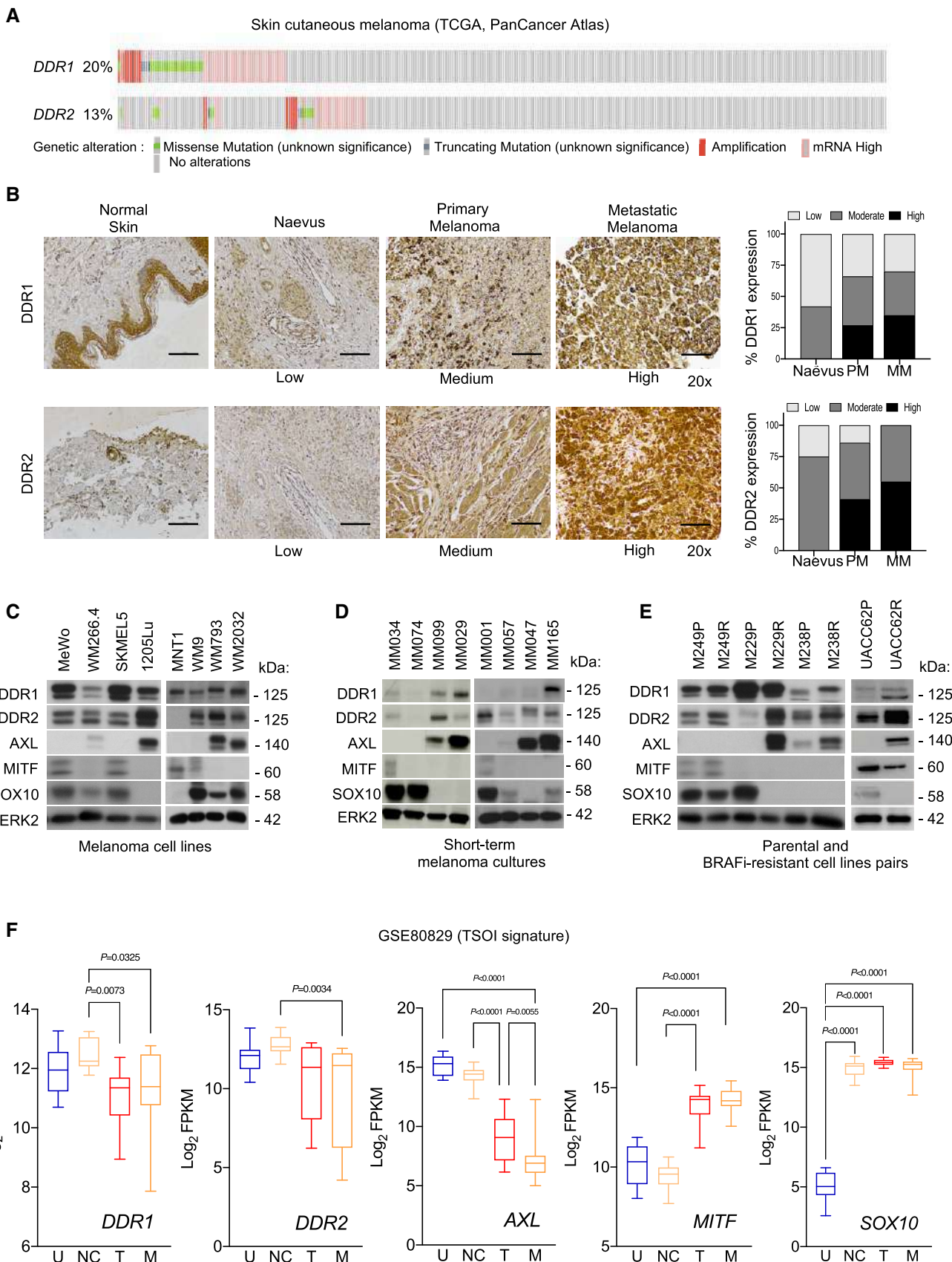


Figure 3.

melanoma (Fig 3B; Appendix Fig S3). We next examined the levels of DDR1 and DDR2 in a collection of melanoma cell lines and short-term melanoma cultures in relation to the cell state differentiation markers MITF, SOX10, and AXL. DDR1 and DDR2 were both expressed in melanoma cell lines regardless of their differentiation of cell phenotype (Fig 3C). In patient-derived short-term melanoma cultures, higher DDR1 and DDR2 protein levels were detected in BRAF mutant MM099 and MM029 and NRAS mutant MM165 cells with the MITF^{low}, SOX10^{low}, and AXL^{high} de-differentiated phenotype signature (Fig 3D). Moreover, higher levels of DDR2 were found to be associated with lower levels of the melanocytic marker MITF and higher levels of the drug-resistant marker AXL in de-differentiated mesenchymal-like BRAFi-resistant M229R, M238R, and UACC62R cells compared to their parental counterparts (Nazarian *et al*, 2010; Girard *et al*, 2020; Misek *et al*, 2020) (Fig 3E). The examination of public gene expression datasets of the melanoma differentiation signature confirmed that *DDR1* and *DDR2* levels were increased in the undifferentiated (U) and neural crest-like (NC) cell subpopulations from the TSOI signature (Fig 3F; Tsoi *et al*, 2018) and in the invasive MITF^{low} cells from the HOEK signature (Appendix Fig S4; Widmer *et al*, 2012). De-differentiated/undifferentiated melanoma cells display intrinsic resistance to MAPK pathway inhibition (Muller *et al*, 2014; Tsoi *et al*, 2018; Rambow *et al*, 2019). In line with this notion, we found that DNA amplification and elevated mRNA levels of *DDR1* negatively correlated to the activity of BRAF and MEK inhibitors in melanoma cell lines from the GDSC (Genomic of Drug Sensitivity in Cancer) (Appendix Fig S5). Together, these observations associate DDR expression with melanoma progression and with the invasive and therapy-resistant phenotype.

Targeting DDR impairs ECM-mediated resistance to oncogenic BRAF pathway inhibition

Next, we compared how fibroblast-derived ECMs modulate DDR phosphorylation, an event linked to their activity (Shrivastava *et al*, 1997; Vogel *et al*, 1997). Immunoblot analysis of lysates from 1205Lu and MM099 cells plated on MAF- and FRC-derived ECMs indicated that MAF-derived matrices have a stronger ability to increase the levels and phosphorylation of DDR1 and/or DDR2

compared to HDF-derived matrices (Fig EV2A), supporting a functional implication of DDR in melanoma drug tolerance. Interestingly, while BRAF and/or MEK inhibition had no significant effect on DDR phosphorylation in 1205Lu cells cultivated on MAF-derived ECM, MEK inhibition seemed to increase DDR1 expression levels (Appendix Fig S6). To address the contribution of DDR in MMDR, a siRNA approach was then used to target DDR1, DDR2, or both in melanoma cells cultured on MAF- or FRC-derived ECMs, in the presence of BRAFi alone or in combination with MEKi. Immunoblot analysis showed specific DDR1 and DDR2 protein reduction after siRNA transfection using two different targeted sequences in BRAFi-treated 1205Lu cells cultured on MAF- or FRC-derived ECMs (Figs 4A and EV2B). Compared to the single knockdown, the simultaneous knockdown of DDR1 and DDR2 overcame MMDR to BRAF-targeted therapy as revealed by decreased levels of cell proliferation markers, including phosphorylated Rb, survivin, and E2F1, in 1205Lu and SKMEL5 cells (Fig 4A and B). Importantly, depletion of both DDR1 and DDR2 enhanced the cytotoxic activity of co-targeting BRAF/MEK as shown by the increased cleavage of apoptotic caspase-3 that was detected in SKMEL5 and MM099 melanoma cells (Figs 4B and EV2C). DDR are druggable receptors targeted by imatinib, a tyrosine kinase inhibitor (TKI) initially developed as an ABL inhibitor, which also inhibits DDR activity with high efficacy (Day *et al*, 2008). Imatinib belongs to therapeutic molecules used in the clinic for the treatment of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome (Druker *et al*, 2001). Enzymatic activities of DDR were also inhibited by other small molecules including DDR1-IN-1 (Kim *et al*, 2013). We first confirmed that imatinib and DDR1-IN-1 efficiently inhibited type I collagen-induced DDR1 and DDR2 tyrosine phosphorylation in 1205Lu cells (Fig EV2D). Inhibition of DDR1/2 kinases by imatinib or DDR1-IN-1 suppressed the protective action of MAF- and FRC-derived ECMs against BRAF inhibition, as evidenced by the significant decrease in 1205Lu cell proliferation, which was observed after co-treatment with BRAFi and DDR1/2 inhibitors (Figs 4C and EV2E). Similar anti-proliferative effects of DDR inhibitors were observed during drug-protective assays performed in SKMEL5 and MM099 cells on MAF- or FRC-derived ECMs (Fig EV2F and G). Mutant BRAF and DDR1/2 co-targeting in the three melanoma cell lines plated on FRC- or MAF-derived ECMs decreased levels of phosphorylated Rb, E2F1, and survivin, and induced

Figure 4. Inhibition of DDR1 and DDR2 by genetic or pharmacological approaches abrogates ECM-mediated resistance to BRAF^{V600} pathway inhibition.

- Immunoblotting of protein extracts from 1205Lu cells transfected with a siRNA control (CTRL) or two different sequences of siRNA (#1 and #2) directed against DDR1 or DDR2 alone or in combination prior to being cultivated on MAF-derived ECM and treated or not with 5 μ M BRAFi for 96 h, using antibodies against the indicated proteins. HSP60, loading control.
- Immunoblotting of protein extracts from SKMEL5 cells transfected with siCTRL or the combination of siDDR1#2 and siDDR2#2 prior to being cultivated on FRC- or MAF-derived ECMs (left and right panels, respectively) and treated with vehicle, 5 μ M BRAFi, or 2 μ M BRAFi plus 0.01 μ M MEKi, using antibodies against the indicated proteins. HSP60, loading control.
- Quantification of the time-lapse imaging of the proliferation of NucLight-labeled 1205Lu cells using the IncuCyte ZOOM system. Cells were plated for 48 h on FRC- or MAF-derived ECMs prior to a 96-h treatment with vehicle or 5 μ M BRAFi in the presence or not of 7 μ M imatinib or 1 μ M DDR1-IN-1. The bar plots represent the mean normalized to vehicle of NucLight red nuclear objects per field \pm SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. **** P < 0.0001, two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test.
- Immunoblotting of protein extracts from 1205Lu, SKMEL5, and MM099 cells plated for 48 h on FRC-derived ECM prior to a 96-h treatment with vehicle or 5 μ M BRAFi in the presence or not of imatinib (7 μ M for 1205Lu, 10 μ M for SKMEL5 and MM099) or DDR1-IN-1 (1 μ M for 1205Lu, 5 μ M for SKMEL5, and 3 μ M for MM099), using antibodies against the indicated proteins. HSP60, loading control.
- Flow cytometry analysis of cell death (Annexin V/PI labeling) in 1205Lu cells plated on FRC-derived ECM and treated as above. Right bar plots show the distribution of cells (% of total) across the different forms of death.

Source data are available online for this figure.

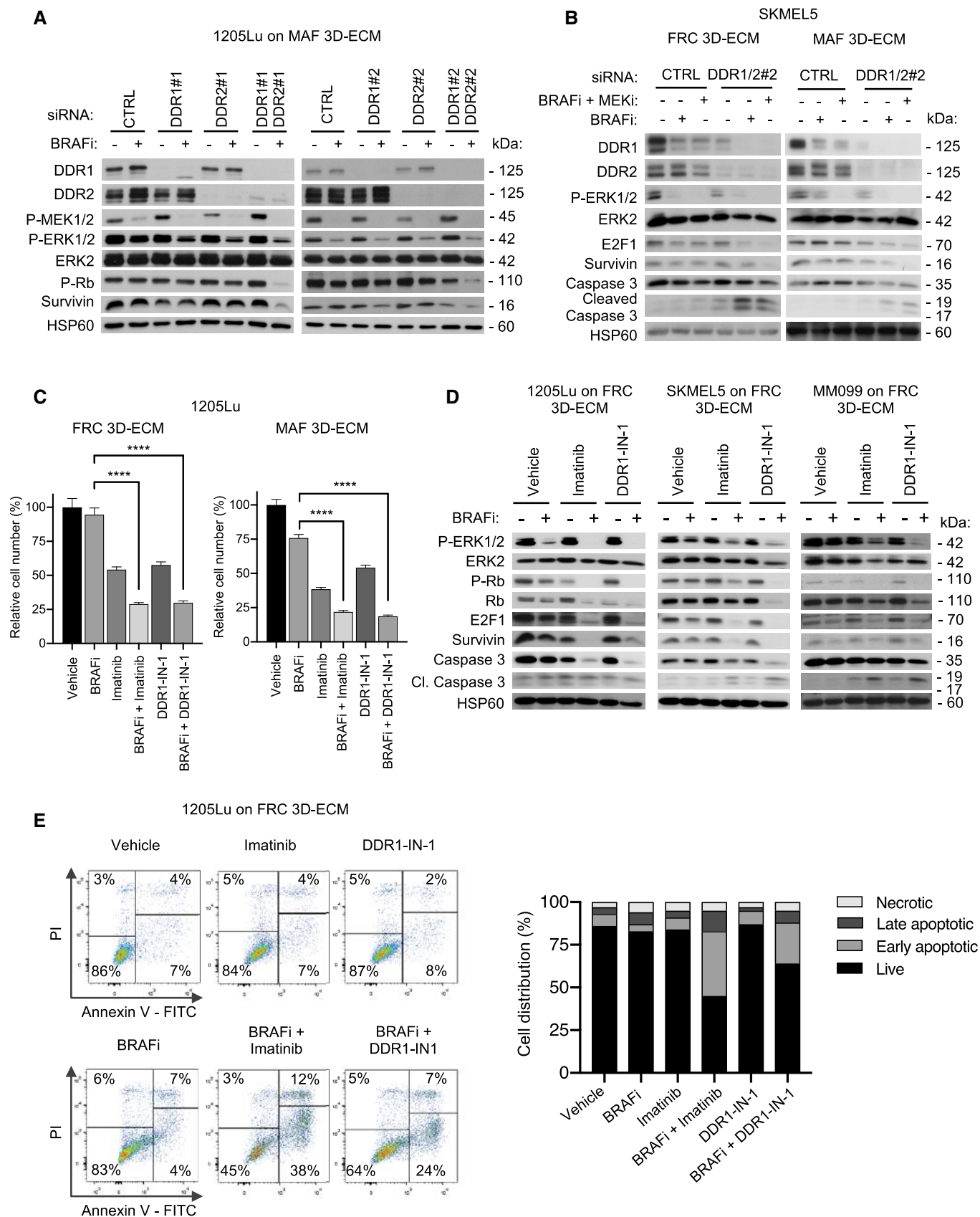


Figure 4.

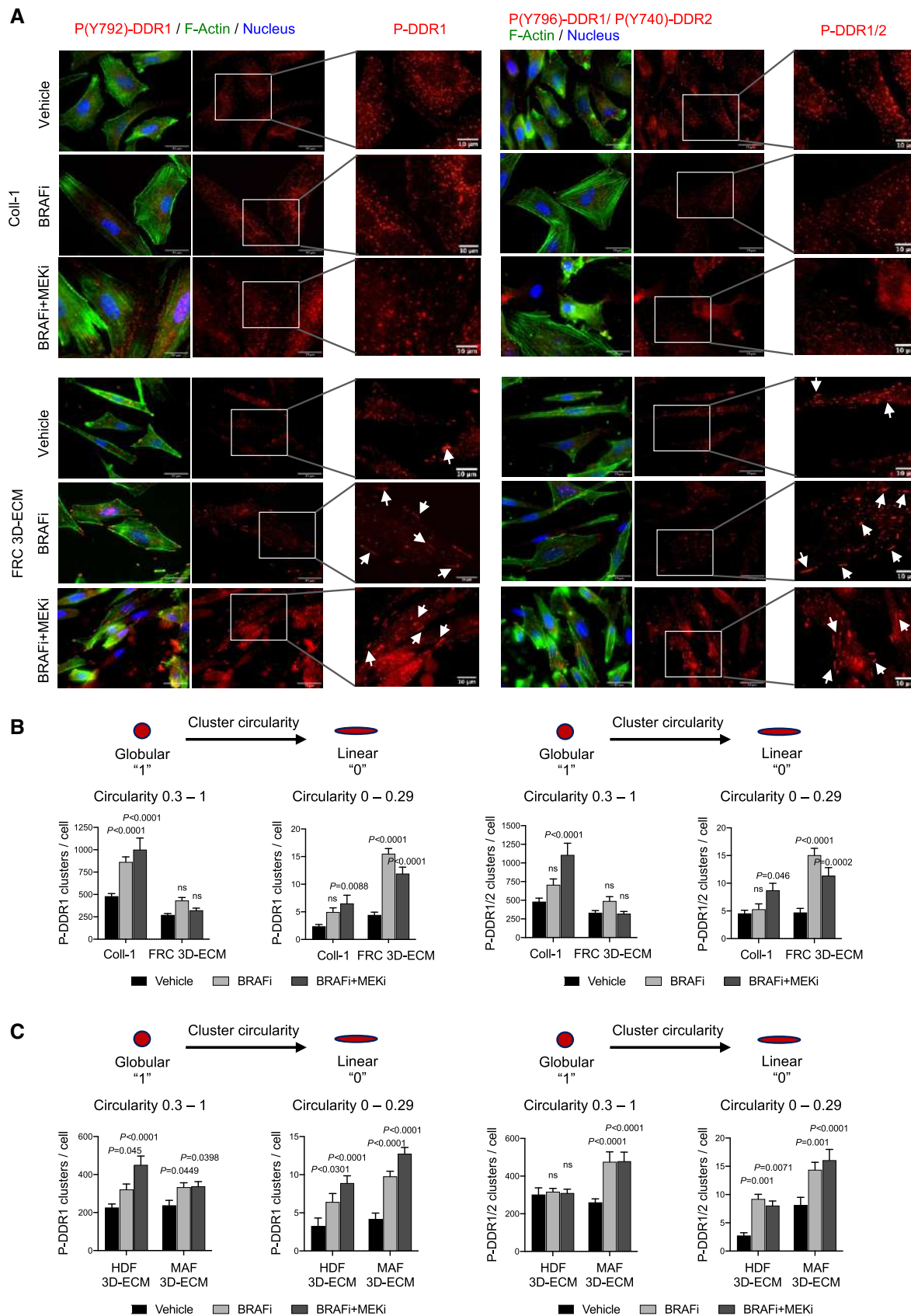


Figure 5.

Figure 5. Interaction of melanoma cells with 3D ECMs induces the linear clustering of phosphorylated DDR upon BRAFi/MEKi treatment.

- A Representative images of 1,205 cells cultivated on collagen I (Coll-I) or FRC-derived ECM for 48 h prior to treatment with vehicle or 5 μ M BRAFi or 2 μ M BRAFi plus 0.01 μ M MEKi for 96 h. Immunofluorescence for phospho-DDR1 (P(Y792)-DDR1) (red; left panels) and phospho-DDR1/2 (P(Y796)-DDR1/P(Y740)-DDR2) (red; right panels), F-actin (green), and nuclei (blue) is shown. Enlarged images of P-DDR1 and P-DDR1/2 immunostaining are shown. White arrows indicate P-DDR1 and P-DDR1/2 cell membrane linear clustering. Scale bar, 25 μ m (enlarged images: scale bar, 10 μ m).
- B Quantification of globular versus linear clusters of phospho-DDR1 (left panels) and phospho-DDR1/2 (right panels) from immunofluorescence staining shown in (A) using ImageJ software. Prior to the quantification of DDR clusters, a “subtract background” function of ImageJ has been applied to all images. In order to quantify clusters, the IsoData threshold has been used. Clusters with circularity 0.3–1 have been defined as “globular”, and clusters with circularity 0–0.29 have been defined as “linear”. Data are from > 20 individual cells ($n = 3$). Error bars reflect mean \pm s.d. Values for each treated condition are compared to the vehicle control. 2-way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparisons test.
- C Quantification of globular versus linear clusters of Phospho-DDR1 and Phospho-DDR1/2 from immunofluorescence staining shown in Fig EV4A of 1205Lu cells cultivated on HDF- or MAF-derived ECM and treated with the indicated targeted drugs as described in (A). Data are from > 20 individual cells. Error bars reflect mean \pm s.d. Values for each treated condition are compared to the vehicle control. 2-way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparisons test.

Source data are available online for this figure.

caspase-3 cleavage (Figs 4D and EV3A and B). Similar biochemical events were promoted by BRAFi or with the combined BRAFi and MEKi treatment, in the presence of nilotinib, a next-generation BCR-ABL inhibitor that is approved for the treatment of imatinib-resistant patients and targeting DDR1/2 (Day *et al.*, 2008; Fig EV3C). Induction of apoptosis in co-treated melanoma cells was further confirmed using flow cytometry analysis of cell death markers (Figs 4E and EV3D).

Recent studies described that collagen binding to DDR leads to their activation and clustering into filamentous membrane structures that are associated with collagen fibrils (Yeung *et al.*, 2019). We thus examined the clustering and spatial distribution of phosphorylated DDR in melanoma cells plated on collagen I-coated plastic dishes or on 3D ECMs, in response to oncogenic BRAF pathway inhibition. To detect DDR1 and/or DDR2, we used an antibody that specifically recognizes phosphorylated DDR1 at Y792 and an antibody that not only recognizes phosphorylated DDR2 at Y740 but also cross-reacts with the phosphorylated DDR1 (Yeung *et al.*, 2019). Immunofluorescence staining of P-DDR1 and P-DDR1/2 revealed that 1205Lu cells, which were cultured on purified collagen I, displayed a globular dot-like distribution of these two receptors, whereas cells seeded on FRC-derived 3D ECMs exhibited a fraction of P-DDR distributed into linear membrane clusters (Fig 5A and B). Importantly, cell exposure to BRAFi or to BRAFi/MEKi combination therapy dramatically increased the proportion of P-DDR1 and P-DDR1/2 containing linear clusters, on FRC-derived 3D ECM, as well as F-actin remodeling (Fig 5A and B).

Notably, the formation of linear clusters of P-DDR1 and P-DDR1/2 upon MAPK pathway inhibition is also significantly increased in

cells plated on MAF-derived 3D ECMs compared to cells cultured on HDF-derived ECMs (Figs 5C and EV4A), and these clusters colocalized with collagen fibers (Fig EV4B). Similar observations on phosphorylated DDR clustering were obtained with SKMEL5 melanoma cells (Fig EV4C and D). These data suggest that therapy-induced cytoskeletal changes drive a linear clustering of phosphorylated DDR along collagen fibers and subsequently cause MMDR. These findings therefore suggest that DDR1 and DDR2 determine BRAF mutant melanoma cell responsiveness to BRAF-targeted therapy, with regard to ECM features and that the drug-tolerant action of DDR is dependent on their enzymatic activities and correlates with the formation of filamentous membrane structures.

Pharmacological inhibition of DDR by imatinib improves targeted therapy efficacy, counteracts drug-induced collagen remodeling, and delays tumor relapse

The anti-tumor activity of imatinib combined with the BRAFi vemurafenib was assessed in a preclinical xenograft melanoma model. BRAF-mutated melanoma cells (1205Lu) were subcutaneously xenografted into nude mice (CDX model), which were exposed to BRAFi, imatinib, or BRAFi plus imatinib (Fig 6A). As expected, BRAF inhibition induced a rapid tumor reduction, whereas imatinib alone did not display a significant anti-melanoma effect (Fig 6B). However, following 12 days, tumors treated with BRAFi alone had resumed growth, whereas the combination treatment with imatinib markedly delayed tumor relapse and led to a significant reduction in tumor volume (Fig 6B–D) and weight (Fig 6C). Immunohistochemical

Figure 6. Targeting DDR by imatinib sensitizes melanoma tumors to BRAF^{V600E} inhibition.

- A Outline of the experimental setup and treatment regimens.
- B 1205Lu cells were s.c.-inoculated into nude mice, and when tumors reached 75 mm³, mice were treated with the indicated mono- or combo-therapy for 30 days. Graphs show tumor growth following treatment by indicated drugs. Data shown are mean \pm SEM of tumor volume. Vehicle and imatinib groups, $n = 10$ tumors from 5 mice; vemu and vemu/imatinib groups, $n = 20$ tumors from 10 mice). **** $P < 0.0001$, two-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparisons test.
- C Scatter plot graphs showing the tumor weight upon treatment by the indicated mono- or combo-therapy. Error bars show mean \pm SEM of tumor weight ($n = 10$ –11 tumors from 6 mice per condition). *** $P = 0.0002$, the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparisons test; ns, non-significant.
- D Immunofluorescence staining using anti-cleaved caspase-3 (red), anti-Ki67 (green), and DAPI in tumor sections of 1205Lu-derived xenografts from (B). Scale bar, 100 μ m. A microphotograph of the tumor size in each treated group is shown (representative of $n = 5$ –10 mice).
- E Kaplan–Meier survival curves of mice treated with vehicle, imatinib, BRAFi, or BRAFi plus imatinib. Median time to progression was 18, 20, 36, and 48 days, respectively. Log rank (Mantel–Cox) for BRAFi vs BRAFi/imatinib mesylate. **** $P < 0.0001$ and hazard ratio (log rank): 0.2403 (95% CI of ratio, 0.08123–0.7106).
- F Mouse body weight was measured at the indicated day. Data shown are mean \pm SEM ($n = 5$ –10 mice).

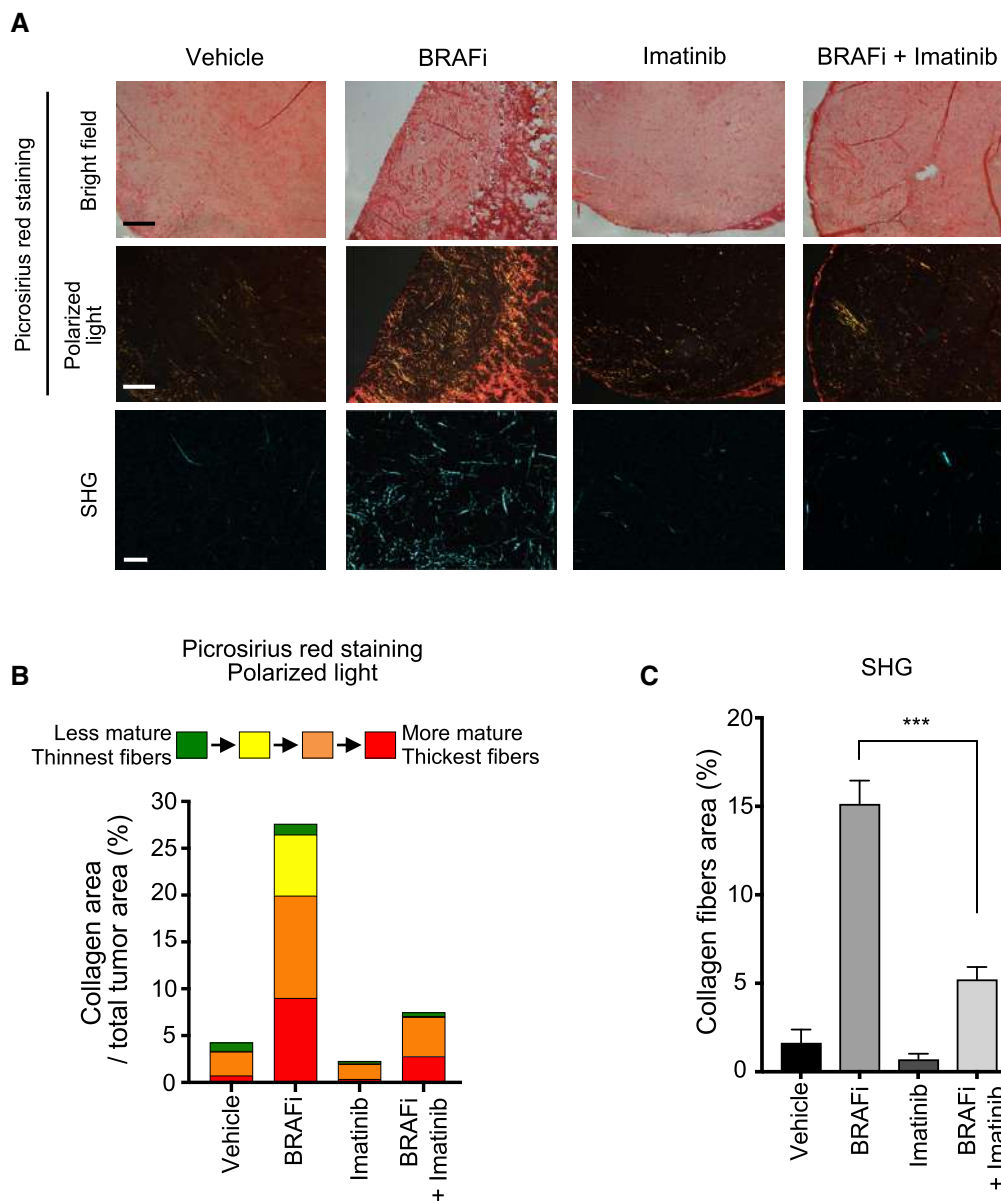


Figure 7. Imatinib normalizes collagen deposition and remodeling induced upon BRAFi treatment.

- A Sections of 1205Lu xenografts from Fig 6B were stained with picrosirius red and imaged under transmission light (upper panels) or polarized light (middle panels) (scale bar, 500 μ m) or imaged by second harmonic generation (SHG) microscopy (lower panels) (scale bar, 50 μ m) to examine collagen fiber network upon the mono- or combined regimens.
- B Quantification of collagen maturity and fiber thickness in 1205Lu xenografts stained with picrosirius red using polarized light microscopy. Birefringence hue and amount of collagen fibers were quantified as a percent of total tissue area (2–4 fields per tumor section, $n = 4$ tumors per condition).
- C Quantification of collagen fibers using SHG microscopy in tumor sections from (A). Error bars represent mean \pm s.d. of 4 independent fields per section, $n = 2$ tumors per condition. *** $P = 0.0002$, the Mann–Whitney test.

treatment with BRAFi (Jenkins *et al*, 2015; Girard *et al*, 2020), we next investigated collagen content and fiber organization in tumor tissues from mice treated with the different regimens. Histochemical analysis showed that BRAFi treatment triggered a profound remodeling of the melanoma stromal ECM (Fig 7A), with marked increase in the collagen fibers' area and thickness, which was suppressed by imatinib. Collagen color analysis under polarized light showed a decrease in mature orange and red fibers in tumors treated with the

combined regimen, compared to the single-agent treatment (Fig 7B). Finally, tumor imaging with second harmonic generation (SHG) confirmed the fibrillar nature of the collagen network that was rearranged upon BRAFi treatment but not upon the combined BRAFi and imatinib treatment (Fig 7A–C). These data suggest that treatment with imatinib counteracts the adverse effect of the targeted therapy on aberrant collagen deposition and organization, a process potentially contributing to drug resistance and relapse.

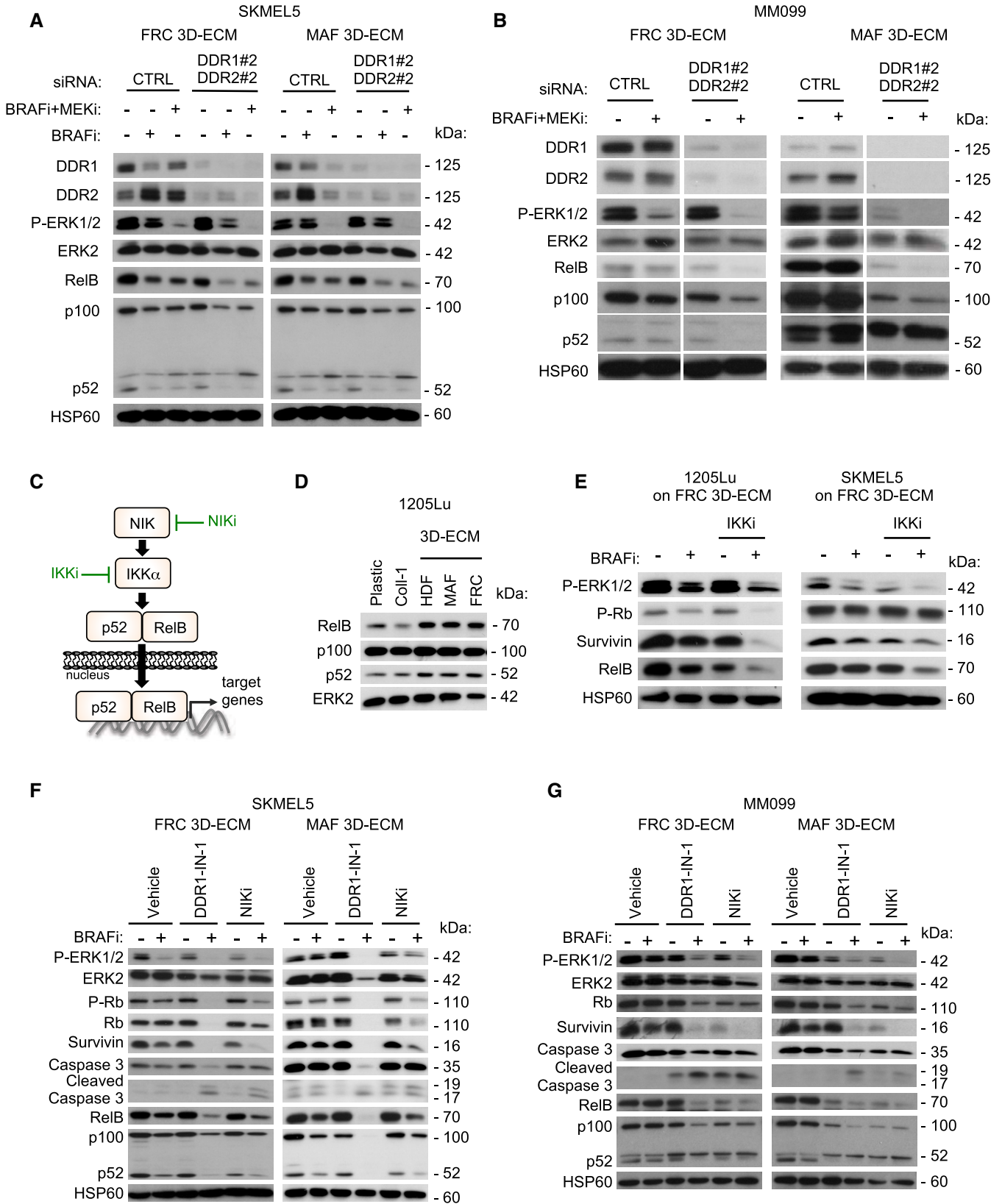


Figure 8.

Figure 8. Targeting the non-canonical NF- κ B2 pathway overcomes DDR-dependent MMDR to BRAF^{V600E} pathway inhibition.

- A Immunoblot analysis of protein extracts from siCTRL- or siDDR1/2-transfected SKMEL5 cells plated on FRC- or MAF-derived ECMs in the presence or not of 5 μ M BRAFi, 2 μ M BRAFi, plus 0.01 μ M MEKi for 96 h using antibodies against DDR1, DDR2, P-ERK1/2, ERK2, RelB, p100/p52, and HSP60 as loading control.
- B Immunoblot analysis of protein extracts from siCTRL- or siDDR1/2-transfected MM099 short-term cultures plated on FRC- or MAF-derived ECMs in the presence or not of 2 μ M BRAFi plus 0.01 μ M MEKi for 96 h using antibodies as above. Note that data come from the same immunoblot.
- C Illustration of the non-canonical p52/RelB NF- κ B2 pathway and inhibitors used in the study.
- D Immunoblot analysis of protein extracts from 1205Lu cells cultivated on plastic, Coll-1, or indicated fibroblast-derived ECMs for 48 h using antibodies against RelB, p100/p52, and ERK2 as loading control.
- E Immunoblot analysis of protein extracts from 1205Lu (left panels) or SKMEL5 (right panels) cells cultivated on FRC-derived ECMs for 96 h in the presence of 5 μ M BRAFi and/or a pan- IKK inhibitor (IKKi, BMS-345541 3 μ M) using antibodies against P-ERK1/2, P-Rb, survivin, RelB, and HSP60 as loading control.
- F, G Immunoblot analysis of protein extracts obtained from SKMEL5 (F) or MM099 (G) cells plated on FRC- or MAF-derived ECMs and treated with 5 μ M BRAFi in combination or not with DDR1-IN-1 (5 μ M for SKMEL5 and 3 μ M for MM099) or 10 μ M NIK inhibitor (NIKi) for 96 h. Antibodies against P-ERK1/2, ERK2, P-Rb, Rb, survivin, caspase-3, cleaved caspase-3, RelB, p100/p52, and HSP60 as loading control were used.

Source data are available online for this figure.

MMDR involves a targetable pro-survival NIK/IKK α /NF- κ B2 pathway

Finally, we wished to better characterize at the molecular level the MMDR process that is promoted by collagen receptors DDR1 and DDR2. To identify MMDR-related signaling pathways triggered by their tyrosine kinase activity, we performed a phospho-kinase screening with protein extracts from melanoma cells cultured on fibroblast-derived 3D ECMs or plastic, in the presence of BRAFi. Unfortunately, this approach did not reveal any significantly augmented kinase activity or increased phosphorylation of kinase substrates (Appendix Fig S7A and B). Moreover, consistent with the results of the phospho-kinase screening, using immunoblot analysis, we did not observe by immunoblot analysis any changes in the phosphorylation of the AKT survival pathway in melanoma cells cultured under MMDR conditions (Appendix Fig S7C). On the contrary, compared to siCTRL cells, biochemical analysis of DDR-silenced melanoma cells revealed that the concomitant depletion of the two receptors decreased the expression of RelB, NF- κ B2 precursor protein p100, and NF- κ B2 p52 processed form, in SKMEL5 and MM099 cells cultured in MMDR conditions, following exposure to BRAFi alone or in combination with MEKi (Fig 8A and B). A similar decrease in RelB and p100 was observed in DDR-depleted 1205Lu cells, following treatment with targeted agents (Fig EV5A). Consistent with these results, pharmacological inhibition of DDR using imatinib that impaired melanoma MMDR by triggering cell cycle arrest and apoptosis decreased in a time-dependent manner the expression of RelB in 1205Lu cells cultured in MMDR conditions (Fig EV5B).

RelB and p52 are components of the non-canonical NF- κ B2 pathway (Taniguchi & Karin, 2018), which is activated by the upstream kinases NIK (NF- κ B-inducing kinase) and IKK α (I κ B kinase) (Fig 8C). Interestingly, levels of RelB and p52 were found to be elevated in melanoma cells cultured on fibroblast-derived ECMs compared to plastic and collagen-coated dishes (Fig 8D). Using a pan- IKK inhibitor BMS-345541 (Figs 8E and EV5C and D) and a recently developed NIK inhibitor (NIKi; Mondragon *et al*, 2019; Figs 8F and G, and EV5E), we confirmed the implication of the NF- κ B2 pathway in MMDR, as illustrated by decreased cell cycle markers (pRb and survivin) and increased caspase-3 cleavage, in BRAFi-treated melanoma cells cultured on FRC- or MAF-derived ECMs. Comparable decreased levels of p52 and RelB, as well as cell cycle markers, were observed following pharmacological targeting of DDR and NIK in MMDR conditions (Figs 8F and G, and EV5E). Together,

our findings suggest that melanoma cell adaptation to oncogenic MAPK pathway inhibition involves the interaction of tumor cells with the mesenchymal stroma enriched in fibrillar collagens, thereby promoting DDR-dependent activation of the NF- κ B2/RelB pathway (Fig 9).

Discussion

Preventing melanoma resistance and relapse to targeted therapy remains a significant challenge for successful disease management. Emerging evidence suggests that stromal components of the tumor microenvironment, including the ECM, play a key role in establishing resistant niches by allowing melanoma cells to rapidly adapt and tolerate therapeutic drugs, before mutation-driven resistance mechanisms are acquired (Meads *et al*, 2009; Smith *et al*, 2016; Rambow *et al*, 2019). Here, we describe a novel mechanism of adaptation and tolerance to oncogenic BRAF pathway inhibition, which involves the dynamic interaction of melanoma cells with the ECM. When comparing cell-derived matrices produced by normal HDF, FRC, and MAF, we found that depending on fibroblast origin, properties of experimentally derived ECMs differ remarkably. MAF-derived ECMs exhibit a higher level of fiber organization and increased stiffness compared to ECMs generated by normal dermal fibroblasts (HDF). This is in agreement with what has been previously demonstrated by others (Gopal *et al*, 2017; Kaukonen *et al*, 2017). Interestingly, we observed that FRC, which are resident lymph node fibroblasts, harbor some phenotypic and functional properties similar to MAF such as myofibroblast-like properties. In this regard, FRC produce and remodel a stiff ECM enriched in fibrillar collagens. Consistent with this, we show that similar to MAF-derived ECM, the ECM generated by FRC provides melanoma cells with increased protection from targeted drugs, compared to ECMs generated from HDF. However, it is important to note that in contrast to classic 2D culture conditions, HDF-derived ECMs can confer protection against BRAF inhibition, indicating that MMDR is dependent on structural 3D ECM organization. Importantly, MMDR is described in three different BRAF mutant melanoma cells, regardless of their transcriptional phenotypic MITF/AXL signature.

Functionally, we demonstrate that collagen receptors DDR1 and DDR2 mediate MMDR to BRAF/MEK inhibitor therapy through a pro-survival NIK/IKK α /NF- κ B2 pathway. We show that DDR knock-down or the inhibition of their catalytic activity impairs drug

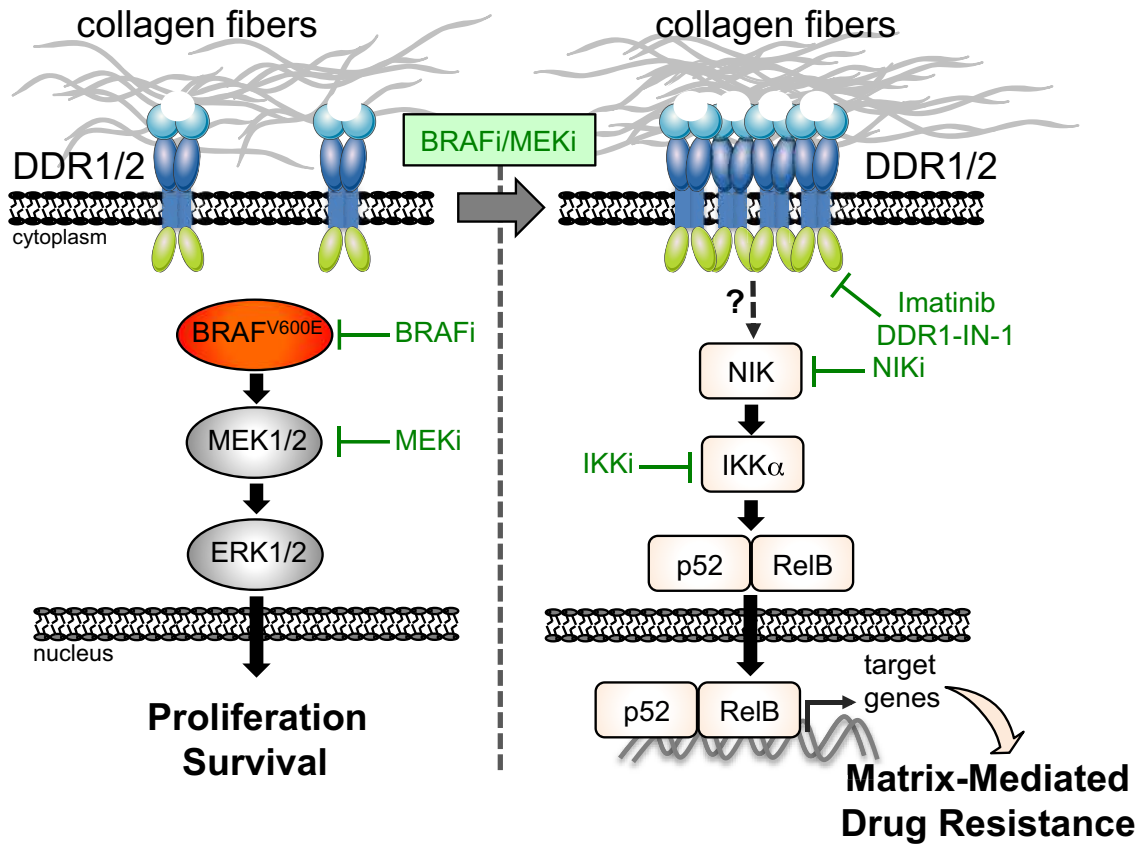


Figure 9. Model of DDR-dependent matrix-mediated drug resistance (MMDR) to MAPK-targeting therapies in melanoma.

BRAF-mutated melanoma cells adapt to BRAF/MEK inhibition by turning on a drug-tolerant pathway that is initiated by collagen-rich environments interacting with cancer cell DDR. Clustered DDR activates the non-canonical NF- κ B2 (p52/RelB) pathway that is therapeutically targetable with clinically approved DDR inhibitor such as imatinib or with preclinically tested NIK inhibitors.

tolerance that is promoted by MAF- or FRC-derived ECM and induces melanoma cell death. DDR1 and DDR2 are both expressed at different levels in the skin (Cario, 2018), particularly in the epidermis from which melanoma originates following the malignant transformation of melanocytes. Overlapping functions have been attributed to DDR1 and DDR2 in melanoma with regard to cancer cell growth and invasiveness. A recent study correlated high DDR1 expression in melanoma lesions with poor prognosis and showed that DDR1 controls melanoma cell invasion and survival (Reger de Moura *et al*, 2019). Other studies have reported that DDR2 depletion in melanoma cell lines reduced their invasive and metastatic abilities (Badiola *et al*, 2011; Poudel *et al*, 2015). Consistently, we observed augmented expression of the two receptors during the malignant transition from benign melanocytic lesions to metastatic melanoma and that their expression is linked with therapy-resistant melanoma cell populations. Our data therefore suggest that the function of DDR1 and DDR2 also overlaps during the response to BRAF^{V600}-targeted therapy. Accordingly, knockdown of both receptors is required to fully prevent MMDR to oncogenic BRAF pathway inhibition.

Collagen abundance has recently been identified as an important contributor to melanoma cell phenotype switching through lineage-specific microenvironment sensing (Miskolczi *et al*, 2018). Herein, we provide evidence for a role of collagen-rich matrices during the

adaptive phase of tolerance to targeted therapies. Interestingly, β 1 integrin, another collagen receptor that plays a major role in EMDR (Seguin *et al*, 2015), has also been linked to adaptive responses to BRAF inhibition via fibronectin-mediated activation of FAK, leading to MAPK pathway reactivation (Fedorenko *et al*, 2015; Hirata *et al*, 2015). Contrary to β 1 integrin, engagement of DDR by collagens mediates drug tolerance in the absence of MAPK/ERK pathway reactivation. This suggests that DDR participate in the early response to BRAF inhibition through a pathway distinct from that of β 1 integrin. Additionally, we show that fibroblast-derived ECMs promote phospho-DDR1/2 clustering into linear membrane structures aligned with collagen and resembling those described by others (Agarwal *et al*, 2007; Corcoran *et al*, 2019; Yeung *et al*, 2019). Importantly, receptor linear clustering is enhanced upon melanoma cell treatment with targeted therapies, thus making the involvement of this process during the early phase of drug adaptation highly probable. In addition, linear clustering of phospho-DDR upon BRAF pathway inhibition is favored on MAF- and FRC-derived ECMs compared to HDF-derived ECM, correlating with the topological organization of collagen fibers and their drug-protective effect. The exact mechanism underlying the induction of DDR clustering following MAPK pathway inhibition is, however, unknown.

Biochemical studies revealed that fibroblast-derived matrices enhance the activation of the non-canonical NF- κ B2 pathway that

account for most of the melanoma cell tolerance to BRAF/MEK inhibition. The NF- κ B/p52/RelB pathway represents a major alternative route of NF- κ B signaling (Taniguchi & Karin, 2018), which has been involved in drug resistance in myeloma (Landowski *et al*, 2003) and prostate cancer (Nadiminty *et al*, 2013). In melanoma, the NF- κ B2 pathway is upregulated compared to melanocytes and prevents melanoma senescence (De Donatis *et al*, 2016). In this study, we demonstrate that suppression of DDR signaling impairs MMDR by reducing NF- κ B2/p52/RelB expression. In addition, inhibition of NIK or IKK α , two upstream activators of the NF- κ B2 pathway (Taniguchi & Karin, 2018), also abrogates ECM-mediated resistance to BRAF pathway inhibition. Further supporting a potential role for the NF- κ B2 pathway in melanoma resistance to targeted therapy is the observation that the drug-resistant undifferentiated and neural crest-like subpopulations display a strong enrichment for the NIK/NF- κ B signaling pathway (Tsoi *et al*, 2018). Precisely how DDR interact with the NIK/IKK α /NF- κ B2 pathway remains to be determined. The adaptive response of melanoma cells to BRAF inhibition implicates force-induced actomyosin cytoskeletal remodeling (Kim *et al*, 2016; Girard *et al*, 2020; Orgaz *et al*, 2020). In addition, DDR1 clustering and collagen mechanical reorganization have been shown to involve interactions with myosin IIA, a key component of the actomyosin network (Coelho *et al*, 2017). In cancer cells, the classical NF- κ B pathway is activated by mechanical cues and RhoA-ROCK-myosin II signaling (Sero *et al*, 2015). We can therefore speculate that BRAFi/MEKi-driven cytoskeletal reorganization and DDR linear clustering along with collagen fibrils regulate the NIK/IKK α /NF- κ B2 pathway by increasing actomyosin tension. Another possibility is the recruitment of NIK/IKK α to the DDR signaling platforms, leading to their enzymatic activation, p52/RelB regulation, and MMDR.

Our recent report revealed that increased collagen deposition and tumor stiffening is an early response to BRAF inhibition to create a drug-protective niche (Girard *et al*, 2020). In this study, DDR inhibition by the clinically approved TKI imatinib improved the action of BRAFi on melanoma treatment by delaying tumor relapse, normalizing the collagen network, and increasing mouse survival. Thus, this combination strategy could be effective in a clinical application as it allows the suppression of the stromal fibrotic-like reaction induced by oncogenic BRAF pathway inhibition and prevents tumor relapse. Our findings support a model in which BRAF-targeted drugs fuel a self-feeding mechanism involving collagen-bound DDR signaling platforms, responsible for collagen network remodeling and drug tolerance. Another issue highlighted by our *in vivo* drug response melanoma model is the possible implication of stromal DDR in the therapeutic response. Consistent with this, a major role of CAF-derived DDR2 in collagen fiber organization and breast cancer metastasis has been reported (Corsa *et al*, 2016). DDR signaling might therefore influence both cancer and stromal cells during tumor adaptation to BRAF inhibition.

Our work adds to the emerging notion that DDR are becoming attractive targets in anti-cancer therapies. Inhibiting DDR1 or DDR2 with nilotinib (Jeitany *et al*, 2018), dasatinib (Hammerman *et al*, 2011; von Massenhausen *et al*, 2016), or other non-approved inhibitors (Ambrogio *et al*, 2016; Grither & Longmore, 2018) was shown to decrease tumorigenicity, invasion, or metastasis of several carcinomas (Corsa *et al*, 2016). Importantly, a recent study in melanoma reported that targeting DDR2 with dasatinib enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy (Tu *et al*, 2019). Together,

this study and our work point to the critical role of collagen receptors DDR in regulating the immune and mesenchymal stroma and the response to current therapies in melanoma.

In summary, our findings reveal that interaction of matrix collagen fibers with DDR favors the emergence of drug-tolerant melanoma cells, during the initial phase of adaptation to MAPK-targeting therapies. We also provide evidence that targeting MMDR with clinically approved DDR inhibitors may represent an attractive salvage strategy to overcome resistance to oncogenic BRAF inhibition. This combinatorial approach may thus be beneficial for melanoma patients treated with targeted therapies.

Materials and Methods

Melanoma cells, reagents, and antibodies

Melanoma cell lines were obtained as previously described (Tichet *et al*, 2015; Didier *et al*, 2018; Rathore *et al*, 2019). Isogenic pairs of vemurafenib-sensitive (P) and vemurafenib-resistant (R) cells (M229, M238, M249) were provided by R.S. Lo (Nazarian *et al*, 2010). The isogenic pair of vemurafenib-sensitive (UACC62P) and vemurafenib-resistant (UACC62R) cells was provided by R. Neubig (Misek *et al*, 2020). Short-term cultures of patient melanoma cells were kindly provided by J.C. Marine and are described elsewhere (Verfaillie *et al*, 2015; Wouters *et al*, 2020). Melanoma cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS) (HyClone) and 1% penicillin/streptomycin solution. Cell lines were used for experiments within 6 months of thawing. To guarantee cell line authenticity, cells were expanded and frozen at the lowest possible passages and used for a limited number of passages after thawing. Cells were routinely tested for the expression of melanocyte lineage proteins such as MITF. All cell lines were routinely tested for the absence of mycoplasma using PCR. For live imaging and red nuclear labeling, 1205Lu cells were transduced with NuLight Red Lentivirus Reagent (Essen Bioscience) and selected with puromycin (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich).

Culture reagents were purchased from Thermo Fisher Scientific. BRAFi (PLX4032, vemurafenib), MEKi (GSK1120212, trametinib, and GDC-0973/RG7420, cobimetinib), dual BRAFi/MEKi (RO5126766), DDR1-IN-1, nilotinib, and IKK inhibitor, BMS-345541, were obtained from Selleckchem. Imatinib mesylate was purchased from Enzo Life Sciences. The NIK inhibitor was described before (Mondragon *et al*, 2019). FAK inhibitor PF573228 was from Tocris Bioscience. An equal amount of DMSO was used as the vehicle control. Tissue culture grade collagen I (#A1064401) used for coating wells and plates was obtained from Thermo Fisher Scientific. Collagen I (#354249) used for 3D applications was obtained from Corning. Matrigel (#E1270) and all other reagents were obtained from Sigma-Aldrich unless otherwise stated. β 1 integrin blocking antibody (clone AIIB2) and the control isotype were purchased from Merck Millipore. Information on antibodies used in this study is provided in Appendix Table S1.

Isolation and culture of primary fibroblasts and MAFs

Human dermal fibroblasts were isolated and maintained as previously described (Robert *et al*, 2006). Human lymphatic fibroblasts

(FRC#2 and FRC#5) were purchased from ScienCell Research Laboratories. Metastatic melanoma clinical specimens were obtained with written informed consent from each patient, and studies were approved by the hospital ethics committee (Nice Hospital Center and University Côte d'Azur). The experiments conformed to the principles set out in the WMA Declaration of Helsinki and the Department of Health and Human Services Belmont Report. Briefly, the tissue sample was cut into small pieces and digested using collagenase/dispase. Following filtration of the large debris, the solution was serially centrifuged and the final pellet was resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS and seeded in a tissue culture dish. After 30 min, the fibroblasts adhered to the dish, while other cellular types remained in suspension. Verification of MAF was determined by flow cytometry using CAF markers such as $\beta 1$ integrin, PDGFR β , FAP α , and α SMA.

Fibroblasts were cultured in fibroblast medium (ScienCell) supplemented with 10% FBS, 1% fibroblast growth supplement (FGS), and 1% penicillin/streptomycin solution. All experiments were performed with fibroblasts until passage 10.

Fibroblast-derived 3D ECM and MMDR assay

3D de-cellularized ECMs were generated as previously described (Beacham *et al.*, 2007). Briefly, fibroblasts were seeded in gelatin-coated tissue culture dishes, cultured for 8 days in a complete medium, and treated with 50 μ g/ml ascorbic acid every 48 h. Cells were then washed with PBS, and ECMs were de-cellularized using a prewarmed extraction buffer for 2 min (PBS 0.5% Triton X-100, 20 mM NH₄OH). Matrices were then gently washed several times with PBS.

For MMDR assays, melanoma cells were seeded on top of the de-cellularized 3D ECMs for 48 h at 37°C in 5% CO₂, and cultured in a complete medium for a further 96 h in the presence of the various inhibitors, as indicated in the figure legends. Cells were detached and fixed in 70% ethanol or lysed in lysis buffer for cell cycle and immunoblot analysis, respectively.

Matrix-remodeling assay

5×10^4 fibroblasts were embedded in 100 μ l of collagen I/Matrigel mix (final concentration of collagen I: 4 mg/ml and Matrigel: 2 mg/ml), seeded in a glass-bottom 96-well plate (MatTek), and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS for 6 days. The gel area was measured using ImageJ software, and the gel contraction was calculated using the formula $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter}) / \text{well diameter}$ as previously described (Albregues *et al.*, 2014).

RNAi studies

Non-targeting control, DDR1#1 (VHS50139), DDR1#2 (HSS187878), DDR2#1 (HSS107350), and DDR2#2 (HSS107352), and FAK (PTK2) siRNA duplexes were purchased from Thermo Fisher Scientific. Transfection of siRNA was carried out using Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), at a final concentration of 50 nM. Unless stated otherwise, cells were assayed at 2 or 4 days post-transfection.

Immunoblot and immunoprecipitation

Whole-cell lysates were prepared using lysis buffer containing 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10%

glycerol, and 1% Triton X-100 supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Pierce) and briefly sonicated. Proteins were separated using SDS-PAGE and were transferred onto PVDF membranes (GE Healthcare Life Sciences) for immunoblot analysis. Membranes were incubated with the primary antibody overnight, washed, and then incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody. Antibodies and working dilution used are listed in Appendix Table S1. Blots were developed with a chemiluminescence system (GE Healthcare Life Sciences).

For immunoprecipitation (IP) assays, cells treated with 10 μ g/ml of collagen I for 18 h with the indicated inhibitors were lysed as described above, then incubated overnight at 4°C with rocking in lysis buffer containing Protein G Sepharose beads (Merck) and an antibody directed against DDR2. Beads were then washed 3 times with 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% glycerol, and 0.1% Triton X-100 supplemented with protease and phosphatase inhibitors. IP products were separated using SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis.

Proliferation assay

Real-time analysis of cell growth was carried out using the IncuCyte™ ZOOM imaging system (Essen Bioscience). 1205Lu melanoma cells stably expressing the nuclear fluorescent label red NuLight reagent were seeded in triplicate in a complete medium (15×10^3 cells/well in 12-well plates) on fibroblast-derived 3D ECM, in collagen I-coated wells, or in uncoated plastic wells and treated with the indicated drugs. Phase-contrast and red immunofluorescent images were taken every 6 h over a 5-day period (4 images per well at $\times 4$ magnification). Cell proliferation was quantified by counting the number of fluorescent nuclei over time, which was calculated as the cell growth rate. Growth curves were generated using the GraphPad Prism 8 software. Alternatively, cell proliferation was analyzed by counting cells with Hoechst-stained nuclei.

Flow cytometry

Cell cycle profiles were determined using flow cytometry analysis of propidium iodide (PI)-stained cells as previously described (Didier *et al.*, 2018). Melanoma cells were cultured on top of fibroblast-derived ECMs, collagen I-coated wells, or uncoated plastic wells and were treated with the indicated drugs for 96 h. Cells were then washed, fixed in 70% ethanol, and incubated at -20°C for 24 h. Finally, cells were stained for 20 min at 37°C in buffer containing 40 μ g/ml PI and 20 μ g/ml ribonuclease A. Cell cycle profiles were collected using the FACSCanto II (Becton Dickinson). Cell death was evaluated following staining with Annexin V/PI (eBioscience) and analyzed by flow cytometry as described (Didier *et al.*, 2018).

Immunofluorescence and microscopy

Cells were grown on type I collagen- (0.14 mg/ml) or fibroblast-derived ECM-coated glass coverslips. Following BRAFi or BRAFi+MEKi treatment, cells were rinsed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), and incubated for 1 h in PBS containing 10% normal goat serum (Cell Signaling), and then incubated overnight with the indicated primary antibodies that were diluted in PBS containing 2% normal goat serum. F-actin was stained with Alexa

Fluor 488 phalloidin (1:100; Thermo Fisher Scientific), and nuclei were stained with DAPI. Following incubation with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies, coverslips were mounted in ProLong antifade mounting reagent (Thermo Fisher Scientific). Images were captured using a wide-field microscope (Leica DM5500B, at $\times 63$ magnification). Cell area and globular versus linear clusters of cells ($n > 20$) were determined and quantified using ImageJ software. For quantification of globular versus linear clusters of phospho-DDR1/2, a “subtract background” function of ImageJ was applied to all images. In order to quantify clusters, the IsoData threshold was used. Clusters with circularity 0.3–1 were defined as “globular” and clusters with circularity 0 to 0.29 as “linear”. Following fixation and incubation with primary antibodies and Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies, de-cellularized matrices on coverslips were mounted in ProLong antifade reagent. Images were captured using a wide-field microscope (Leica DM5500B, at $\times 40$ magnification). The orientation of fibronectin and collagen fibers was assessed in the immunofluorescence images using ImageJ software. Data were plotted as frequency of distribution. For co-localization analyses of collagen 1 and phospho-DDR1/2, an anti-collagen type I mouse monoclonal antibody (Sigma, C2456) was used.

Cleaved caspase-3 and Ki67 stainings were assessed on 5- μ m frozen sections of cell-derived melanoma xenografts. Samples were fixed for 30 min with 4% PFA in PBS, rehydrated for 10 min in Tris 0.1 M, permeabilized in Tris 0.1 M + 1% Triton for 1 h, and then blocked for 1 h in Tris 0.1 M containing 1% BSA, 0.3% Triton, and anti-CD16/CD32 (FC Block, 1/100). Antibodies were diluted in Tris 0.1 M containing 1% BSA and 0.3% Triton and incubated overnight at 4°C. Following several washes with Tris 0.1 M, bound antibodies were detected using Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody. Images were captured using a wide-field microscope (Leica DM5500B, at $\times 40$ magnification).

Mass spectrometry analysis

Proteomic analysis of de-cellularized 3D ECMs was performed as described (Gopal *et al*, 2017). Briefly, ECM proteins were solubilized in urea, reduced, and alkylated, and proteins were digested with PNGase F (New England BioLabs), endoproteinase Lys-C (Promega), and high-sequencing-grade trypsin. Each sample was reconstituted in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 2% acetonitrile and analyzed using liquid chromatography (LC)–tandem mass spectrometry (MS/MS) in an LTQ Orbitrap Velos (Thermo Electron, Bremen, Germany) online with a nanoLC Ultimate 3000 chromatography system (Dionex). Protein identification and estimation of abundance were determined using raw LC Orbitrap MS data that were processed using the MASCOT search engine (version 2.4.1). Spectra were searched against a SwissProt Human database. The protein abundance was calculated using the iBAQ score and represented as molar percent.

Phospho-kinase profiling

Phospho-kinase screening was performed using a phospho-kinase array (Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array #ARY003B; R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. After cell extraction, 600 μ g of protein was added per sample. Array spots were analyzed using ImageJ software.

Atomic force microscopy

Elastic properties of fibroblast-derived 3D ECMs were analyzed by AFM using a BioScope Catalyst operating in Point and Shoot (Bruker Nano Surfaces), coupled with an inverted optical microscope (Leica DMI6000B, Leica Microsystems Ltd.). The apparent Young's modulus (Eapp) was measured on unfixed ECM using a silicon nitride tip (40 nm of diameter) mounted on a cantilever with a nominal spring constant of 0.03 N/m (MLCT-D, Bruker). The force–distance curves were collected using a velocity of 4.5 μ m/s, in relative trigger mode, and by setting the trigger threshold to 1 nN. Each point represents a specific Young's modulus obtained by fitting the corresponding individual force curve acquired on a determined point of the sample. Eapp values were represented as scatter dot plot using GraphPad Prism software.

Cell line-derived xenograft (CDX) tumor models

Mouse experiments were carried out in accordance with the Institutional Animal Care and the local ethics committee (CIEPAL-Azur agreement NCE/2018-483). 6-week-old female athymic nude nu/nu mice were purchased from Janvier Labs (France) and maintained under specific pathogen-free conditions in our accredited animal housing facility. 1×10^6 1205Lu melanoma cells were subcutaneously implanted into both flanks. The tumor was measured with a caliper, and the volume was calculated using the formula: $V = \text{width} \times \text{length}^2 \times 0.5$. When the tumor reached 75 mm³, mice were randomly grouped into control and test groups. Vemurafenib (35 mg/kg) and imatinib mesylate (75 mg/kg) were delivered (alone or in combination) intraperitoneally three times per week. Mice in the control group were treated with vehicle alone. Mice were treated for 30 days and followed for up to 50 days or until tumors reached a predefined volume (1,000 mm³). Once the animals were sacrificed, tumors were dissected, weighed, and snap-frozen in liquid nitrogen in an optimal cutting temperature compound (OCT; Tissue-Tek) (Gentaur). The sections were processed as described above and analyzed using immunofluorescent microscopy or formalin-fixed and paraffin-embedded for picrosirius red staining or SHG analysis.

Fibrillar collagen imaging

Collagen in de-cellularized 3D ECMs or in paraffin-embedded melanoma tissues was stained with picrosirius red using standard protocols. Tumor sections were analyzed using polarized light microscopy as previously described (Rich & Whittaker, 2005). Images were acquired under polarized illumination using a light transmission microscope (Zeiss PALM, at $5\times$ magnification). Fiber thickness was analyzed according to the change in polarization color. Birefringence hue and amount were quantified as a percent of total tissue area using ImageJ software. SHG imaging of paraffin-embedded melanoma tissues was recorded on a Zeiss 510 NLO microscope (Carl Zeiss Microscopy) with the Mai Tai HP DeepSee (Newport Corporation) and 360- to 440-nm band-pass filter.

Tissue microarray analysis

Immunohistochemistry analysis of DDR1 and DDR2 expression was assessed on TMA sections (US Biomax, #ME1004h) using

The paper explained

Problem

Despite novel targeted therapies for BRAF mutant advanced melanoma, therapy-driven resistance remains a major hurdle that limits patient benefit. Emerging evidence supports that tumor microenvironment components such as the surrounding extracellular matrix play a key role in creating resistant niches by allowing melanoma cells to rapidly adapt and tolerate anti-cancer drugs. However, how the extracellular matrix contributes to drug resistance remains poorly understood. Thus, a better understanding of the complexities of this tumor–host interaction may offer new therapeutic strategies to obviate melanoma resistance to treatment targeting the BRAF oncogenic pathway.

Results

To model the contribution of the extracellular matrix in melanoma cell response to BRAF-targeted therapy, we generated cell-derived 3D matrices from fibroblasts isolated from patient-derived biopsies and analyzed their effectiveness to protect melanoma cells against the anti-proliferative effect of oncogenic BRAF inhibition. We demonstrate that melanoma cells cultured on matrices adapt to BRAF/MEK inhibition by turning on a drug-tolerant pathway that is initiated by the tyrosine kinase receptors for collagens DDR1 and DDR2. Clustered DDR activate a non-canonical NF- κ B2 (p52/RelB)-resistant pathway that is therapeutically targetable with clinically approved compounds such as imatinib or with a preclinically tested inhibitor of the NIK/NF- κ B2 pathway. In melanoma cell-derived xenografts, targeting DDR by imatinib enhances BRAF inhibitor efficacy, counteracts therapy-induced fibrillar collagen remodeling, and delays tumor relapse.

Impact

This study outlines the critical interaction between melanoma cells and the extracellular matrix in mediating tolerance to BRAF/MEK inhibitor therapy and reveals that targeting DDR signaling may represent an attractive salvage strategy to overcome collagen-mediated drug resistance. It provides a rationale for designing clinical trials with clinically approved drugs such as imatinib in BRAF mutant melanoma patients treated with targeted therapies.

VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories) with the DAB reagent (Vector Laboratories) and counterstained with hematoxylin (Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Images were captured using a bright-field microscope (Nikon, at 20 \times magnification). Histological scoring of the samples was performed in a blinded fashion.

Analysis of gene expression from public databases

Publicly available gene expression datasets of human melanoma cell lines were used to analyze *DDR1*, *DDR2*, *MITF*, *AXL*, and *SOX10* levels according to the differentiation status. Cell states were classified into four differentiation states (undifferentiated, neural crest-like, transitory, and melanocytic) as previously described (Tsoi *et al*, 2018) and using GSE80829 and <https://systems.crump.ucla.edu/dediff/>. *DDR1*, *DDR2*, *MITF*, and *AXL* expression was analyzed in human melanoma samples within the Mannheim (GSE4843), Philadelphia (GSE4841), and Zurich (GSE4840) cohorts (Widmer *et al*, 2012). Proliferative (*MITF*^{high} *AXL*^{low}) and invasive (*MITF*^{low} *AXL*^{high}) melanoma subgroups were defined as previously described (Widmer *et al*, 2012; Rathore *et al*, 2019). Genomic alterations in *DDR1* and *DDR2* from the skin melanoma TCGA database were retrieved using cBioPortal

(<http://www.cbioportal.org/>). Correlation between *DDR1* genomic alterations and expression and the activity ($-\log_{10}[\text{IC}_{50} \text{ M}]$) of BRAFi (dabrafenib, vemurafenib) and MEKi (trametinib) were performed across the GDSC (Genomic of Drug Sensitivity in Cancer) melanoma cell line pharmacogenomic data using CellMinerCDB (<https://discover.nci.nih.gov/cellminerfdb>; Luna *et al*, 2021).

Statistical analysis

Unless otherwise stated, all experiments were repeated at least three times and representative data/images are shown. Statistical data analysis was performed using GraphPad Prism 8 software. The unpaired two-tailed Mann–Whitney test was used for statistical comparisons between two groups. The Kruskal–Wallis test with the indicated post-tests or two-way ANOVA test with Sidak's, Dunnett's, or Tukey's post-tests was used to compare three or more groups. A chi-square test was performed for statistical analysis of tissue microarray stainings. A log-rank (Mantel–Cox) test was applied to the Kaplan–Meier survival curves. Data represent biological replicates (n) and are depicted as mean values \pm SEM as indicated in the figure legends.

Data availability

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (<http://www.proteomexchange.org>) via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD026645 (<http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD026645>).

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgments

We thank Roger Lo for the M229P/R, M238P/R, and M249P/R melanoma cells, Chris Marine and Ghanem Ghanem for the short-term cultured melanoma cells and Richard Neubig for the UACC62 parental and resistant melanoma cells. We acknowledge Maeva Gesson and Marie Irondele from the C3M imaging facility for their helpful advice. We thank the C3M animal facility and Cédric Matthews for the SHG microscopy analysis (IBDM imaging platform, AMU-Marseille). We also thank Ana Popovic for critical reading of the manuscript. This work was supported by funds from the: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Ligue Contre le Cancer, Institut National du Cancer (INCA_12673), ITMO Cancer Aviesan (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Science and Health) within the framework of the Cancer Plan, and the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01. We also thank the PiCSL-FBI platform (IBDM, AMU-Marseille), a member of France BioImaging, supported by the "Investments for the Future" (ANR-10-INBS-04). The financial contribution of the Conseil général 06, Canceropôle Provence Alpes Côte d'Azur, and Région Provence Alpes Côte d'Azur to the C3M is also acknowledged. I.B. was a recipient of a doctoral fellowship from Ligue Contre le Cancer.

Author contributions

ST-D and MD designed the study, analyzed and interpreted data, ensured financial support, and wrote the paper with inputs from IB, AP, VP, and CAG. IB performed the majority of the experiments and analyzed the data with the help of ML, AC, AM, SD, MO, CR, VP, AP, and CAG. FL performed the flow

cytometry analyses. SP performed the AFM analyses. SA performed the mass spectrometry analyses. CG and TP contributed to reagents and expertise.

Conflict of interest

T.P. is the co-founder of Yukin Therapeutics. The remaining authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Agarwal G, Mihai C, Iscru DF (2007) Interaction of discoidin domain receptor 1 with collagen type 1. *J Mol Biol* 367: 443–455
- Albregues J, Bourget I, Pons C, Butet V, Hofman P, Tartare-Deckert S, Feral CC, Meneguzzi G, Gaggioli C (2014) LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep* 7: 1664–1678
- Ambrogio C, Gómez-López G, Falcone M, Vidal A, Nadal E, Crosetto N, Blasco RB, Fernández-Marcos PJ, Sánchez-Céspedes M, Ren X et al (2016) Combined inhibition of DDR1 and Notch signaling is a therapeutic strategy for KRAS-driven lung adenocarcinoma. *Nat Med* 22: 270–277
- Badiola I, Villace P, Basaldua I, Olosa E (2011) Downregulation of discoidin domain receptor 2 in A375 human melanoma cells reduces its experimental liver metastasis ability. *Oncol Rep* 26: 971–978
- Beacham DA, Amatangelo MD, Cukierman E (2007) Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 10: Unit 10 19
- Cario M (2018) DDR1 and DDR2 in skin. *Cell Adh Migr* 12: 386–393
- Coelho NM, Arora PD, van Putten S, Boo S, Petrovic P, Lin AX, Hinz B, McCulloch CA (2017) Discoidin domain receptor 1 mediates myosin-dependent collagen contraction. *Cell Rep* 18: 1774–1790
- Corcoran DS, Juskaite V, Xu Y, Yorlitz F, Alexandrov Y, Dunsby C, French PMW, Leitinger B (2019) DDR1 autophosphorylation is a result of aggregation into dense clusters. *Sci Rep* 9: 17104
- Corsa C, Brenot A, Grither W, Van Hove S, Loza A, Zhang K, Ponik S, Liu Y, DeNardo D, Eliceiri K et al (2016) The action of discoidin domain receptor 2 in basal tumor cells and stromal cancer-associated fibroblasts is critical for breast cancer metastasis. *Cell Rep* 15: 2510–2523
- Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294: 1708–1712
- Day E, Waters B, Spiegel K, Alnadaf T, Manley PW, Buchdunger E, Walker C, Jarai G (2008) Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur J Pharmacol* 599: 44–53
- De Donatis GM, Pape EL, Pierron A, Cheli Y, Hofman V, Hofman P, Allegra M, Zahaf K, Bahadoran P, Rocchi S et al (2016) NF- κ B2 induces senescence bypass in melanoma via a direct transcriptional activation of EZH2. *Oncogene* 35: 2735–2745
- Didier R, Mallavialle A, Ben Jouira R, Domdom MA, Tichet M, Auberger P, Luciano F, Ohanna M, Tartare-Deckert S, Deckert M (2018) Targeting the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14 impairs melanoma cell survival and overcomes resistance to MAPK-targeting therapies. *Mol Cancer Ther* 17: 1416–1429
- Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M (2001) Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344: 1038–1042
- Fedorenko IV, Wargo JA, Flaherty KT, Messina JL, Smalley KSM (2015) BRAF inhibition generates a host-tumor niche that mediates therapeutic escape. *J Invest Dermatol* 135: 3115–3124
- Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE (2012) From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 12: 349–361
- Fletcher AL, Acton SE, Knoblich K (2015) Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 15: 350–361
- Girard CA, Lecacheur M, Ben Jouira R, Berestjuk I, Diazi S, Prod'homme V, Mallavialle A, Larbret F, Gesson M, Schaub S et al (2020) A feed-forward mechanosignaling loop confers resistance to therapies targeting the MAPK pathway in BRAF-mutant melanoma. *Cancer Res* 80: 1927–1941
- Gopal S, Veracini L, Grall D, Butori C, Schaub S, Audebert S, Camoin L, Baudelet E, Radwanska A, Beghelli-de la Forest Divonne S et al (2017) Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nat Commun* 8: 14105
- Grither WR, Longmore GD (2018) Inhibition of tumor-microenvironment interaction and tumor invasion by small-molecule allosteric inhibitor of DDR2 extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: E7786–E7794
- Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, Xu C, Dutt A, Zhou W, Brace LE, Woods BA, Lin W, Zhang J et al (2011) Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov* 1: 78–89
- Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, Larkin J, Marais R, Sahai E (2015) Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer Cell* 27: 574–588
- Hynes RO, Naba A (2012) Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a004903
- Jeitany M, Leroy C, Tosti P, Lafitte M, Le Guet J, Simon V, Bonenfant D, Robert B, Grillet F, Mollevi C et al (2018) Inhibition of DDR1-BCR signalling by nilotinib as a new therapeutic strategy for metastatic colorectal cancer. *EMBO Mol Med* 10: e7918
- Jenkins MH, Croteau W, Mullins DW, Brinckerhoff CE (2015) The BRAF(V600E) inhibitor, PLX4032, increases type I collagen synthesis in melanoma cells. *Matrix Biol* 48: 66–77
- Kalluri R (2016) The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 16: 582–598
- Kaukonen R, Jacquemet G, Hamidi H, Ivaska J (2017) Cell-derived matrices for studying cell proliferation and directional migration in a complex 3D microenvironment. *Nat Protoc* 12: 2376–2390
- Kaukonen R, Mai A, Georgiadou M, Saari M, De Franceschi N, Betz T, Sihto H, Ventelä S, Elo L, Jokitalo E et al (2016) Normal stroma suppresses cancer cell proliferation via mechanosensitive regulation of JMJD1a-mediated transcription. *Nat Commun* 7: 12237
- Kaur A, Webster MR, Marchbank K, Behera R, Ndoye A, Kugel CH, Dang VM, Appleton J, O'Connell MP, Cheng P et al (2016) sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. *Nature* 532: 250–254
- Kim H-G, Tan LI, Weisberg EL, Liu F, Canning P, Choi HG, Ezell SA, Wu H, Zhao Z, Wang J et al (2013) Discovery of a potent and selective DDR1 receptor tyrosine kinase inhibitor. *ACS Chem Biol* 8: 2145–2150
- Kim MH, Kim J, Hong H, Lee SH, Lee JK, Jung E, Kim J (2016) Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. *EMBO J* 35: 462–478
- Landowski TH, Olashaw NE, Agrawal D, Dalton WS (2003) Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF- κ B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene* 22: 2417–2421
- Leitinger B (2014) Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int Rev Cell Mol Biol* 310: 39–87
- Luna A, Elloumi F, Varma S, Wang Y, Rajapakse VN, Aladjem MI, Robert J, Sander C, Pommier Y, Reinhold WC (2021) Cell miner cross-database

- (CellMinerCDB) version 1.2: exploration of patient-derived cancer cell line pharmacogenomics. *Nucleic Acids Res* 49: D1083–D1093
- Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS (2009) Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 9: 665–674
- Misek SA, Appleton KM, Dexheimer TS, Lisabeth EM, Lo RS, Larsen SD, Gallo KA, Neubig RR (2020) Rho-mediated signaling promotes BRAF inhibitor resistance in de-differentiated melanoma cells. *Oncogene* 39: 1466–1483
- Miskolczi Z, Smith MP, Rowling EJ, Ferguson J, Barriuso J, Wellbrock C (2018) Collagen abundance controls melanoma phenotypes through lineage-specific microenvironment sensing. *Oncogene* 37: 3166–3182
- Mondragon L, Mhaidly R, De Donatis GM, Tosolini M, Dao P, Martin AR, Pons C, Chiche J, Jacquin M, Imbert V et al (2019) GAPDH overexpression in the T cell lineage promotes angioimmunoblastic T cell lymphoma through an NF-kappaB-dependent mechanism. *Cancer Cell* 36: 268–287
- Mouw JK, Ou G, Weaver VM (2014) Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 771–785
- Müller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, Kong X, Possik PA, Cornelissen-Steijger PDM, Foppen MHG et al (2014) Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 5: 5712
- Nadiminty N, Tummala R, Liu C, Yang J, Lou W, Evans CP, Gao AC (2013) NF-kappaB2/p52 induces resistance to enzalutamide in prostate cancer: role of androgen receptor and its variants. *Mol Cancer Ther* 12: 1629–1637
- Nazarian R, Shi H, Wang QI, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee M-K, Attar N, Sazegar H et al (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468: 973–977
- Orgaz JL, Crosas-Molist E, Sadok A, Perdrix-Rosell A, Maiques O, Rodriguez-Hernandez I, Monger JO, Mele S, Georgouli M, Bridgeman V et al (2020) Myosin II Reactivation and Cytoskeletal Remodeling as a Hallmark and a Vulnerability in Melanoma Therapy Resistance. *Cancer Cell* 37: 85–103
- Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 15: 1243–1253
- Poudel B, Lee YM, Kim DK (2015) DDR2 inhibition reduces migration and invasion of murine metastatic melanoma cells by suppressing MMP2/9 expression through ERK/NF-kappaB pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 47: 292–298
- Rambow F, Marine JC, Goding CR (2019) Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev* 33: 1295–1318
- Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Ben Jouira R, Garcia E, Larbret F, Gesson M, Audebert S, Lacour JP et al (2019) Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 38: 5873–5889
- Reger de Moura C, Battistella M, Sohail A, Caudron A, Feugeas JP, Podgorniak M-P, Pages C, Mazouz Dorval S, Marco O, Menashi S et al (2019) Discoidin domain receptors: a promising target in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 32: 697–707
- Rich L, Whittaker P (2005) Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci* 22: 97–104
- Robert C, Grob JJ, Stroykovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, Chiarion Sileni V, Schachter J, Garbe C, Bondarenko I et al (2019) Five-year outcomes with dabrafenib plus trametinib in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 381: 626–636
- Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E, Sabatié E, Cano A, Garcia de Herreros A, Ballotti R et al (2006) SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 66: 7516–7523
- Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresh DA (2015) Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol* 25: 234–240
- Sero JE, Sailem HZ, Ardy RC, Almuttaqi H, Zhang T, Bakal C (2015) Cell shape and the microenvironment regulate nuclear translocation of NF-kappaB in breast epithelial and tumor cells. *Mol Syst Biol* 11: 790
- Shain AH, Bastian BC (2016) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 16: 345–358
- Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G et al (1997) An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* 1: 25–34
- Smith MP, Brunton H, Rowling EJ, Ferguson J, Arozarena I, Miskolczi Z, Lee JL, Girotti MR, Marais R, Levesque MP et al (2016) Inhibiting drivers of non-mutational drug tolerance is a salvage strategy for targeted melanoma therapy. *Cancer Cell* 29: 270–284
- Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT et al (2012) Tumour microenvironment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487: 500–504
- Taniguchi K, Karin M (2018) NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol* 18: 309–324
- Tichet M, Prod'Homme V, Fenouille N, Ambrosetti D, Mallavialle A, Cerezo M, Ohanna M, Audebert S, Rocchi S, Giaccherio D et al (2015) Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat Commun* 6: 6993
- Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, Wong DJL, Atefi M, Shirazi R, Wang X et al (2018) Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* 33: 890–904
- Tu MM, Lee FYF, Jones RT, Kimball AK, Saravia E, Graziano RF, Coleman B, Menard K, Yan J, Michaud E et al (2019) Targeting DDR2 enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy. *Sci Adv* 5: eaav2437
- Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, Kleer CG, Fridman R (2012) Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 31: 295–321
- Verfaillie A, Imrichova H, Atak ZK, Dewaele M, Rambow F, Hulselmans G, Christiaens V, Svetlichnyy D, Luciani F, Van den Mooter L et al (2015) Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun* 6: 6683
- Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T (1997) The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1: 13–23
- von Mässenhausen A, Sanders C, Brägelmann J, Konantz M, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Duensing S, Schröck A, Bootz F et al (2016) Targeting DDR2 in head and neck squamous cell carcinoma with dasatinib. *Int J Cancer* 139: 2359–2369
- Widmer DS, Cheng PF, Eichhoff OM, Belloni BC, Zipser MC, Schlegel NC, Javelaud D, Mauviel A, Dummer R, Hoek KS (2012) Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res* 25: 343–353
- Wouters J, Kalender-Atak Z, Minnoye L, Spanier KI, De Waegeneer M, Bravo González-Blas C, Mauduit D, Davie K, Hulselmans G, Najem A et al (2020) Robust gene expression programs underlie recurrent cell

states and phenotype switching in melanoma. *Nat Cell Biol* 22: 986–998

Yeung DA, Shanker N, Sohail A, Weiss BA, Wang C, Wellmerling J, Das S, Ganju RK, Miller JLC, Herr AB *et al* (2019) Clustering, spatial distribution, and phosphorylation of discoidin domain receptors 1 and 2 in response to soluble collagen I. *J Mol Biol* 431: 368–390

Young HL, Rowling EJ, Bugatti M, Giurisato E, Luheshi N, Arozarena I, Acosta J-C, Kamarashev J, Frederick DT, Cooper ZA *et al* (2017) An adaptive

signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *J Exp Med* 214: 1691–1710



License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Annexe 2 : The profibrotic miR-143/145 cluster promotes mesenchymal phenotypic plasticity associated with resistance to targeted therapies in melanoma



Blockade of the pro-fibrotic reaction mediated by the miR-143/-145 cluster enhances the responses to targeted therapy in melanoma

Serena Diazzi^{1,2,3}, Alberto Baeri², Julien Fassy², Margaux Lecacheur^{1,3} , Oskar Marin-Bejar^{4,5}, Christophe A Girard^{1,3}, Lauren Lefevre^{1,3}, Caroline Lacoux², Marie Irondelle¹, Carine Mounier^{2,6}, Marin Truchi², Marie Couralet² , Mickael Ohanna^{1,3} , Alexandrine Carminati^{1,3}, Ilona Berestjuk^{1,3}, Frederic Larbret^{1,3}, David Gilot⁷ , Georges Vassaux² , Jean-Christophe Marine^{4,5}, Marcel Deckert^{1,3} , Bernard Mari^{2,8,*†} & Sophie Tartare-Deckert^{1,3,8,*†}

Abstract

Lineage dedifferentiation toward a mesenchymal-like state displaying myofibroblast and fibrotic features is a common mechanism of adaptive and acquired resistance to targeted therapy in melanoma. Here, we show that the anti-fibrotic drug nintedanib is active to normalize the fibrous ECM network, enhance the efficacy of MAPK-targeted therapy, and delay tumor relapse in a preclinical model of melanoma. Acquisition of this resistant phenotype and its reversion by nintedanib pointed to miR-143/-145 pro-fibrotic cluster as a driver of this mesenchymal-like phenotype. Upregulation of the miR-143/-145 cluster under BRAFi/MAPKi therapy was observed in melanoma cells *in vitro* and *in vivo* and was associated with an invasive/undifferentiated profile. The 2 mature miRNAs generated from this cluster, miR-143-3p and miR-145-5p, collaborated to mediate transition toward a drug-resistant undifferentiated mesenchymal-like state by targeting Fascin actin-bundling protein 1 (FSCN1), modulating the dynamic crosstalk between the actin cytoskeleton and the ECM through the regulation of focal adhesion dynamics and mechanotransduction pathways. Our study brings insights into a novel miRNA-mediated regulatory network that contributes to non-genetic adaptive drug resistance and provides proof of principle that preventing MAPKi-induced pro-fibrotic stromal response is a viable therapeutic opportunity for patients on targeted therapy.

Keywords fibrosis; MAPK inhibitors; melanoma; microRNA; nintedanib

Subject Categories Cancer; Skin

DOI 10.15252/emmm.202115295 | Received 16 October 2021 | Revised 4 January 2022 | Accepted 10 January 2022 | Published online 14 February 2022

EMBO Mol Med (2022) 14: e15295

See also: **B Sanchez-Laorden & MA Nieto** (March 2022)

Introduction

Because of its high mutational burden, metastasis propensity, and resistance to treatment, cutaneous melanoma is one of the most aggressive human cancers and the deadliest form of skin cancer (Shain & Bastian, 2016). Melanoma is a non-epithelial tumor that originates from neural crest-derived and pigment-producing melanocytes in the skin. Genetic alterations in the *BRAF*, *NRAS*, or *NFI* genes define melanoma subtypes and lead to the MAPK pathway hyperactivation (Flaherty *et al*, 2012; Cancer Genome Atlas, 2015). Current therapeutic options for BRAFV600E/K metastatic melanoma include MAPK-targeted therapies, which show remarkable efficacy during the first months of treatment (Chapman *et al*, 2011; Robert *et al*, 2019). However, the majority of patients treated with a combination of BRAF inhibitor (BRAFi) and MEK inhibitor (MEKi) inevitably relapse within months (Long *et al*, 2017). Genetic mechanisms of resistance cannot singly explain the acquisition of therapy resistance in melanoma, and non-genetic heterogeneity actively participates in drug tolerance (Rambow *et al*, 2019; Marine *et al*, 2020). Extensive studies have been carried out to dissect the non-mutational mechanisms of resistance (Rambow *et al*, 2018; Tsoi

1 Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France

2 Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), Sophia Antipolis, France

3 Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, Nice, France

4 Laboratory For Molecular Cancer Biology, VIB Center for Cancer Biology, VIB, Leuven, Belgium

5 Department of Oncology, KU Leuven, Leuven, Belgium

6 CYU Université, ERRMECe (EA1391), Neuville-sur-Oise, France

7 INSERM U1242, University of Rennes, Rennes, France

8 FHU-OncoAge, Nice, France

*Corresponding author. Tel: +33 493 957 719; E-mail: mari@unice.fr

**Corresponding author. Tel: +33 489 153 851; E-mail: tartare@unice.fr

†These authors contributed equally to this work

et al, 2018). Genetic and non-genetic mechanisms of resistance are frequently linked and not mutually exclusive (Marine et al, 2020). Non-genetic resistance is due to the intrinsic melanoma cell phenotypic plasticity, i.e., ability to undergo transcriptional and epigenetic reprogramming in response to environmental challenges or upon therapy (Arozarena & Wellbrock, 2019). These adaptive mechanisms exploit the developmental plasticity of melanoma cells and often result in an undifferentiated state characterized by upregulation of receptor tyrosine kinases (RTK) such as PDGFR β or AXL, downregulation of melanocyte differentiation transcription factors MITF and SOX10 (Sun et al, 2014), and acquisition of mesenchymal and invasive features (Nazarian et al, 2010; Villanueva et al, 2010; Girotti et al, 2013; Muller et al, 2014; Fallahi-Sichani et al, 2017; Rambow et al, 2018; Tsoi et al, 2018; Rathore et al, 2019).

Tumors are shaped dynamically by reciprocal crosstalk between cancer cells and the extracellular matrix (ECM) through cellular–ECM interactions and stromal matrix remodeling. Recent findings indicated that elevated ECM production and remodeling contribute to adaptive and acquired resistance to BRAFi therapy by conferring a drug-protective niche to melanoma cells (Fedorenko et al, 2016; Titz et al, 2016; Girard et al, 2020; Marusak et al, 2020). Moreover, we recently reported that undifferentiated mesenchymal-like BRAFi-resistant cells exhibit myofibroblast/cancer-associated fibroblast (CAF)-like features leading to pro-fibrotic ECM reprogramming *in vitro* and *in vivo* (Diazzi et al, 2020; Girard et al, 2020). Cell-autonomous ECM deposition and remodeling abilities adopted by melanoma cells after MAPKi treatment result in cross-linked collagen matrix and tumor stiffening fostering a feedforward loop dependent on the mechanotransducers YAP and MRTFA and leading to therapy resistance (Girard et al, 2020). Thus, this pro-fibrotic-like response, typical of the early adaptation and acquired resistance to MAPK inhibition, provides a therapeutic escape route through the activation of alternative survival pathways mediated by cell-matrix communications. However, the signaling networks underlying the acquisition of this undifferentiated, mesenchymal-like melanoma cell state and drug-resistant behavior remain unclear.

We reasoned that therapeutic approaches aimed at preventing this targeted therapy-induced abnormal pro-fibrotic reaction could represent rationale combination strategies to normalize the fibrous stroma and overcome non-genetic resistance in BRAFV600E-mutated melanomas. We show here that the anti-fibrotic drug nintedanib (BIBF1120, Ofev[®]) improves the response of the BRAFi/MEKi-targeted therapy in a preclinical model of melanoma and in BRAF-mutated cell lines by preventing MAPKi-induced lineage dedifferentiation, ECM reprogramming, and mesenchymal traits. We also identified the master regulator associated with the acquisition of this pro-fibrotic and dedifferentiation program, pointing the miR-143/-145 cluster as a driver of the phenotype switching to a drug-resistant mesenchymal-like cell state.

Results

Nintedanib/BIBF1120 prevents MAPKi-induced pro-fibrotic-like response, enhances targeted therapy efficiency, and delays tumor relapse

In order to limit ECM reprogramming and collagen remodeling associated with therapy resistance and relapse in melanoma, we tested the effect of the anti-fibrotic drug nintedanib (BIBF1120), a triple inhibitor of PDGFR, VEGFR, and FGFR used to treat idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in combination with BRAFi/MEKi in a syngeneic model of transplanted murine YUMM1.7 Braf-mutant melanoma (Meeth et al, 2016). YUMM1.7 cells were subcutaneously injected, and tumors were treated with vehicle, BIBF1120 alone, a combination of BRAFi plus MEKi, or the triple combination (Fig 1A). BIBF1120 did not display any anti-melanoma effect when administered alone, slightly slowing down tumor growth but not triggering tumor volume decrease. Administration of the BRAFi/MEKi initially reduced tumor growth, but after three weeks of treatment, tumor growth resumed and 100% of tumors relapsed. Importantly, combination of MAPK-targeted therapies and BIBF1120 significantly delayed relapse and led to complete remission in 33% of mice (2 out of 6; Figs 1B and C, and EV1A). Overall, the

Figure 1. Nintedanib/BIBF1120 prevents MAPKi-induced ECM remodeling, decreases resistance to targeted therapy, and delays tumor relapse.

A–G Mouse YUMM1.7 melanoma cells were subcutaneously inoculated into C57BL/6 mice, and when tumors reached 100 mm³, mice were treated with vehicle (Ctrl), nintedanib/BIBF1120 (BIBF), MAPKi (BRAFi, vemurafenib and MEKi, trametinib), or BRAFi/MEKi plus BIBF ($n = 6$). (B) Representative median graphics showing tumor growth following treatment ($n = 6$). Two-way ANOVA was used for statistical analysis. $**P \leq 0.01$. (C) Kaplan–Meier survival curves of mice treated with the indicated therapies ($n = 6$). The log rank (Mantel–Cox) statistical test was used for MAPKi vs MAPKi/BIBF1120. $****P \leq 0.0001$. (D) Mouse body weight was measured at the indicated times. Data shown are mean \pm SD ($n = 6$). (E, F) Tumor sections were stained with picrosirius red and imaged under polarized light. (E) Representative image of collagen fiber network in tumors from mice under the different treatments. Scale bar 200 μ m. (F) Quantification of collagen fiber thickness ($n = 6$ for control, BIBF, and BRAFi/MEKi groups and $n = 5$ for BRAFi/MEKi + BIBF group). Two-way ANOVA statistical test was used for statistical analysis of mature collagen fiber thickness quantification. $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, and $****P \leq 0.0001$. Significance was calculated against the control group. Statistical significance of BIBF vs BIBF + BRAFi/MEKi was also calculated. (G) Heatmap showing the differential expression of ECM and myofibroblast/CAF genes in mice treated with MAPK-targeted therapies with or without BIBF compared to control mice (\log_2 ratio, $n = 5$).

H–J Human M238R cells and/or parental M238P cells were analyzed for different parameters. (H) Heatmap and Western Blot showing the expression of ECM, myofibroblast/CAF and phenotype switch markers in M238R compared to M238P cells. Heatmap represents the mean of expression of 3 independent experiments by RT-qPCR. (I) Heatmap showing the expression of ECM, myofibroblast/CAF and phenotype switch markers in M238R treated with BIBF (2 μ M, 72 h) or vehicle alone by RT-qPCR ($n = 3$). (J) Crystal violet viability assay of M238R cells treated with BRAFi/MEKi (BRAFi, Vemurafenib and MEKi, Trametinib) (1 μ M), BIBF (2 μ M) or with BRAFi/MEKi (1 μ M) plus BIBF (2 μ M) for 72 h. Paired Student *t*-test was used for statistical analysis. $****P \leq 0.0001$. Significance was calculated against the control group. Statistical significance of BIBF vs BIBF + BRAFi/MEKi was also calculated. Data is represented as mean \pm SD from a triplicate representative of 3 independent experiments.

Source data are available online for this figure.

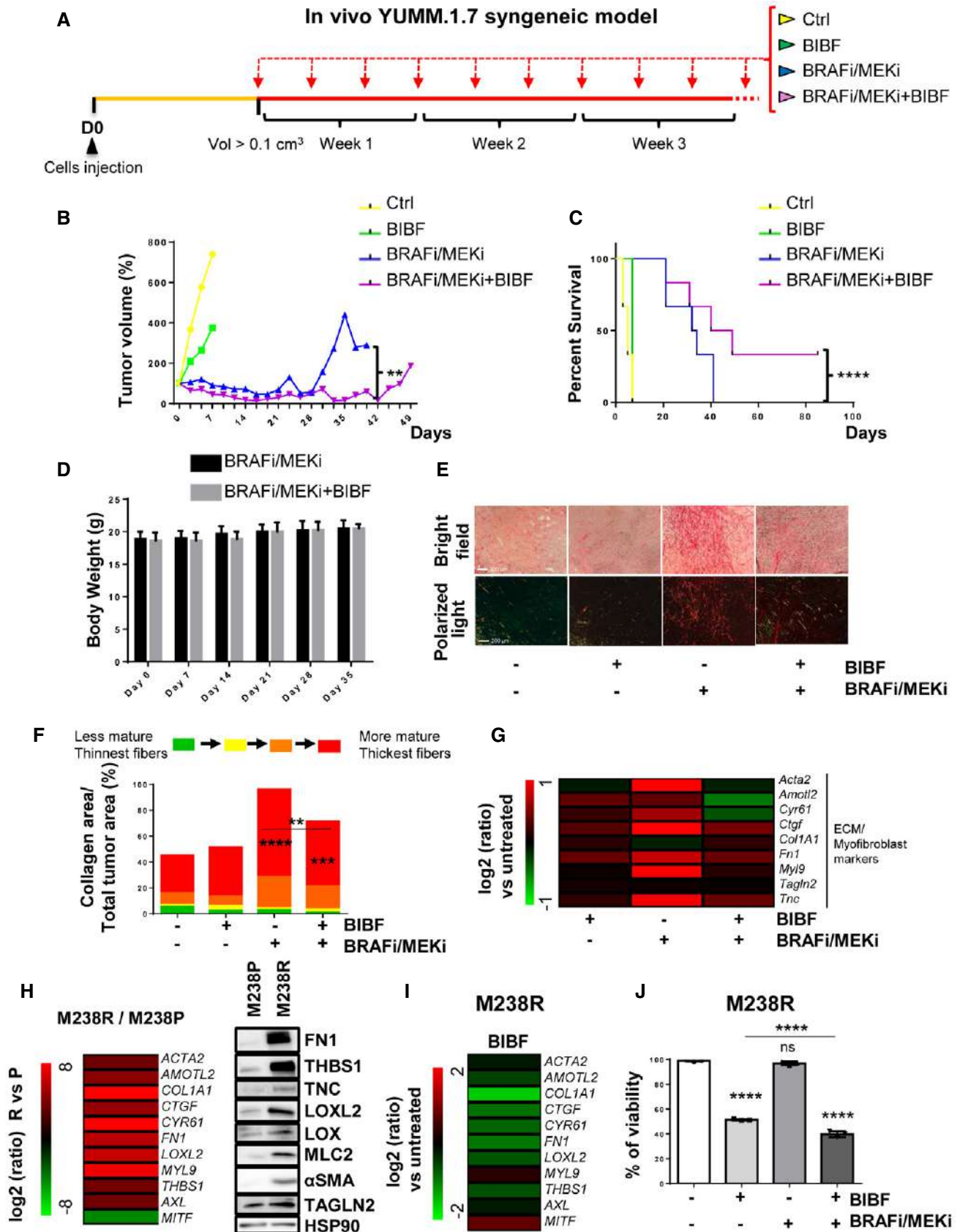


Figure 1.

combined treatment significantly improved mouse survival (Fig 1C) without body weight loss or sign of toxicity throughout the study (Fig 1D). As previously described in melanoma xenograft models (Girard *et al*, 2020), an extensive deposition of collagens and increased expression of ECM remodeling and myofibroblast markers were observed in YUMM1.7 tumors treated with the combination of BRAFi and MEKi as revealed by picrosirius red staining of collagen fibers and qPCR analysis of typical molecular markers of tumor fibrosis. This response was significantly reduced by the co-administration of BIBF1120 (Figs 1E–G and EV1B). Thus, combination of targeted therapy with the anti-fibrotic drug nintedanib prevents the appearance of a pro-fibrotic matrix observed upon MAPK-targeted therapy exposure and significantly delays the onset of resistance *in vivo*.

We next examined the impact of nintedanib on ECM reprogramming and cell phenotype switching in the context of early adaptation and resistance to MAPK-targeted therapy in human BRAFV600E-mutated melanoma M238P cells. BIBF1120 strongly attenuated targeted drug-induced ECM/myofibroblast-related signatures, prevented the undifferentiated AXL^{high}–MITF^{low} phenotype switch (Fig EV1C) and potentiated the effect of the BRAFi/MEKi cocktail on M238P cell viability (Fig EV1D). The efficacy of the described treatment to reduce upregulation of fibronectin (FN1) and LOXL2 expression was confirmed at protein levels by Western blot analysis (Fig EV1E). Of note, a strong activation of AKT induced by the BRAFi/MEKi cocktail was fully inhibited by BIBF1120, suggesting that the anti-fibrotic drug is able to counteract the rewiring of alternative survival pathway observed upon MAPK oncogenic pathway inhibition (Fig EV1E) (Nazarian *et al*, 2010).

We finally evaluated the effect of BIBF1120 on the undifferentiated mesenchymal-like resistant M238R cells obtained through chronic exposure of the M238P cells to the BRAFi vemurafenib (Nazarian *et al*, 2010) and that displayed cross-resistance to MEKi (Atefi *et al*, 2011). We recently reported that this RTK-driven resistant cell line exhibits low expression of the differentiation factor MITF and high AXL levels and displays a strong myofibroblast-like phenotype with expression of classical ECM and contractile markers such as smooth muscle actin- α (α SMA) and myosin light chain 2 (MLC2), as well as ECM remodeling activities compared with parental M238P cells (Fig 1H) (Girard *et al*, 2020). BIBF1120 was able to attenuate melanoma-undifferentiated state markers and expression of ECM and myofibroblast/CAF-related signature (Fig 1I), but also significantly decreased cell viability and resistance to BRAFi (Fig 1J). To address the specific contribution of PDGFR β inhibition in nintedanib/BIBF1120 effects, we compared the effect of the selective PDGFR inhibitor CP673451 with BIBF1120 in M238R-resistant cells. The two inhibitors showed similar efficiency in causing a strong decrease in phospho-PDGFR β and phospho-AKT levels (Fig EV1F). However, while selective inhibition of PDGFR attenuated the myofibroblast-like signature typical of resistant cells (Fig EV1G) and significantly decreased cell viability (Fig EV1H), CP673451 was found less efficient than BIBF1120 in inducing phenotypic switch toward a more differentiated cell state (Fig EV1G). Altogether, these findings indicate that an anti-fibrotic therapy is able to revert the undifferentiated mesenchymal resistant phenotype and potentiate targeted therapy in human melanoma cells.

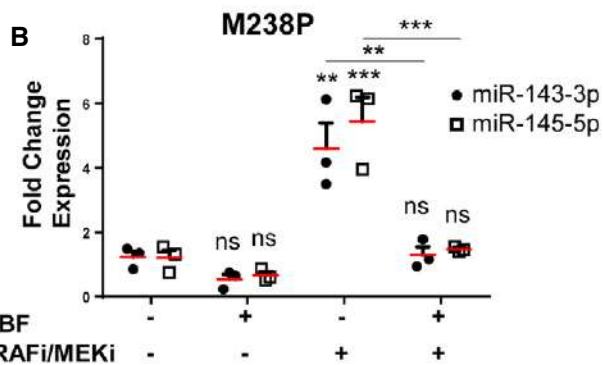
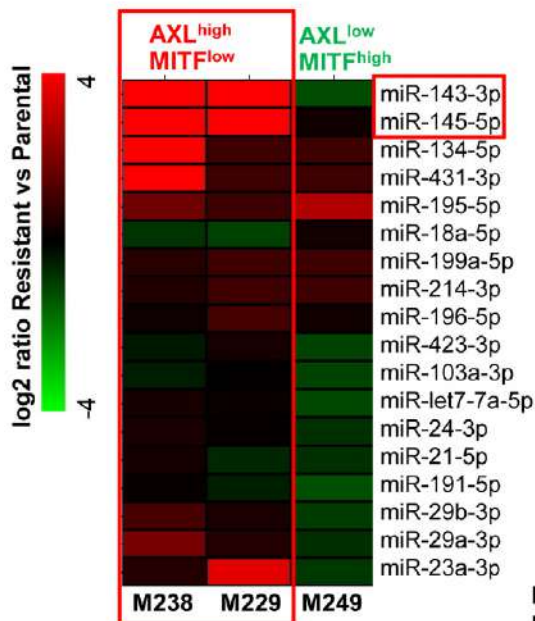
Suppression of MAPKi-induced resistant pro-fibrotic phenotype by nintedanib is associated with loss of miR-143/145 cluster expression

Next, we investigated the molecular mechanisms associated with the emergence of MAPKi-induced mesenchymal and pro-fibrotic phenotype and its inhibition by nintedanib/BIBF1120. Because several microRNAs (miRNAs), named FibromiRs, have been shown to play key roles in the initiation and progression of fibrotic processes in various organs (Ishida & Selaru, 2013; Pottier *et al*, 2014; Hanna *et al*, 2019; Savary *et al*, 2019), we performed an expression screening to compare the level of these FibromiRs in BRAFV600E mutant melanoma cells sensitive to MAPK-targeted therapies (M229P, M238P, M249P) compared to their corresponding resistant counterparts (Nazarian *et al*, 2010). The screening identified miR-143-3p and miR-145-5p, localized within the miR-143/145 cluster on chromosome 5 as the best hits with a strong upregulation in AXL^{high} MITF^{low} mesenchymal-like resistant M238R and M229R cells tested compared to parental cells (Figs 2A and EV2A). Similar results were obtained in the mesenchymal resistant UACC62R cells (Misek *et al*, 2020) (Fig EV2A). In contrast, acquisition of resistance through secondary NRAS mutation was not associated with increased expression of miR-143-3p and miR-145-5p in the non-mesenchymal AXL^{low}–MITF^{high} M249R cells (Figs 2A and EV2A). Upregulation of miR-143/145 cluster expression was also observed in BRAFi/MEKi double-resistant (DR) melanoma clones described in Shen *et al* (2019). Interestingly, expression levels of the two miRNAs were more pronounced in acquired DR melanoma cells displaying a mesenchymal-like cell state (Fig EV2B). We next examined whether a treatment with BRAFi, MEKi, or a combination of both was able to modulate the expression of the cluster. The two drugs, alone or in combination, significantly increased miR-143-3p and miR-145-5p expression levels in all BRAFV600E mutant melanoma cells tested including patient-derived short-term melanoma cultures (Fig EV2C–G). This strong induction was abolished when the BRAFi/MEKi treatment was combined with BIBF1120, both in melanoma cell lines cultured *in vitro* (Fig 2B) and in the YUMM.1.7 syngeneic model (Fig 2C) presented in Fig 1. Overall, the expression of the miR-143/-145 cluster paralleled the phenotypic switch associated with a mesenchymal resistant phenotype.

Given the critical role of RTK upregulation such as PDGFR β and of the pro-fibrotic TGF- β signaling pathway overactivation in mesenchymal resistance (Nazarian *et al*, 2010; Sun *et al*, 2014; Diazzi *et al*, 2020; Girard *et al*, 2020), we stimulated MAPKi-sensitive melanoma cells with PDGF-BB or with TGF- β and analyzed miR-143-3p and miR-145-5p expression. Both TGF- β and PDGF-BB triggered a strong upregulation of miR-143/-145 expression in M238P cells (Fig 2D). Conversely, treatment of mesenchymal BRAFi-resistant M238R cells with BIBF1120 but also with the TGF- β receptor inhibitor SB431542, the pan-AKT inhibitor GSK690693 or the PDGFR inhibitor CP673451 significantly decreased the expression of the two mature miRNAs (Figs 2E and EV2H), indicating that both PDGF and TGF- β pathways control the expression of the miR-143/-145 cluster in melanoma cells.

Finally, we investigated the expression of these miRNAs in several patient-derived xenograft (PDX) samples that acquired resistance to BRAFi/MEKi combotherapy and exhibited distinct phenotypic and molecular profiles (Fig 2F) (Marin-Bejar *et al*, 2021).

A Resistant vs Parental cell lines



In vivo YUMM.1.7 syngeneic model

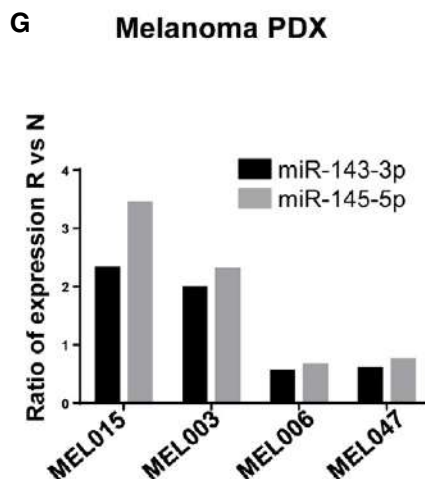
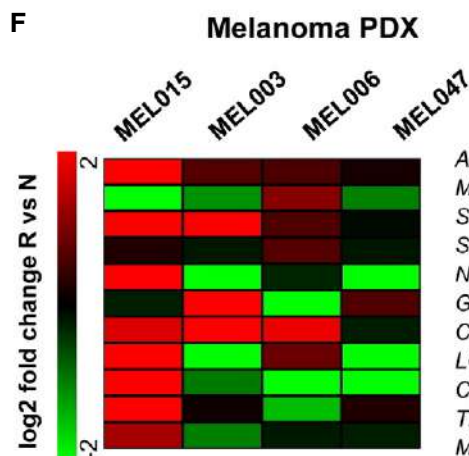
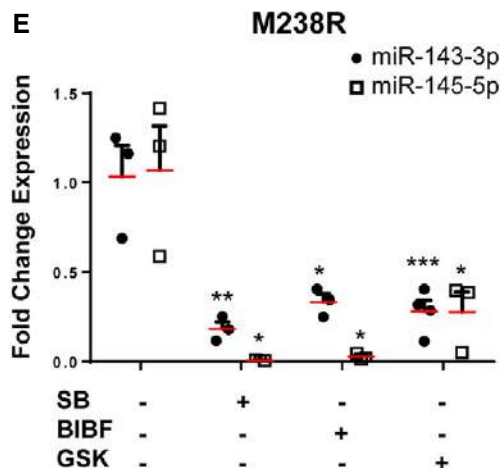
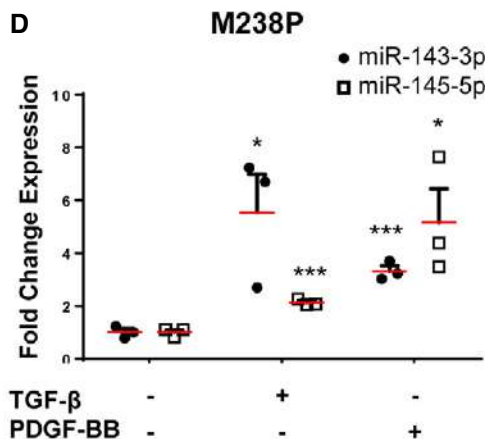
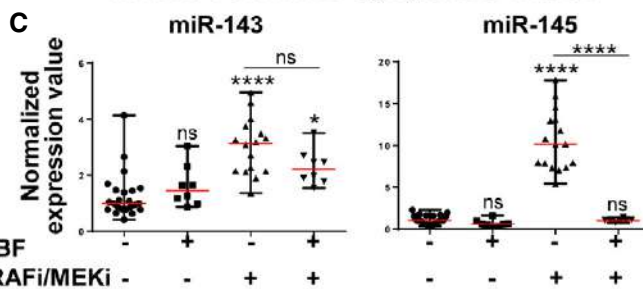


Figure 2.

Figure 2. Expression of miR-143/-145 is correlated with the undifferentiated mesenchymal-like MAPKi-resistant phenotype and is negatively regulated by nintedanib/BIBF1120.

- A Heatmap showing the differential expression of a selection of miRNAs known as “FibromiRs” in human BRAF^{V600E} mutant melanoma cells sensitive to MAPK-targeted therapies (M229, M238, M249) and the corresponding BRAFi-resistant cells. Expression of indicated FibromiRs was evaluated by RT-qPCR; log₂ (resistant vs parental). Expression level of AXL and MITF phenotypic markers for each resistant cell line is indicated.
- B Relative miRNA expression levels were quantified in M238P cells treated for 72 h with BIBF1120 (BIBF, 2 μM), MAPKi (BRAFi, vemurafenib and MEKi, trametinib; 1 μM), or with MAPKi (1 μM) plus BIBF (2 μM) by RT-qPCR and normalized to miR-16-5p. Data are represented as mean ± SEM from a triplicate representative of three independent experiments. One-way ANOVA was used for statistical analysis. ***P* ≤ 0.01 and *****P* ≤ 0.001. Significance was calculated against the control group. Statistical significance of BRAFi/MEKi vs BRAFi/MEKi + BIBF was also calculated.
- C Expression of miR-143-3p and miR-145-5p in control mice and mice treated with the indicated therapies (see legend of Fig 1 for details) was quantified by RT-qPCR. Data are represented as mean ± SEM from two independent experiments performed on six mice, with two sites of injections. One-way ANOVA was used for statistical analysis. **P* ≤ 0.05 and *****P* ≤ 0.0001. Significance was calculated against the control group. Statistical significance of BRAFi/MEKi vs BRAFi/MEKi + BIBF was also calculated.
- D Relative miRNA expression levels were quantified in M238P cells stimulated for 48 h with TGF-β (10 ng/ml) or PDGF-BB (20 ng/ml) by RT-qPCR and normalized to miR-16-5p. Data are represented as mean ± SEM from a triplicate representative of three independent experiments. *P*-values were calculated using paired Student's *t*-test. **P* ≤ 0.05 and *****P* ≤ 0.001.
- E Relative miRNA expression levels were quantified in M238R cells treated for 48 h with the triple kinase inhibitor nintedanib/BIBF1120 (BIBF, 2 μM), the TGF-β receptor kinase inhibitor SB431542 (SB, 10 μM), and the pan-AKT inhibitor GSK690693 (GSK, 10 μM) by RT-qPCR. Data are represented as mean ± SEM from a triplicate representative of three independent experiments. *P*-values were calculated using paired Student's *t*-test. **P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01, and *****P* ≤ 0.001.
- F, G Phenotype switch/invasive/ECM markers (F) and relative miRNAs expression levels (G) were quantified in therapy-naïve (N) and therapy-resistant (R) PDX samples. The log₂ fold change or the ratio of the fold change R vs N is shown for each couple of samples.

Source data are available online for this figure.

Upregulation of miR-143/-145 cluster between therapy naïve and resistant cells was observed in two different PDX samples, MEL015 and MEL003, with a predominant invasive/undifferentiated transcriptome profile (Fig 2F and G) (Marin-Bejar *et al*, 2021). The MEL015-resistant model also presented elevated expression of ECM remodeling, myofibroblast, and pro-fibrotic markers such as COL1A1, LOXL2, CYR61, THBS1, and MYL9. In contrast, we did not observe an upregulation of the cluster in drug-resistant lesions from the two additional PDX models, MEL006 and MEL047, in which the mesenchymal-like signature is not overrepresented (Fig 2F and G). These data indicate that upregulation of the pro-fibrotic miR-143/-145 cluster is also observed in PDX MAPKi-resistant melanomas associated with an invasive/undifferentiated transcriptome profile.

miR-143/-145 cluster promotes melanoma cell dedifferentiation toward a pro-fibrotic mesenchymal-like state and resistance to MAPK therapeutics

To confirm a potential link between the miR-143/-145 cluster and ECM reprogramming, we first used a gain-of-function approach consisting in the transient overexpression of miR-143-3p or miR-145-5p in various therapy-naïve melanoma cells (Appendix Fig S1A). The results showed increased expression of transcripts related to ECM structure and remodeling, as well as myofibroblast/CAF markers in cells overexpressing either miRNA compared to miR-neg control cells (Fig 3A). Conversely, we next tested whether miR-143-3p or miR-145-5p inhibition can reverse the phenotypic pro-fibrotic response induced by oncogenic BRAF inhibition in M238P melanoma cells. BRAFi treatment was combined with locked nucleic acid (LNA)-modified antisense oligonucleotides (ASOs) designed against miR-143 (LNA-143), miR-145 (LNA-145), or a control LNA ASO (LNA-Ctrl). RT-qPCR analysis showed that the BRAFi-induced ECM- and myofibroblast/CAF-related gene signature was significantly inhibited by LNA-143 and LNA-145 ASOs (Fig 3B). These results were confirmed at protein level by Western blot analysis of cell

lysates and conditioned media of ECM proteins and cross-linking enzymes, as well as myofibroblast/CAF markers using same gain- or loss-of-function approaches (Fig 3C–D and Appendix Fig S1B).

We next investigated whether the cluster contributed to the acquisition of the slow cycling, undifferentiated, and invasive cell state. Melanoma cells experienced reduced cell proliferation after ectopic expression of miR-143-3p or miR-145-5p as visualized by Western blot analysis of cell cycle markers (Appendix Fig S2A) and by analysis of cell confluence by live-cell imaging (Fig 3E and Appendix Fig S2B) with an accumulation of cells in the G0/G1 phase and a decreased percentage of cells in S phase (Appendix Fig S2C). Acquisition of the slow cycling cell state was not linked to cell death, as confirmed by annexin V/DAPI staining (Appendix Fig S2D). Inhibition of proliferation was also accompanied by enhancement of cell migratory abilities, as shown using Boyden chamber assays (Fig 3F and Appendix Fig S2E), as well as by the acquisition of a less differentiated phenotype, with decreased levels of MITF and SOX10, and increased levels of AXL, PDGFRβ, EGFR, NGFR, and SOX9 (Fig 3G and Appendix Fig S2F). Lentivirus-mediated stable overexpression of the two miRNAs in two distinct melanoma cell lines reproduced increased ECM protein production, inhibition of cell proliferation, and transition to an undifferentiated/invasive phenotype (Fig EV3A–E) observed upon transient transfection. Acquisition of this features was also linked to a decreased intrinsic sensitivity to BRAFi/MEKi treatment, as measured by crystal violet survival assays performed on melanoma cells stably overexpressing miR-143/-145 cluster compared to control cells (Fig EV3F). Conversely, targeting the two miRNAs by ASOs in combination with BRAFi improved the efficacy of the targeted drug (Fig 3H and Appendix Fig S3A and B), demonstrating that miR-143/-145 cluster upregulation in response to BRAFV600E pathway inhibition represents a pivotal adaptive resistance mechanism to MAPK therapeutics. Of note, inhibition of miR-145-5p alone and combined inhibition of the two miRNAs also significantly decreased the viability of BRAFi-resistant melanoma cells M238R (Appendix Fig S3C and D).

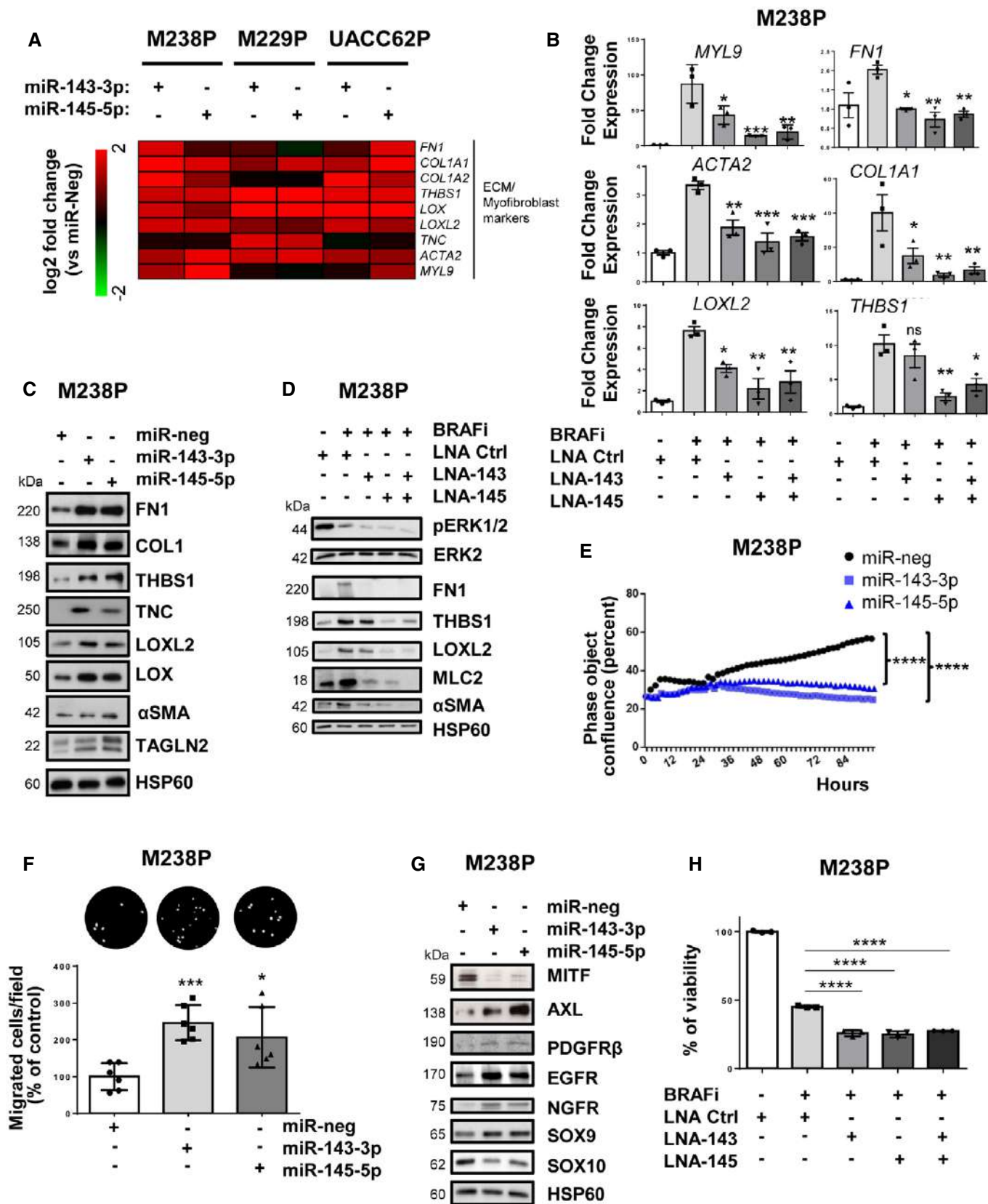


Figure 3.

Figure 3. miR-143/-145 cluster promotes ECM reprogramming, melanoma cell dedifferentiation, and drug resistance.

- A Heatmap showing the differential expression of a selection of ECM-related genes, cytoskeleton, and myofibroblast markers in three distinct cell lines (M238P, UACC62P, and M229P) transfected with the indicated mimics (control (miR-neg), miR-143 or miR-145 mimics, 72 h, 30 nM), assessed by RT-qPCR ($n = 3$).
- B M238P cells were treated 72 h with BRAFi (vemurafenib, 3 μ M) in the presence or the absence of LNA-based anti-miR-143 (LNA-143) or anti-miR-145 (LNA-145; 50 nM) or a combination of the two. ECM marker RT-qPCR data are represented as mean \pm SD from a triplicate representative of at least three independent experiments. One-way ANOVA was used for statistical analysis. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, and *** $P \leq 0.001$.
- C Western blot analysis of ECM remodeling markers on total cell lysates from M238P cells transfected as in (A).
- D Western blot analysis of ECM remodeling markers on total cell lysates from cells treated with or without BRAFi and the indicated combination of inhibitors as in (B).
- E Proliferation curves using time-lapse analysis of cells with the IncuCyte system. Graph shows quantification of cell confluence. Two-way ANOVA was used for statistical analysis. **** $P \leq 0.0001$.
- F Migration assay performed in Boyden chambers. Representative images showing migrating cells in the different conditions. The histogram represents the quantitative determination of mean \pm SD from six independent fields representative of three independent experiments, using ImageJ software. Paired Student's t -test was used for statistical analysis. * $P \leq 0.05$ and *** $P \leq 0.001$.
- G Western blot analysis of phenotype switch markers on lysates from M238P cells treated as in (A).
- H Crystal violet viability assay of M238P cells treated 72 h with the different combinations of inhibitors in the presence or not of BRAFi (vemurafenib, 3 μ M). Data are represented as mean \pm SD from a triplicate representative of at least three independent experiments. One-way ANOVA was used for statistical analysis. **** $P \leq 0.0001$.

Source data are available online for this figure.

Identification of miR-143-3p/miR-145-5p targets functionally associated with the undifferentiated mesenchymal-like phenotype in melanoma cells

To identify miR-143-3p and miR-145-5p targets associated with the resistant mesenchymal phenotype, we first combined *in silico* target prediction tools and experimental transcriptomic approaches using the miRonTop web tool (Le Brigand *et al.*, 2010) in M238R or M238P cells following transient transfection of mimics (Fig 4A and B) or stable lentivirus transduction. Functional annotation of the gene expression profiles associated with miRNA overexpression showed a strong overlap in pathways associated with cell migration and invasion, cell cycle, and cytoskeleton organization (Appendix Table S1). The predicted targets for each of the mature miRNAs were significantly overrepresented among the downregulated genes in response to the corresponding mimics transfection (Fig 4B). A first set of target candidates were identified by crossing these predicted targets and the genes shown experimentally to be downregulated in resistant M238R cells compared to parental M238P cells (Fig 4C).

Second, RNAs from cells stably overexpressing the miR-143/-145 cluster were analyzed by RNA-sequencing and processed through Ingenuity Pathway Analysis (IPA) to identify the common regulators (transcription factors, growth factors, cytokines, transmembrane receptors, kinases, and phosphatases) between parental cells overexpressing the cluster and resistant cells (Fig 4D). These analyses notably highlighted changes related to decreased cell proliferation, increased cell invasion, and fibrotic pathway activation. To narrow the best target candidates, we finally compared the best-predicted targets based on the two different gain-of-function approaches (Appendix Tables S2 and S3). This strategy resulted in selecting one target candidate for miR-143-3p, 6 target candidates for miR-145-5p, and 2 target candidates for both miR-143-3p and miR-145-5p (Fig 4E). We started with investigations on the F-actin bundling protein Fascin1 (FSCN1), a key regulator of cytoskeleton dynamics, previously associated with tumor growth, migration, invasion, and metastasis (Ma & Machesky, 2015). Using long-read Nanopore sequencing data, we confirmed lower levels of FSCN1 transcript in M238R compared with M238P cells, while reads corresponding to

Figure 4. Identification of gene targets and cellular pathways functionally associated with the miR-143/-145 cluster-mediated undifferentiated/mesenchymal-like melanoma cell phenotype.

- A–C M238P cells were transfected separately with miR-143-3p, miR-145-5p or a negative control (miR-neg) mimics, and RNA content was analyzed using whole-genome microarrays (dataset 1, $n = 2$). (A) Heatmap showing the genes differentially expressed after individual miRNA mimic overexpression. (B) Overrepresentation of miRNA predicted targets in the set of downregulated transcripts following miR-143-3p and miR-145-5p mimics transfection using miRonTop webtool. Each arrow indicates the corresponding overexpressed miRNA. (C) Venn diagram showing the selection of the best target candidates (red boxes) using miR-143-3p and miR-145-5p mimics transfection, as well as comparison of M238R and M238P transcriptomic profiles.
- D–E M238P cells were transduced with a miR-143/-145 construct and selected for stable expression of the cluster or transduced with a control vector, followed by RNA-seq analysis (dataset 2, $n = 2$). (D) Heatmap highlighting the common predicted upstream regulators altered in cells stably expressing the miR-143/-145 cluster and M238R cells compared to control M238P cells. A subset of common regulators (out of the top 50 scores) corresponding to transcription factors (TFs), cytokines and growth factors (GFs), transmembrane receptors, kinases, and phosphatases is shown. Red arrows indicate annotations related to the TGF- β pathway. (E) Venn diagram summarizing the comparison of the best-predicted targets following the two gain-of-function approaches. Subsets of miR-143-3p and miR-145-5p predicted targets downregulated by both mimics and stable lentivirus expression are shown (red boxes).
- F Luciferase assay in HEK cells overexpressing miR-143 or miR-145 transfected with a plasmid harboring the WT or muted sequence of the miR-143 and miR-145 binding sites present in FSCN1 3'UTR. Each bar represents the mean \pm SE of experiments performed at least in triplicate. *** $P \leq 0.001$ and **** $P \leq 0.0001$. P -values were calculated using paired Student's t -test.
- G RT-qPCR analysis of FSCN1 expression in M238P cells transfected with the indicated mimics. Data are represented as mean \pm SE from a triplicate representative of at least three independent experiments. Paired Student's t -test was used for statistical analysis. ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$.
- H Western blot analysis of FSCN1 expression in M238P cells transfected with the indicated mimics.

Source data are available online for this figure.

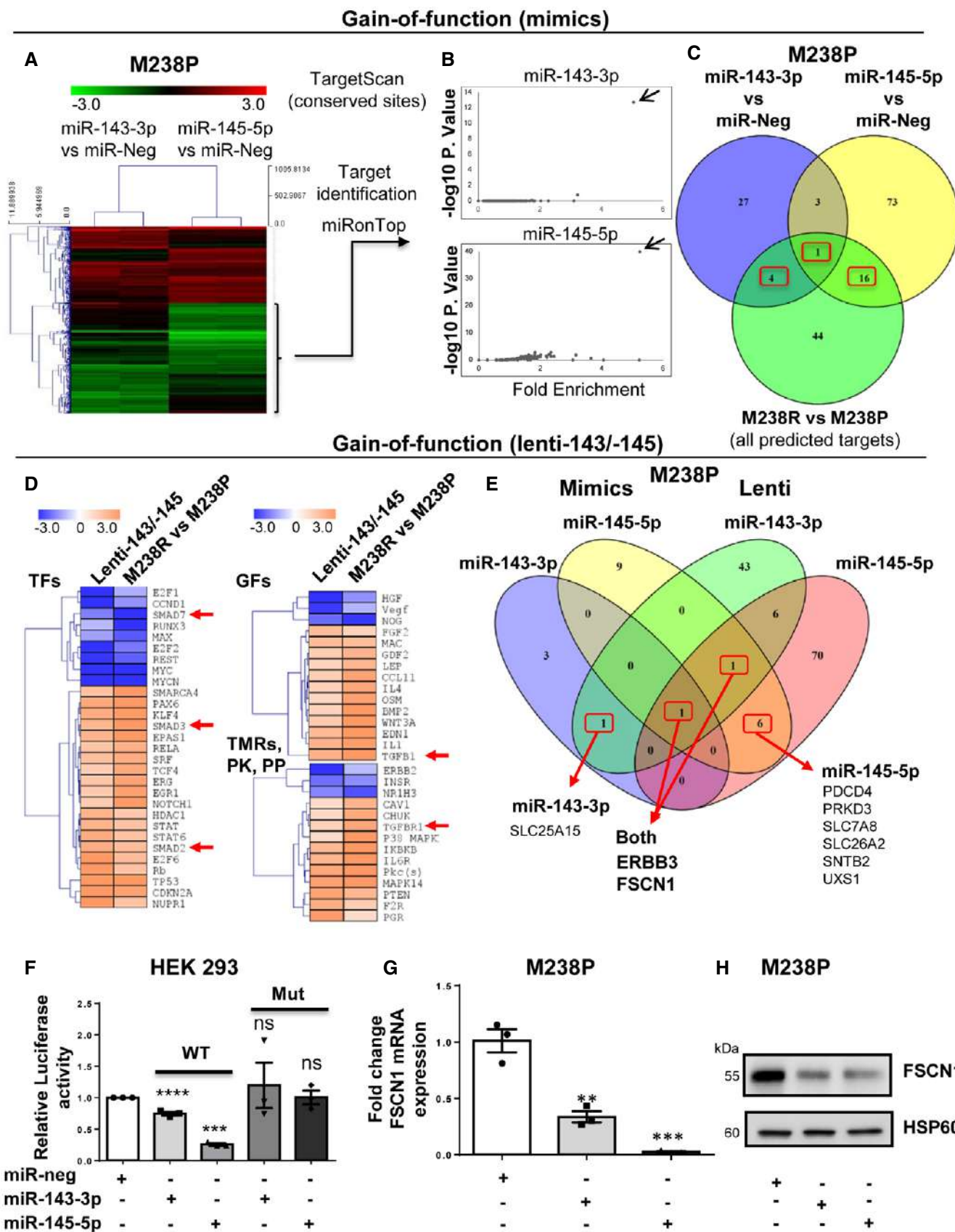


Figure 4.

the putative miR-143/-145 cluster primary transcript could be only detected in M238R cells (Appendix Fig S4A). The characterization of hFSCN1 3'UTR sequence revealed the presence of 2 miR-143-3p and 4 miR-145-5p binding sites. Validation of these sites was first performed using a luciferase reporter corresponding to the full 3'UTR FSCN1 harboring WT or a mutated sequence of the miRNA recognition elements (Fig 4F and Appendix Fig S4B). Finally, qPCR and Western blot analyses confirmed that FSCN1 was downregulated at both mRNA and protein levels upon miR-143-3p and miR-145-5p ectopic expression in various melanoma cells and in cells stably over-expressing the cluster (Fig 4G and H and Appendix Fig S4C and D).

FSCN1 is a functional miR-143/-145 target contributing to the phenotypic switch toward the undifferentiated/mesenchymal-like and resistant state

Considering the strong expression of the miR-143/-145 in BRAFV600E mutant mesenchymal-like resistant cells compared to their parental counterparts, we compared FSCN1 expression levels in various pairs of resistant and sensitive melanoma cell lines. Western blot indicated that FSCN1 protein levels were lower in undifferentiated mesenchymal resistant cells compared to parental cells, while on the contrary, they were elevated in M249R melanoma cells acquiring genetic resistance compared to parental cells (Fig EV4A). We then confirmed the opposite regulation of FSCN1 and miR-143/-145 cluster expression upon BRAFi treatment both *in vivo* using xenografted nude mice (tumors analyzed at the endpoint, as described in Girard *et al* (2020)) and *in vitro* with different human BRAF mutant melanoma cells (Figs 5A and EV4B). Finally, FSCN1 levels were partially restored in M238P cells treated with BRAFi when vemurafenib was combined with the LNA-miR-143, LNA-miR-145, or a combination of the two, as visualized by immunofluorescence staining (Fig 5B), suggesting that FSCN1 downregulation upon BRAFi exposure is due to increased expression of miR-143-3p and miR-145-5p.

To evaluate the influence of FSCN1 downregulation among the various cellular effects mediated by miR-143-3p and miR-145-5p, we then performed a loss-of-function experiment using FSCN1-specific siRNAs in BRAF-mutant parental melanoma cells. Western blot analysis of cell cycle markers (Figs 5C and EV4C) and cell confluence analysis by live-cell imaging (Fig EV4D) showed reduced proliferation after downregulation of FSCN1. This slow-cycling state induced by FSCN1 silencing was accompanied by an enhancement in cell migratory abilities (Figs 5D and EV4E). Moreover, FSCN1 invalidation modulated melanoma cell differentiation state, inducing the switch to a poorly differentiated phenotype characterized by reduced levels of MITF and increased levels of AXL and NGFR (Figs 5E and EV4F).

Using the opposite strategy, we then asked whether ectopic expression of FSCN1 was able to revert the mesenchymal-like phenotype and restore drug sensitivity in BRAFi-resistant melanoma cells. Resistant cells transduced for stable FSCN1 overexpression displayed an increased proliferative rate compared to cells transduced with a control lentivirus (Fig 5F). This effect was linked to diminished migratory abilities (Appendix Fig S5A). This phenotypic transition was further confirmed by Western blot analysis of differentiation markers in various mesenchymal resistant cells, with increased expression of melanocytic markers (MITF, SOX10) and

decreased levels of invasive markers (AXL, SOX9), as well as decreased production of ECM proteins and the ECM remodeling enzyme LOXL2 (Fig 5G and Appendix Fig S5B). Finally, mirroring the effect of miR-143/-145 ASOs, forced expression of FSCN1 in M238R cells decreased viability in the presence of BRAFi (Fig 5H). Altogether, these data underline the central function of the miR-143/-145/FSCN1 axis in the acquisition of a dedifferentiated, mesenchymal-like cell state associated with therapy resistance.

The miR-143/-145 cluster/FSCN1 axis regulates actin cytoskeleton dynamics and mechanopathways

Acquisition of the mesenchymal-like resistant state implies a massive cytoskeletal rearrangement reflected by morphological changes with cells assuming a flattened and spindle-like shape (Nazarian *et al*, 2010; Girard *et al*, 2020; Misek *et al*, 2020). Based on the key function of FSCN1 in F-actin microfilament reorganization (Hashimoto *et al*, 2011; Jansen *et al*, 2011; Elkhatib *et al*, 2014), we specifically analyzed the contribution of the miR-143/-145 cluster/FSCN1 axis on actin cytoskeleton dynamics. Transient overexpression of miR-143-3p and miR-145-5p triggered morphological changes similar to the ones observed upon BRAFi alone or BRAFi plus MEKi administration, as shown by F-actin staining and increased cell area (Fig 6A and B and Appendix Fig S6A and B). To better understand the crosstalk between ECM remodeling and rearranged actin dynamics, we performed immunofluorescent staining of focal adhesions, multi-protein structures that connect ECM to the acto-myosin cytoskeleton. An increased number of focal adhesions revealed by phospho-paxillin staining characterized melanoma cells expressing miR-143-3p or miR-145-5p or melanoma cells upon BRAF pathway inhibition (Fig 6C and D and Appendix Fig S6C and D). Changes in focal adhesion dynamics following miR-143 or miR-145 overexpression were also confirmed by Western blot analysis of focal adhesion components such as phospho-FAK and phospho-SRC (Appendix Fig S6E). In addition, we observed an increase in phosphorylated and total forms of MLC2 and phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) upon cluster overexpression, suggesting the activation of the ROCK/JAK/STAT3 acto-myosin contractility pathway by the two miRNAs. We then investigated whether FSCN1 downregulation produced a similar effect on actin dynamics. Indeed, FSCN1 knockdown led to actin cytoskeleton reorganization with a significant cell area increase (Fig 6E and Appendix Fig S6F), as well as an increased number of focal adhesions per cell (Fig 6F and Appendix Fig S6G).

Acto-myosin remodeling critically regulates the cellular localization of mechanotransducers such as the Hippo pathway transcriptional co-activator YAP and the serum responsive factor co-activator MRTFA, two factors previously associated with resistance to MAPK-targeting therapies and pro-fibrotic responses (Kim *et al*, 2016; Diazzi *et al*, 2020; Girard *et al*, 2020; Misek *et al*, 2020). Expression of miR-143-3p and miR-145-5p in therapy-naïve melanoma cells enhanced YAP and MRTFA nuclear localization as shown by immunofluorescent staining (Fig 7A and B and Appendix Fig S7A and B). As previously described (Kim *et al*, 2016; Girard *et al*, 2020; Misek *et al*, 2020), similar observations were made upon administration of MAPKi to melanoma cells (Fig 7C and D and Appendix Fig S7C and D). Increased YAP and MRTFA activity upon miR-143/145 overexpression was also confirmed by upregulated

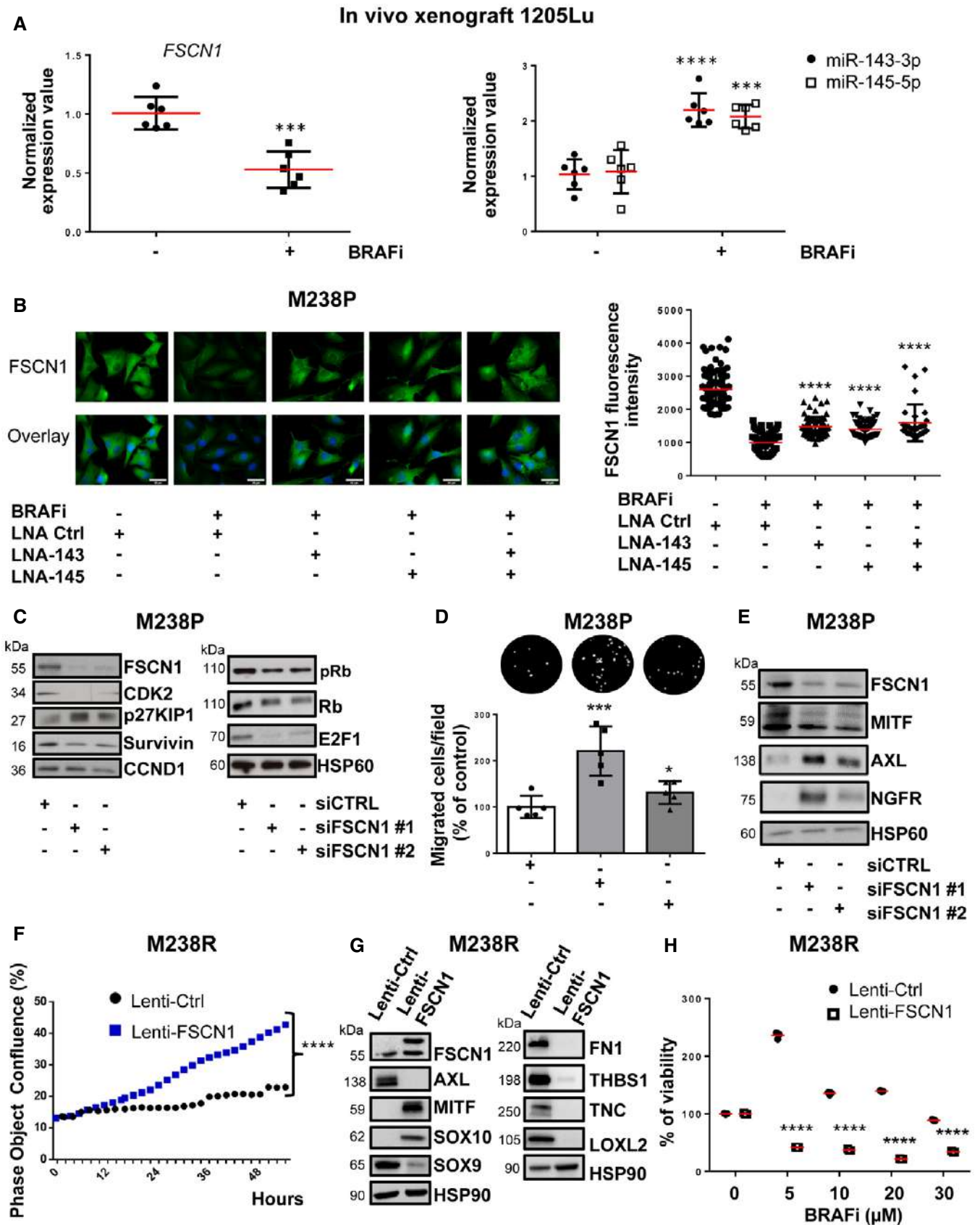


Figure 5.

Figure 5. FSCN1 is a functional miR-143/-145 target contributing to the phenotypic switch toward the undifferentiated/mesenchymal-like state.

- A qPCR analysis of FSCN1, miR-143, and miR-145 expression in a 1205Lu xenograft nude mouse model treated with the BRAFi vemurafenib compared to control mice ($n = 6$). Paired Student's *t*-test was used for statistical analysis. $***P \leq 0.001$ and $****P \leq 0.0001$.
- B FSCN1 immunofluorescent staining and quantification of fluorescence intensity in M238P cells treated or not with BRAFi (vemurafenib, 3 μ M) in the presence or the absence of LNA-based anti-miR-143 (LNA-143) or anti-miR-145 (LNA-145; 50 nM) or a combination of the two. Data are represented as scatter plots with mean \pm SD from 10 independent fields representative of three independent experiments; the Mann–Whitney *U*-test was used for statistical analysis. $****P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m.
- C–E M238P cells were transfected with two different sequences of siRNAs vs FSCN1 or with a control siRNA (72 h, 100 nM). (C) Western blot analysis of cell cycle markers on cell lysates from M238P cells cultured for 72 h following transfection with the indicated siRNAs. (D) Migration assay performed in Boyden chambers. Representative images showing migration of M238P cells treated with the indicated siRNAs. The bar graph represents the quantitative determination of data obtained of mean \pm SD from 5 independent fields representative of three independent experiments, using ImageJ software. Paired Student's *t*-test was used for statistical analysis. $*P \leq 0.05$ and $***P \leq 0.001$. (E) Western blot analysis of phenotype switch markers on cell lysates from M238P cells transfected with the indicated siRNAs.
- F–H BRAFi-resistant M238R cells overexpressing FSCN1 were obtained after transduction with a FSCN1 lentiviral construct. M238R transduced with a Ctrl lentivirus were used as control. (F) Effect of FSCN1 overexpression on cell proliferation assessed by time-lapse analysis using the IncuCyte system. Graph shows quantification of cell confluence. Two-way ANOVA was used for statistical analysis. $****P \leq 0.0001$. (G) Western blot analysis of FSCN1, phenotype switch markers, and ECM remodeling markers on cell lysates from control and FSCN1 overexpressing cells. (H) Crystal violet viability assay of M238R cells stably overexpressing FSCN1 during 6 days with the indicated doses of the BRAFi vemurafenib. Data are represented as mean \pm SD from a triplicate representative of at least three independent experiments. Paired Student's *t*-test was used for statistical analysis. $****P \leq 0.0001$.

Source data are available online for this figure.

expression of several target genes (CTGF, CYR61, AMOTL2, THBS1, AXL), as shown by RT-qPCR analysis (Fig 7E and Appendix Fig S7E). Again, these changes in cytoskeleton organization were reproduced by FSCN1 knockdown, with nuclear translocation of MRTFA and YAP (Fig 7F and G and Appendix Fig S7F) and increased target gene expression (Fig 7H). Finally, using the opposite strategy, we tested whether ectopic expression of FSCN1 was able to revert the constitutive activation of mechanical pathways typical of this cell state. Indeed, forced expression of FSCN1 in mesenchymal resistant cells significantly attenuated nuclear localization of YAP and MRTFA, as well as their transcriptional activity (Fig EV5A–C). Overall, our data highlight the central function of the miR-143/-145/FSCN1 axis in the regulation of actin cytoskeleton dynamics and mechanopathways, leading to the acquisition of an undifferentiated and drug-resistant mesenchymal-like cell state.

Discussion

Treatments against advanced melanoma invariably end with therapy resistance and failure. Preventing resistance on therapies targeting the MAPK oncogenic pathway still remains a challenge in successful melanoma clinical management. Our present study

reveals that combination of the anti-fibrotic drug nintedanib with targeted therapy provides therapeutic benefit in preclinical models of melanoma. We showed that nintedanib is able to prevent the acquisition by melanoma cells of an undifferentiated mesenchymal-like phenotype, an aggressive cell state previously shown to be associated with the expression of pro-fibrotic markers, acquisition of myofibroblast/CAF-like activities, and enhanced mechanosignaling and drug resistance (Diazzi *et al*, 2020; Girard *et al*, 2020). Importantly, we provided evidence that the triplet combination BRAFi, MEKi, and nintedanib is active to normalize the fibrous collagen network, delay the onset of resistance, and improve mice survival. We also confirmed the efficacy of this therapeutic combination in human BRAFV600E mutant melanoma cells and described its potential to impair phenotype switching and improve response to targeted therapy (Fig 8).

Nintedanib (BIBF1120) is a multiple tyrosine kinase inhibitor, targeting PDGFR (α and β), FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, and FGFR-4 and VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3, as well as several intracellular tyrosine kinases such as Src, Lck, or Lyn. It has been approved for the treatment of IPF following several clinical trials demonstrating clinical efficacy in slowing disease progression (Bonella *et al*, 2015). Nintedanib was shown to interfere with fundamental processes in lung fibrosis in a variety of *in vitro* assays performed

Figure 6. Regulation of actin cytoskeleton dynamics and focal adhesions by miR-143/-145 cluster /FSCN1 axis.

- A–D M238P cells were transfected with miR-143-3p, miR-145-5p, or a control mimic (miR-neg; 72 h, 30 nM). (B, D) M238P cells were treated 72 h with BRAFi (vemurafenib, 3 μ M) or a combination of BRAFi (vemurafenib, 0.5 μ M) and MEKi (trametinib, 1 μ M). (A–B) Images and quantification of cell area in cells stained for F-actin (red) and nuclei (blue). Data are represented as scatter plot with mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). The Mann–Whitney *U*-test was used for statistical analysis. $****P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m. (C, D) Images and quantification of focal adhesions number in cells stained for paxillin (green) and nuclei (blue). Focal adhesions (FA) number is represented as mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Each point represents the average number of focal adhesions per cell calculated for each field. Paired Student's *t*-test has been used for statistical analysis. $*P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, and $****P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m.
- E, F M238P cells were transfected with two different sequences of siRNAs vs FSCN1 or with a control siRNA (72 h, 100 nM). (E) Images and quantification of cell area in cells stained for F-actin (red) and nuclei (blue). Data are represented as scatter plot with mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). The Mann–Whitney *U*-test was used for statistical analysis. $****P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m. (F) Images and quantification of focal adhesions (FA) number in cells stained for pPaxillin (green) and nuclei (blue). Focal adhesions number is represented as mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Each point represents the average number of focal adhesions per cell calculated for each field. Paired Student's *t*-test was used for statistical analysis. $****P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m.

Source data are available online for this figure.

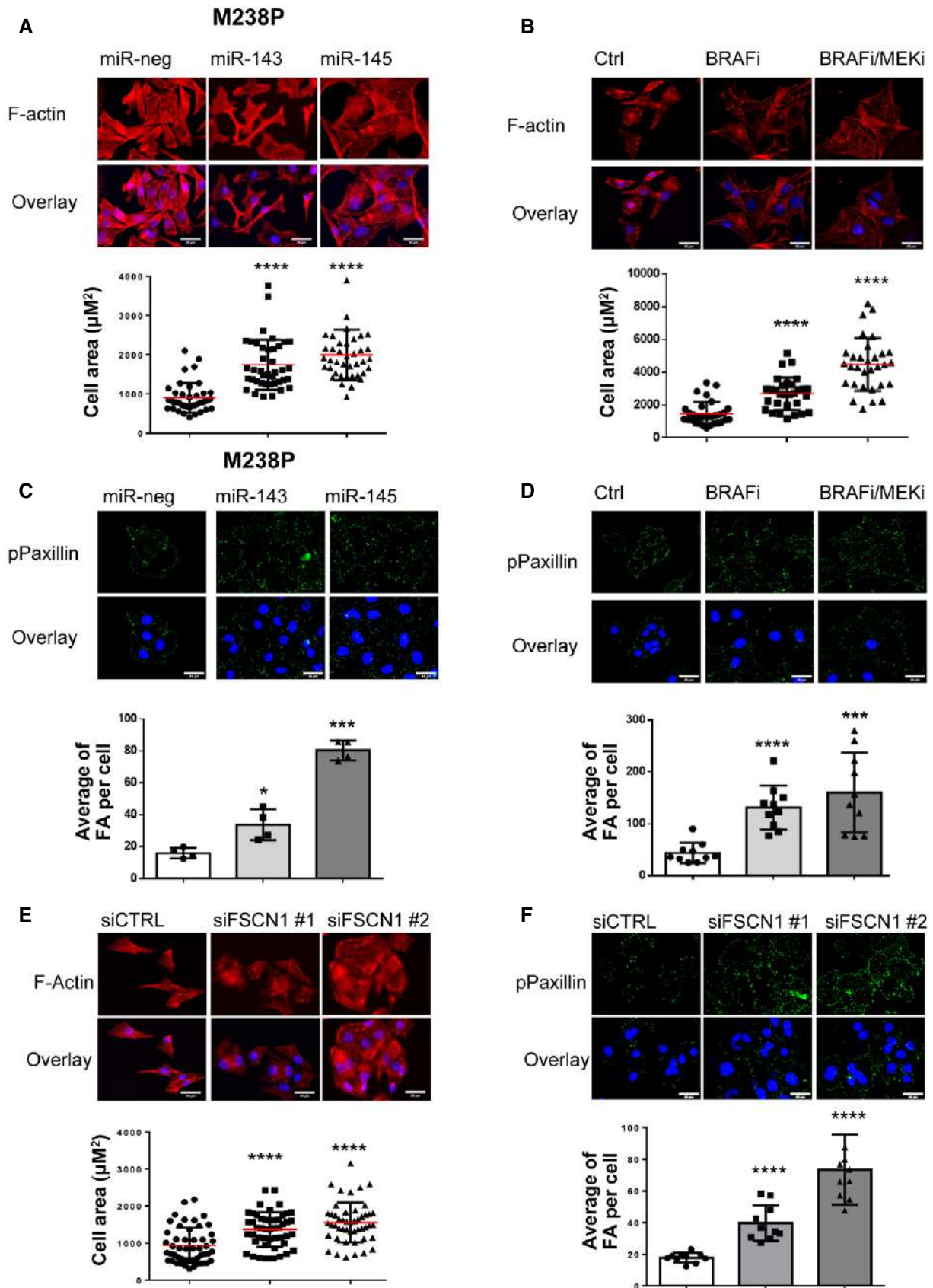


Figure 6.

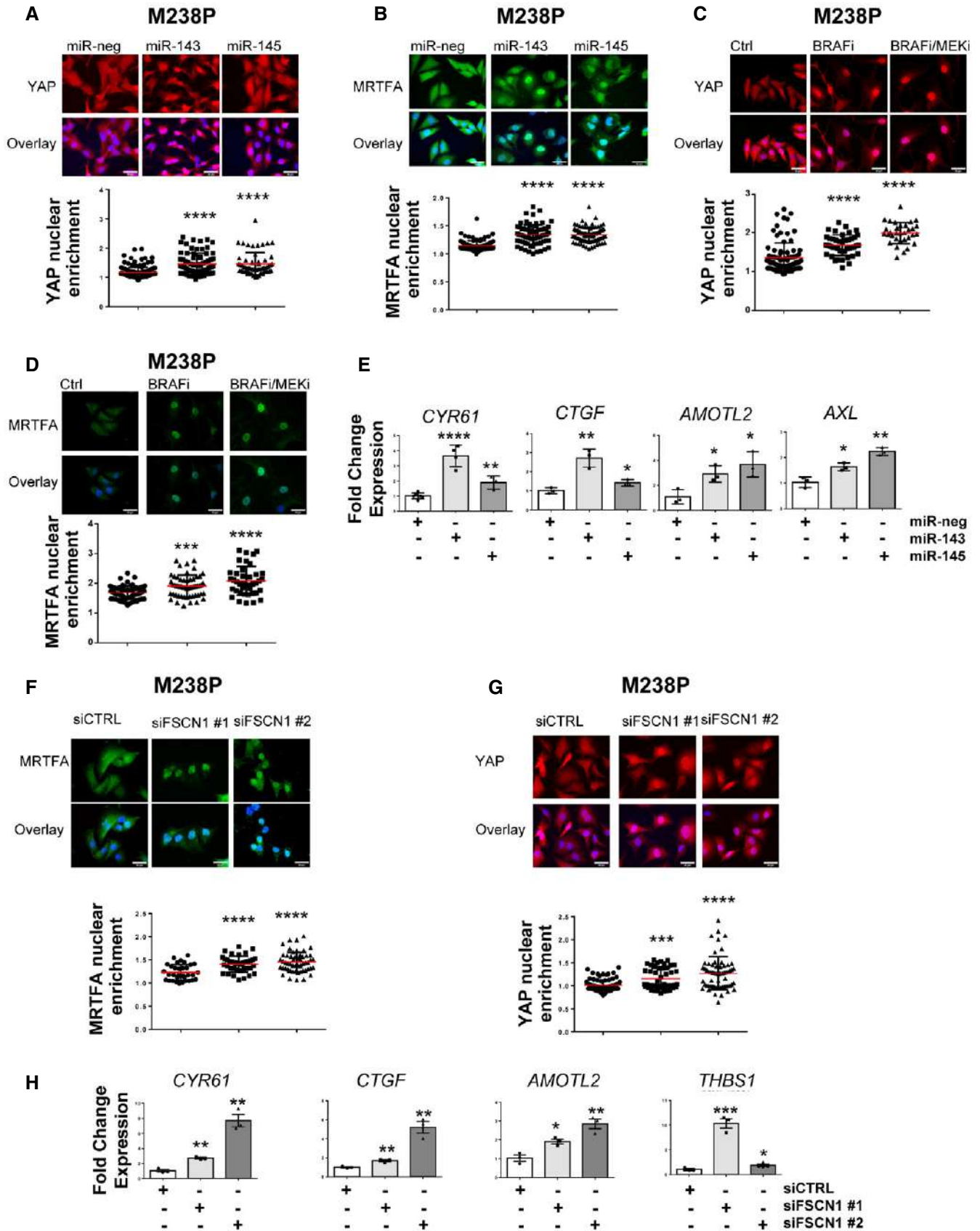
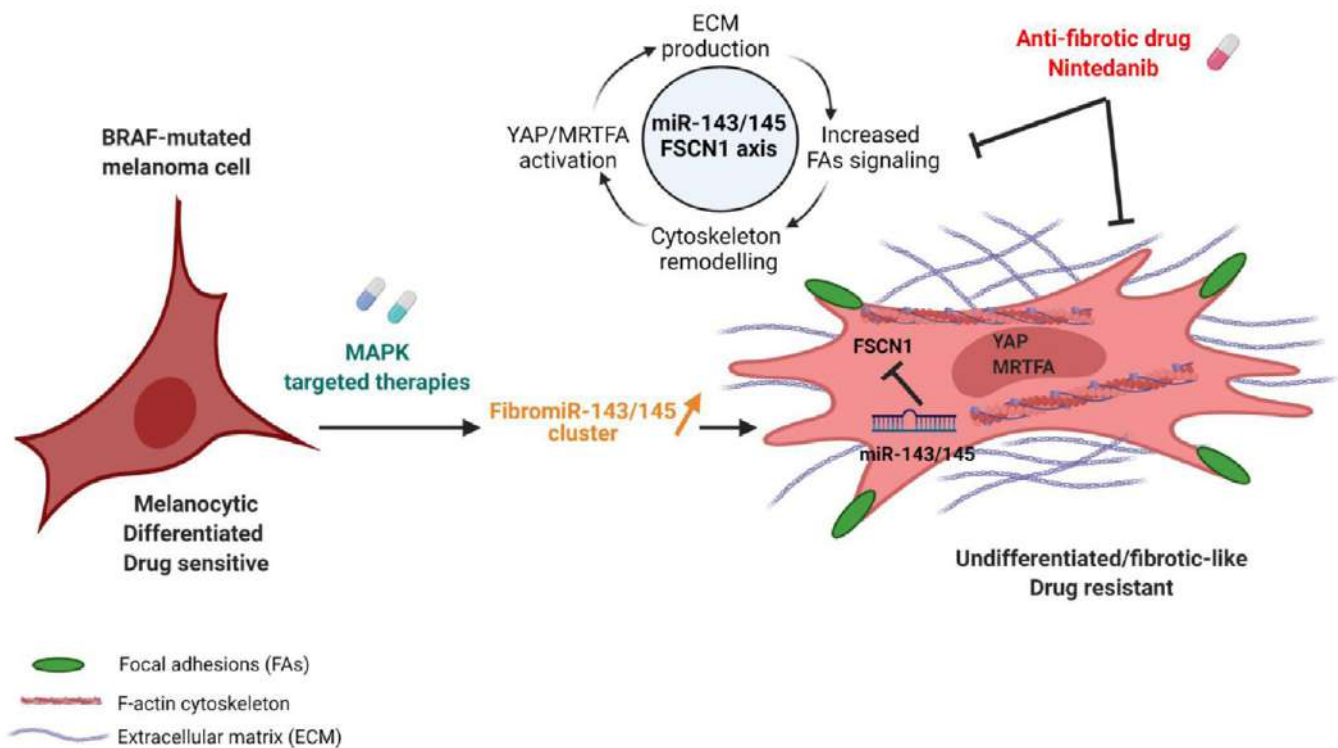


Figure 7.

Figure 7. Regulation of mechanosensitive transcriptional coactivators YAP and MRTF by the miR-143/-145 cluster / FSCN1 axis.

- A, B M238P cells were transfected with miR-143-3p, miR-145-5p, or a control mimic (miR-neg; 72 h, 30 nM). Effect of miR-143-3p or miR-145-5p overexpression on YAP (A) and MRTFA (B) nuclear translocation by immunofluorescence. Data are represented as scatter plots with mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Each point represents the nuclear/cytoplasm ratio. The Mann-Whitney *U*-test was used for statistical analysis. **** $P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m.
- C, D M238P cells were treated 72 h with BRAFi (vemurafenib, 3 μ M) or with a combination of BRAFi (vemurafenib, 0.5 μ M) and MEKi (trametinib, 1 μ M). Effect of BRAFi or BRAFi plus MEKi on YAP (C) and MRTFA (D) nuclear translocation by immunofluorescence. Data are represented as scatter plot with mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Each point represents the nuclear/cytoplasm ratio. The Mann-Whitney *U*-test was used for statistical analysis. *** $P \leq 0.001$ and **** $P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m.
- E Effect of miR-143-3p or miR-145-5p overexpression on the expression of YAP/MRTF target genes assessed by RT-qPCR. Data are normalized to the expression in control cells. Data are represented as mean \pm SD from a triplicate representative of at least 3 independent experiments. Paired Student's *t*-test was used for statistical analysis. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, and **** $P \leq 0.0001$.
- F–H M238P cells were transfected with two different sequences of siRNAs vs FSCN1 or with a control siRNA (72 h, 100 nM). Effect of FSCN1 downregulation on MRTFA (F) and YAP1 (G) nuclear translocation assessed by immunofluorescence in M238P. Data are represented as scatter plot with mean \pm SD ($n \geq 30$ cells per condition). Each point represents the nuclear/cytoplasm ratio. The Mann-Whitney *U*-test was used for statistical analysis. *** $P \leq 0.001$ and **** $P \leq 0.0001$. Scale bar 40 μ m. (H) RT-qPCR analysis for the expression of MRTFA/YAP target genes in M238P cells transfected with the indicated siRNAs. Data are normalized to the expression in parental cells. Data are represented as mean \pm SE from a triplicate representative of at least 3 independent experiments. Paired Student's *t*-test was used for statistical analysis. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, and *** $P \leq 0.001$. Scale bar 40 μ m.

Source data are available online for this figure.

**Figure 8. Proposed model for a role of the pro-fibrotic miR-143/-145 cluster in phenotypic plasticity-driven resistance induced by MAPK-targeted therapies and its potential targeting by nintedanib.**

BRAFi/MAPKi therapy of BRAF-mutated drug-sensitive melanoma cells induces upregulation of miR-143/-145 cluster expression levels. The two mature miRNAs generated from this cluster, miR-143-3p and miR-145-5p, collaborate to mediate phenotypic transition toward a drug-resistant undifferentiated mesenchymal-like state by targeting Fascin actin-bundling protein 1 (FSCN1), increasing focal adhesion signaling (FAs), cytoskeleton remodeling, YAP/MRTFA mechanotransduction pathways activation and ECM production. This mechanism leading to an undifferentiated fibrotic-like drug-resistant phenotype can be targeted by the anti-fibrotic drug nintedanib. Created with BioRender.com.

on primary lung fibroblasts from patients with IPF, notably the inhibition of growth factor-induced proliferation/migration and TGF- β -induced myofibroblast activation, as well as the downregulation of ECM proteins (Wollin et al, 2015). However, although substantial preclinical evidence demonstrates that nintedanib has anti-fibrotic

but also anti-inflammatory and anti-angiogenic activity, the exact contribution of inhibition of specific kinases to the activity of the drug in IPF has not been established and its precise anti-fibrotic mechanism(s) of action is not known. In melanoma, the effects of nintedanib are likely achieved through the normalization of the

fibrotic and drug-protective ECM generated by melanoma cells upon MAPK-targeted therapy exposure. Interestingly, our *in vitro* observations suggest that nintedanib's effect on melanoma cells cannot be solely explain through PDGFR β inhibition. In addition, a direct effect of nintedanib on CAF *in vivo* is also possible regarding the described paradoxical activation of CAF upon BRAF inhibition in melanoma (Fedorenko *et al*, 2015; Hirata *et al*, 2015). In line with this hypothesis, nintedanib was shown to have inhibitory effects on CAF proliferation and activation in a murine model of melanoma (Kato *et al*, 2021).

Herein, we found that combined administration of nintedanib and MAPK-targeted therapy dampens the increased miR-143/-145 cluster expression triggered by oncogenic BRAF pathway inhibition, suggesting that inhibition of ECM reprogramming in the presence of nintedanib is, at least partially, mediated by preventing upregulation of these two FibromiRs. Induction of the miR-143/-145 cluster paralleled the phenotypic switch associated with the dedifferentiated phenotype, and high expression levels of the two miRNAs are correlated with the mesenchymal MAPKi-resistant phenotype in all BRAFV600E mutant human melanoma cell lines known to overexpress RTKs including the PDGFR β . Analysis of PDX models confirmed that expression levels of miR-143-3p and miR-145-5p are associated with a predominant invasive/undifferentiated transcriptional profile in resistant lesions. Clinically, our findings are supported *in silico* by the observation that the pri-miR-143/-145 precursor, MIR143HG, was part of the specific mesenchymal signature of a subset of MAPKi-resistant cells described in Song *et al* (2017). Elevated levels of these miRNAs following BRAFi/MEKi treatment are likely due primarily to the direct inhibition of the MAPK pathway, as oncogenic signals including activation of the MAPK pathway strongly inhibit expression of the cluster in several epithelial cancers (Kent *et al*, 2013). In addition, we have shown a positive regulation of the cluster by PDGF or TGF- β signaling, as previously observed in the context of fibrosis and smooth muscle cell differentiation (Long & Miano, 2011; Yang *et al*, 2013). This observation supports the notion that pro-fibrotic signaling pathways typical of the mesenchymal resistance drive expression of the miR-143/-145 cluster in melanoma cells. Besides, the AKT pathway could also upregulate expression levels of the two miRNAs. Accordingly, previous studies stated that *PTEN* deletion favors the onset of a fibrotic phenotype in lung fibrosis and increased Fibronectin deposition in melanoma (Kuwano, 2006; Fedorenko *et al*, 2016). The observation that nintedanib abrogated both AKT activation and miR-143/-145 expression in melanoma cells is in agreement with the importance of this pathway for acquisition and maintenance of drug resistance. Overall, our data indicate that nintedanib can target both pro-fibrotic and survival pathways, mediated at least in part through PDGFR β /AKT activation and converging to miR-143/-145 cluster expression.

The role of miR-143 and miR-145 in cancer has been widely debated in the last decade (Poli *et al*, 2020). The tumor suppressive role traditionally attributed to the cluster (Das & Pillai, 2015) has been challenged by recent genetic and cellular expression studies pointing mesenchymal cells as the main source of the cluster (Kent *et al*, 2014; McCall *et al*, 2017). In melanoma, we disclosed that miR-143-3p and miR-145-5p promote the acquisition of an invasive and mesenchymal-like phenotype linked to drug adaptation and resistance. The importance of miR-143/145 cluster in the acquisition

of this dedifferentiated state is further highlighted with a loss-of-function approach showing that miR-143-3p and miR-145-5p inhibitors are able to limit ECM reprogramming and activation of mechanopathways, and improve anti-BRAF treatment efficacy. While further work using a combination of ASOs directed against the two mature miRNAs or the primary transcript is necessary to confirm these promising results in a melanoma xenograft model, we propose that the miR-143/-145 cluster may represent a novel attractive therapeutic target to prevent cells from switching to a mesenchymal/invasive state and tumor relapse after targeted therapy.

Our study shows that mechanistically the miR-143/-145 cluster functions in melanoma cells through targeting the cytoskeletal regulator FSCN1, one of the best hits identified by our screening, confirming previous studies indicating that FSCN1 is a direct target of both mature miRNAs (Kano *et al*, 2010; Liu *et al*, 2012). FSCN1 has been widely studied in several malignancies for its role in promoting invasion and metastasis. However, a complete characterization of FSCN1 functions in melanoma is still missing and some published studies are controversial (Scott *et al*, 2011; Dynoodt *et al*, 2013b; Ma *et al*, 2013). Consistent with our study, FSCN1 downregulation was shown to inhibit melanoma cell proliferation (Ma *et al*, 2013) and to promote invasion (Dynoodt *et al*, 2013b). Interestingly, FSCN1 expression levels appear to be related to the differentiation stage of melanocytes and transient FSCN1 expression in melanoblast precursors is required for their proliferation and migration, with FSCN1 knockout resulting in hypopigmentation in adult mice (Ma *et al*, 2013). Notably, miR-145-5p is also considered as a key regulator of the pigmentary process in melanocytes, a role mediated by the downregulation of pigmentation genes and melanosome trafficking components, including FSCN1 (Dynoodt *et al*, 2013a). These findings are in line with our data showing that FSCN1 downregulation drives phenotypic transition to a poorly differentiated cell state associated with very low expression of the master regulator of melanocyte differentiation and function, MITF. FSCN1 downregulation may thus be exploited by melanoma cells to generate lineage plasticity and revert to a poorly differentiated phenotype during drug adaptation.

The miR-143/-145 FSCN1 axis also directly modulates the dynamic crosstalk between the actin cytoskeleton and the ECM through the regulation of focal adhesion dynamics. This process is known to promote melanoma survival through FAK signaling and the ROCK pathway to induce acto-myosin-mediated contractile forces (Fedorenko *et al*, 2015; Hirata *et al*, 2015; Orgaz *et al*, 2020). The involvement of the miR-143/-145 cluster is also linked to a fine-tuning of mechanotransduction pathways. Enhanced YAP and MRTFA nuclear translocation reinforces the fibrotic-like phenotype promoted by the cluster and probably facilitates resistance acquisition, as previously demonstrated for these mechanotransducers (Girard *et al*, 2020; Misek *et al*, 2020; Orgaz *et al*, 2020). Interestingly, MRTFA has been involved in the transcriptional regulation of miR-143 and miR-145 expression (Cordes *et al*, 2009; Xin *et al*, 2009; Long & Miano, 2011), suggesting that this transcriptional state might be further stabilized by a positive feedback loop. Such regulatory loops between miRNAs and transcription factors have been previously described in the establishment and maintenance of melanoma phenotypic states (Boyle *et al*, 2011; Li *et al*, 2020).

Despite the ability of FSCN1 downregulation to mimic the main functional effects observed by the ectopic expression of the miR-

143/-145 cluster, we do not exclude the contribution of others targets in the acquisition of the mesenchymal resistant phenotype promoted by the cluster. FSCN1 knockdown failed to reproduce the global ECM signature reprogramming induced by the miR-143/-145 cluster. miRNA target prediction tools identified a plethora of genes involved in cell cycle regulation, DNA damage response, inflammatory pathways, and actin-SRF regulatory network that need to be fully investigated in this context.

We conclude that our work opens new therapeutic avenues to prevent or delay the onset of resistance to targeted therapy in melanoma. Our findings provide a rationale for designing clinical trials with nintedanib and potentially other anti-fibrotic agents to enhance treatment efficacy in BRAF-mutated melanoma patients. We also bring an original mechanism of action directly linking the inhibition of the BRAF oncogenic pathway with the induction of the miR-143/-145 FibromiR cluster promoting the acquisition of a drug-resistant, undifferentiated, and mesenchymal-like cell state (Fig 8). Finally, we propose the cluster as a new promising biomarker or druggable target to overcome non-genetic processes of phenotypic plasticity-driven therapeutic resistance.

Materials and Methods

Cell lines and reagents

Isogenic pairs of vemurafenib-sensitive and vemurafenib-resistant melanoma cells (M229, M238, M249) were provided by R. Lo. UACC62 vemurafenib-sensitive (UACC62P) and vemurafenib-resistant melanoma cells (UACC62R) were provided by Neubig's laboratory. 1205Lu cells were obtained from Rockland. YUMM1.7 mouse melanoma cells were a kind gift from M. Bosenberg (Meeth *et al*, 2016). A375DR melanoma cells were provided by S. Shen. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 7% FBS (Hyclone) and 1% penicillin/streptomycin. Resistant cells were continuously exposed to 1 μ M of vemurafenib. Cell lines were routinely tested for the absence of Mycoplasma by PCR.

Short-term cultures of patient melanoma cells MM034 and MM099 were generated in the laboratory of Pr G. Ghanem. Culture reagents were purchased from Thermo Fisher Scientific. Vemurafenib (PLX4032), trametinib (GSK1120212), cobimetinib (SB431542, GSK690693), nintedanib (BIBF1120), and staurosporine were from Selleckchem. CP673451 was purchased from Tocris Bioscience. Recombinant human TGF- β 1 was obtained from ImmunoTools. Recombinant human PDGF-BB was purchased from Peprotech.

Information on all reagents used is provided in Appendix Tables S4–S6.

In vivo experiments

In vivo experiments were performed on 6-week-old female C57BL/6 mice (Janvier Labs: <https://www.janvier-labs.com/>). Animal housing was carried out in the "Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire" in accordance with the Institutional Animal Care and the local ethical committee and within the context of approved project applications (CIEPAL-Azur agreement NCE/2018-483). 4×10^5 YUMM1.7 cells were injected in both flanks of C57BL/6

mice. Tumors were measured with caliper, and treatments were started when the tumors reached a volume of 0.1 cm³, after randomization of mice into control and test groups. Vemurafenib (30 mg/kg), trametinib (0.3 mg/kg), and nintedanib (50 mg/kg) were administered by oral gavage three times per week. Control mice were treated with vehicle only. Animals were sacrificed when the tumors reached a volume of 1 cm³. After animal sacrifice, tumors were dissected, weighed, and snap-frozen in liquid nitrogen for RNA or protein extraction and immunofluorescence analysis (embedded in OCT from Tissue-Tek). Tumors for picrosirius red staining were fixed in formalin. Melanoma cell-derived xenograft experiments performed on 6-week-old female athymic nude nu/nu mice were described in Girard *et al* (2020). Melanoma patient-derived xenograft models were established by TRACE (PDX platform; KU Leuven) using tissue from melanoma patients undergoing surgery at the University Hospitals KU Leuven. Written informed consent was obtained from all patients, and all procedures were approved by the UZ Leuven Medical Ethical Committee (S54185/S57760/S59199) and carried out in accordance with the principles set out in the WMA Declaration of Helsinki and the Department of Health and Human Services Belmont Report.

Cell transduction

A DNA sequence containing the miR-143/145 cluster was cloned into a pLX307 vector by Sigma-Aldrich. The vector used for FSCN1 overexpression is described in Scott *et al*, 2011. Lentiviral particles were produced by the PVM Vectorology Platform in Montpellier, France. Melanoma cells were transduced as follows. After 20-min incubation of melanoma cells with lentiviral particles diluted in OptiMEM, complete medium (7% FBS) was added to the cells. Forty-eight hours after transduction, the process of antibiotic selection was started. For cells transduced for the miR-143/-145 cluster overexpression, 1 μ g/ml of puromycin was administered every 48 h. For cells transduced for FSCN1 overexpression, 2 μ g/ml of blasticidin was administered every 48 h. Experiments were performed starting 2 weeks after the beginning of antibiotic selection.

RNAi studies

Non-targeting control and FSCN1 siRNA duplexes were designed by Sigma-Aldrich and used at a final concentration of 100 nM. Transfection was performed using Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed 72 h post-transfection.

miRNA overexpression and inhibition

Pre-miRNA-143-3p and pre-miRNA-145-5p and control miRNA (miR-neg#1) were purchased from Ambion. LNA-based miRNA inhibitors vs. miR-143-3p and miR-145-5p and the respective control (negative control A) were purchased from Qiagen. Pre-miRNAs were used at a final concentration of 30 nM, and LNA inhibitors, at a final concentration of 50 nM. Transfection was performed using Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed 72 h post-transfection unless otherwise stated.

Luciferase assay

Molecular constructs for luciferase assay were made in psiCHECK-2 vectors from Promega by cloning upstream of the Renilla luciferase gene annealed oligonucleotides based on the 3'UTR of target genes. HEK293 cells were plated on 96-well plates and co-transfected with 0.2 µg of psiCHECK-2 plasmid constructs and 10 nM of pre-miRNAs (miR-143-3p, miR-145-5p) or control pre-miRNA. Transfections were performed using Lipofectamine 3000, following the manufacturer's instructions. Firefly and Renilla luciferase activities were measured using the Dual-Glo Luciferase Assay Kit by Promega 48 h after transfection.

Conditioned medium preparation

Medium conditioned by melanoma cells was harvested, centrifuged for 5 min at 2,500 g, and filtered with 0.22-µm filters to eliminate cell debris.

Tumor and cell RNA extraction

Total RNA was extracted from tumors and cell samples with the miRNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

Real-time quantitative PCR

Gene expression

Protocol using the StepOne (Applied Biosystems): 1 µg of extracted RNA was reverse-transcribed into cDNA using the Multiscribe reverse transcriptase kit provided by Applied Biosystems. Primers were designed using PrimerBank or adopted from published studies. Gene expression levels were measured using Platinum SYBR Green qPCR Supermix (Fisher Scientific) and Step One thermocycler. Results from qPCR were normalized using the reference gene RPL32, and relative gene expression was quantified with the $\Delta\Delta C_t$ method. Heatmaps describing gene expression fold changes were prepared using MeV software.

Protocol using the biomark HD system analysis (Fluidigm Corporation, USA)

cDNAs were prepared from 100 ng of RNA using Fluidigm Reverse Transcription Master Mix (Fluidigm PN 100-647297). Following a pre-amplification step (Fluidigm® PreAmp Master Mix and DELTA-gene™ Assay kits) and exonuclease I treatment, samples diluted in Eva-Green® Supermix with Low ROX were loaded with primer reaction mixes in 96.96 Dynamic Array™ IFCs. Gene expression was then assessed on a Fluidigm BioMark HD instrument. Data were analyzed with real-time PCR analysis software (Fluidigm Corporation) and presented as relative gene expression according to the $\Delta\Delta C_t$ method. Heatmaps depicting fold changes of gene expression were prepared using MeV software.

miRNAs expression

20 ng of extracted RNA was reverse-transcribed into cDNA using the miRCURY LNA RT Kit (Qiagen). Mature miRNA expression levels were measured using the miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Results from qPCR were normalized using miR-16-5p and relative gene expression was quantified with the $\Delta\Delta C_t$ method. miRCURY LNA miRNA PCR assays for detecting miR-143, miR-145, and miR-16 were purchased by Qiagen.

Information on primer sequences used in this study is provided in Appendix Tables S4 and S5.

Western Blot analysis and antibodies

Whole-cell lysates were prepared using RIPA buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Pierce, Fisher Scientific), briefly sonicated and centrifuged for 20 min, 4°C at 14,000 rpm. Whole-cell lysates and conditioned media were separated using SDS-PAGE and transferred into PVDF membranes (GE Healthcare Life Science) for Western blot analysis. Incubation of membranes with primary antibody was performed overnight. After washing, membranes were incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody. A chemiluminescence system (GE Healthcare Life Science) was used to develop blots. HSP60 or HSP90 was used as loading control. For Western blot analysis of conditioned media experiments, Ponceau red staining was used as loading control.

Information on antibodies used in this study is provided in Appendix Table S6.

Immunofluorescence and microscopy

Cell monolayers were grown on glass coverslips or collagen-coated coverslips (10 µg/ml). After the indicated treatments, cells were washed in PBS, fixed in 4% PFA, permeabilized in PBS 0.3% Triton, and blocked in PBS 5% goat serum. Coverslips were then incubated overnight at 4°C with primary antibody diluted in PBS 5% goat serum. Following 1-h incubation with Alexa Fluor-conjugated secondary antibody, coverslips were mounted with Prolong antifade mounting reagent (Thermo Fisher Scientific). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Life Technologies). F-actin was stained with Alexa Fluor 488 phalloidin (Fisher Scientific) or phalloidin-iFluor 594 (Abcam) reagents. Coverslips were imaged using a wide-field Leica DM5500B microscope.

Fibrillar collagen imaging

Collagen in paraffin-embedded tumors was stained with picosirius red using standard protocols. Tumor sections were analyzed by polarized light microscopy as described in (Girard *et al* (2020)). Images were acquired under polarized illumination using a light transmission microscope (Zeiss PALM, at 10× magnification). Fiber thickness was analyzed by the change in polarization color. Birefringence hue and amount were quantified as a percent of total tissue area using ImageJ software.

Viability assay

After the indicated treatments, cells were stained with 0.04% crystal violet, 20% ethanol in PBS for 30 min. Following accurate washing of the plate, representative photographs were taken. The crystal violet dye was solubilized by 10% acetic acid in PBS and measured by absorbance at 595 nm.

Proliferation assay

For real-time analysis of cell proliferation, 3×10^4 cells were plated in complete medium in triplicates on 12-well plates. The InCyte ZOOM imaging system (Essen Bioscience) was used. Phase-contrast pictures were taken every hour. Proliferation curves were generated

using the IncuCyte cell proliferation assay software based on cell confluence.

Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed by flow cytometry analysis of cells stained with propidium iodide. After fixation in ice-cold 70% ethanol, cells were stained with 40 µg/ml propidium iodide in PBS with 100 µg/ml RNase A. The samples were then analyzed on a BD FACSCanto cytometer.

Analysis of apoptosis by flow cytometry

Cell death was evaluated by flow cytometry following staining with Annexin V-FITC and DAPI (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. The samples were then analyzed on a BD FACSCanto cytometer.

Migration and invasion assays

Migration properties of melanoma cells were tested using Boyden chambers containing polycarbonate membranes (8 µm pores transwell from Corning). After overnight starvation, 1×10^4 cells were seeded on the upper side of the chambers placed on 24-well plates containing 10% FBS medium for 24 h, unless otherwise stated, at 37°C in 5% CO₂. At the end of the experiment, cells migrated on the lower side of the chambers were fixed in 4% paraformaldehyde, stained for 15 min with Hoechst, and imaged at the microscope (five random fields per well). Nuclei counting was performed using the ImageJ software. To assess invasion properties of melanoma cells, transwells were coated with Matrigel (1 mg/ml) and cell solution was added on the top of the matrigel coating to simulate invasion through the extracellular matrix.

Immunofluorescence analysis

Cell area was measured on cells stained for F-Actin using ImageJ. The nuclear/cytosolic ratio of YAP or MRTF was quantified by measuring the nuclear and cytosolic fluorescence intensity using ImageJ. The Hoechst staining was used to define nuclear versus cytosolic regions. Focal adhesions were quantified using ImageJ. Pictures were subjected to background subtraction (rolling: 10) before analysis; then, "default threshold" was applied, followed by "analyze particles of object with a size 0.20 and infinity" to analyze the number of objects and their area. The number of focal adhesions was normalized to the total cell area.

Microarray gene expression analysis

Total RNA integrity was tested with the Agilent BioAnalyser 2100 (Agilent Technologies). After labeling RNA samples with the Cy3 dye using the low RNA input QuickAmp Kit (Agilent) following the manufacturer's instruction, labeled cRNA probes were hybridized on 8 × 60K high-density SurePrint G3 gene expression human Agilent microarrays.

RNA-sequencing

Short reads: Libraries were generated from 500 ng of total RNAs using TruSeq Stranded Total RNA Kit (Illumina). Libraries were

then quantified with KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems) and pooled. 4 nM of this pool was loaded on a high output flow cell and sequenced on an Illumina NextSeq500 sequencer using 2 × 75 bp paired-end chemistry. Reads were aligned to the human genome release hg38 with STAR 2.5.2a as previously described (Savary *et al*, 2019).

Nanopore long reads: libraries were prepared according to the PCR-cDNA Barcoding protocol (SQK – PCB109). Briefly, 50 ng of total RNA was reverse-transcribed, barcoded, and amplified by PCR (17 cycles) and sequencing adapters were added. The two barcoded libraries (CARMN RNA 238R and CARMN RNA 238S) were mixed 1:1, and 110 fmol was loaded on a PromethION flow cell (FLO-PRO002). Reads were processed with the FLAIR pipeline (<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15171-6>). Raw reads were aligned to hg38 with minimap2 (version 2.17-r941). Misaligned splice sites were corrected according to the GENCODE v.35 annotations. High-confidence isoforms were defined after grouping corrected reads of all samples sharing same unique splice junctions, by selecting for each group a representative isoform with confident TSS/TES and supported by more than three reads. Selected isoforms were quantified using minimap2 in each sample. Differential isoform expression and alternative splicing event significance were tested without replicates using ad-hoc scripts provided on the Brook's lab GitHub (<https://github.com/BrooksLabUCSC/FLAIR>).

Statistical analysis and biological theme analysis: Microarray data analyses were performed using R (<http://www.r-project.org/>). Quality control of expression arrays was performed using the Bioconductor package arrayQualityMetrics and custom R scripts. Additional analyses of expression arrays were performed using the Bioconductor package limma. Briefly, data were normalized using the quantile method. No background subtraction was performed. Replicated probes were averaged after normalization and control probes removed. Statistical significance was assessed using the limma moderated *t*-statistic. Quality control of RNA-seq count data was assessed using in-house R scripts. Normalization and statistical analysis were performed using Bioconductor package DESeq2. All *P*-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini–Hochberg procedure, which controls the false discovery rate (FDR). Differentially expressed genes were selected based on an adjusted *P*-value below 0.05. Enrichment in biological themes (molecular function, upstream regulators, and canonical pathways) was performed using Ingenuity Pathway Analysis software (<http://www.ingenuity.com/>).

miRNA target analysis

MiRonTop is an online java web tool (<http://www.genomique.info/>) (Le Brigand *et al*, 2010) integrating whole-transcriptome expression data to investigate whether specific miRNAs are involved in a specific biological system. MiRonTop classifies transcripts into two categories ("Upregulated" and "Downregulated"), based on thresholds for expression level, differential expression, and statistical significance. It then analyzes the number of predicted targets for each miRNA, according to the prediction software selected (Targetscan, exact seed search, TarBase).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism. Unpaired two-tailed Student's *t*-test or the unpaired two-tailed Mann–Whitney test was used for statistical comparison between two groups. For

The paper explained

Problem

Despite recent improvements in targeting metastatic melanoma, resistance to inhibition of the BRAFV600 oncogenic pathway occurs in most patients treated with MAPK-inhibiting drugs. Melanoma cells adopt various means to evade therapy, including transcriptional reprogramming leading to phenotypic dedifferentiation and acquisition of mesenchymal and pro-fibrotic features. This state of cellular resistance is highly invasive and displays an increased ability to produce and remodel the extracellular matrix (ECM), creating a drug-tolerant microenvironment. However, the molecular networks that define this pro-fibrotic cellular behavior and promote resistance are still unclear.

Results

We show that the anti-fibrotic drug nintedanib prevents the fibrotic reaction and improves MAPK-targeting therapy efficacy, retarding the onset of resistance in a mouse melanoma model. Expression screening and mechanistic studies identified the pro-fibrotic miR-143/-145 cluster as a driver of nintedanib-sensitive mesenchymal resistant phenotype. Using a combination of gain- and loss-of-function approaches, we dissected the molecular and cellular processes regulated by these FibromiRs and demonstrate that during drug adaptation, melanoma cells upregulate the miRNA cluster, which drives a phenotypic switch toward a dedifferentiated therapy-resistant state. The miR-143/-145 cluster also induces ECM production and promotes cell migration and invasion through the activation of focal adhesion dynamics and mechanotransduction pathways. Finally, Fascin actin-bundling protein 1 (FSCN1) was identified as a key functional target of miR-143-3p and miR-145-5p for the acquisition of the pro-fibrotic therapy-resistant phenotype.

Impact

Our study highlights non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in melanoma and deciphers a regulatory cascade involving the miR-143/-145/FSCN1 pro-fibrotic axis in the acquisition of a therapy-resistant cellular state. It also provides a scientific rationale for designing clinical trials with nintedanib and potentially other anti-fibrotic agents to overcome resistance in patients with BRAF-mutated melanoma. Finally, our findings might have implications for other MAPK-driven cancers and fibrosis-related diseases.

comparisons between multiple groups, one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* tests was used. For statistical analysis of cell confluence live imaging, two-way ANOVA was used. For statistical analysis of Kaplan–Meier curves, the log rank (Mantel–Cox) test was used. Results are given as mean \pm SEM or mean \pm SD. Exact *P*-values obtained for the statistical analyses provided in the main figures are available in Appendix Table S7.

Data availability

Expression datasets that support the findings of this study have been deposited in the Gene Expression Omnibus SuperSerie record GSE171883 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE171883>) containing 3 distinct datasets under the following accession codes:

- Dataset 1: GSE171880 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE171880>). Effect of miR-143-3p or miR-145-5p mimics overexpression in M238P cells (microarrays).

- Dataset 2: GSE171881 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE171881>). RNA-Seq analysis of M238P stably expressing miR-143/-145 cluster.

- Dataset 3: GSE171882 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE171882>). Transcriptome analysis of M238R versus M238P using nanopore long-read sequencing.

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

This work was supported by funds from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ligue Contre le Cancer, Fondation ARC, Institut National du Cancer (INCA_12673), ITMO Cancer Aviesan (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Science and Health) within the framework of the Cancer Plan (Plan Cancer 2018 “ARN non-codants en cancérologie: du fondamental au translationnel” n° 18CN045), and the French Government (National Research Agency, ANR) through the “Investments for the Future” LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01 and ANR-PRCI-18-CE92-0009-01 FIBROMIR). The financial contribution of the Conseil Général 06, Cancéropôle PACA, and Region Provence Alpes Côte d'Azur to the C3M and IPMC is also acknowledged. S.D. was a recipient of doctoral fellowships from the LABEX SIGNALIFE and Fondation pour la Recherche Médicale. I.B. and A.C. were recipients of a doctoral fellowship from La Ligue Contre le Cancer. The PDX work was supported by FWO (#G.0929.16N) and KULeuven (C1 grant) to J.-C.M. We thank Roger Lo for M229P/R, M238P/R, and M249P/R melanoma cells, Richard Neubig for UACC62 parental and resistant cell lines, Markus Bosenberg for YUMM1.7 cells, Ghanem Ghanem for short-term cultured melanoma cells, and Shensi Shen for the A375DR melanoma cells. Melanoma PDX models are from the PDX facility TRACE (KULeuven, Belgium). We thank Patrick Brest for helpful discussions. We also thank the C3M animal room facility and the C3M imaging facility, as well as the UCA Genomix platform and the PVM Vectorology Platform.

Author contributions

Serena Diazzi: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing—original draft; Writing—review and editing. **Alberto Baeri:** Formal analysis; Investigation; Methodology. **Julien Fassy:** Formal analysis; Investigation; Methodology. **Margaux Lecacheur:** Investigation; Methodology. **Oskar Marin-Bejar:** Data curation; Investigation. **Christophe A Girard:** Investigation; Methodology. **Lauren Lefevre:** Investigation. **Caroline Lacoux:** Investigation. **Marie Irondele:** Formal analysis. **Carine Mounier:** Investigation. **Marin Truchi:** Formal analysis. **Marie Couralet:** Investigation. **Mickael Ohanna:** Investigation. **Alexandrine Carminati:** Investigation. **Ilona Berestjuk:** Investigation. **Frederic Larbret:** Investigation. **David Gilot:** Resources; Writing—review and editing. **Georges Vassaux:** Investigation; Writing—review and editing. **Jean-Christophe Marine:** Resources; Writing—review and editing. **Marcel Deckert:** Conceptualization; Formal analysis; Supervision; Funding acquisition; Methodology; Writing—review and editing. **Bernard Mari:** Conceptualization; Formal analysis; Supervision; Funding acquisition; Methodology; Writing—original draft; Project administration; Writing—review and editing. **Sophie Tartare-Deckert:** Conceptualization; Formal analysis; Supervision; Funding acquisition; Methodology; Writing—original draft; Project administration; Writing—review and editing.

In addition to the CRediT author contributions listed above, the contributions in detail are:

SD, MD, BM, and ST-D conceived and designed the study. SD, AB, JF, CAG, ML, GV, MD, BM, and ST-D developed methodology. SD, AB, JF, ML, OM-B, CG,

LL, CL, CM, MT, MC, MO, AC, IB, FL, GV, and J-CM acquired data. SD, AB, JF, MI, FL, MD, BM, and ST-D analyzed and interpreted the data. SD, BM, and ST-D wrote the original draft. SD, DG, GV, J-CM, MD, BM, and ST-D wrote, reviewed, and edited the manuscript. MD, BM, and ST-D provided administrative, technical, or material support. MD, BM, and ST-D supervised the study.

Disclosure and competing interests statement

S.D., B.M., S.T.-D., and M.D. have a patent pending on use of anti-fibrotic drugs to enhance targeted therapies in melanoma (EP21305325.9). All other authors declare that they have no competing interests.

References

- Akbani R, Akdemir K, Aksoy B, Albert M, Ally A, Amin S, Arachchi H, Arora A, Auman J, Ayala B *et al* (2015) Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 161: 1681–1696
- Arozarena I, Wellbrock C (2019) Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer* 19: 377–391
- Atefi M, von Euw E, Attar N, Ng C, Chu C, Guo D, Nazarian R, Chmielowski B, Glaspy JA, Comin-Anduix B *et al* (2011) Reversing melanoma cross-resistance to BRAF and MEK inhibitors by co-targeting the AKT/mTOR pathway. *PLoS One* 6: e28973
- Bonella F, Stowasser S, Wollin L (2015) Idiopathic pulmonary fibrosis: current treatment options and critical appraisal of nintedanib. *Drug Des Devel Ther* 9: 6407–6419
- Boyle GM, Woods SL, Bonazzi VF, Stark MS, Hacker E, Aoude LG, Dutton-Regester K, Cook AL, Sturm RA, Hayward NK (2011) Melanoma cell invasiveness is regulated by miR-211 suppression of the BRN2 transcription factor. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 525–537
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M *et al* (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364: 2507–2516
- Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D (2009) miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 460: 705–710
- Das AV, Pillai RM (2015) Implications of miR cluster 143/145 as universal anti-oncomiRs and their dysregulation during tumorigenesis. *Cancer Cell Int* 15: 92
- Diazzi S, Tartare-Deckert S, Deckert M (2020) Bad neighborhood: fibrotic stroma as a new player in melanoma resistance to targeted therapies. *Cancers (Basel)* 12: 1364
- Dynodot P, Mestdagh P, Van Peer G, Vandesompele J, Goossens K, Peelman LJ, Geusens B, Speeckaert RM, Lambert JL, Van Gele MJ (2013a) Identification of miR-145 as a key regulator of the pigmented process. *J Invest Dermatol* 133: 201–209
- Dynodot P, Speeckaert R, De Wever O, Chevolet I, Brochez L, Lambert J, Van Gele M (2013b) miR-145 overexpression suppresses the migration and invasion of metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 42: 1443–1451
- Elkhatib N, Neu MB, Zensen C, Schmoller KM, Louvard D, Bausch AR, Betz T, Vignjevic DM (2014) Fascin plays a role in stress fiber organization and focal adhesion disassembly. *Curr Biol* 24: 1492–1499
- Fallahi-Sichani M, Becker V, Izar B, Baker GJ, Lin JR, Boswell SA, Shah P, Rotem A, Garraway LA, Sorger PK (2017) Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Mol Syst Biol* 13: 905
- Fedorenko IV, Abel EV, Koomen JM, Fang B, Wood ER, Chen YA, Fisher KJ, Iyengar S, Dahlman KB, Wargo JA *et al* (2016) Fibronectin induction abrogates the BRAF inhibitor response of BRAF V600E/PTEN-null melanoma cells. *Oncogene* 35: 1225–1235
- Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE (2012) From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 12: 349–361
- Fedorenko IV, Wargo JA, Flaherty KT, Messina JL, Smalley KSM (2015) BRAF inhibition generates a host-tumor niche that mediates therapeutic escape. *J Invest Dermatol* 135: 3115–3124
- Girard CA, Lecacheur M, Ben Jouira R, Berestjuk I, Diazzi S, Prod'homme V, Mallavialle A, Larbret F, Gesson M, Schaub S *et al* (2020) A feed-forward mechanosignaling loop confers resistance to therapies targeting the MAPK pathway in BRAF-mutant melanoma. *Cancer Res* 80: 1927–1941
- Girotti MR, Pedersen M, Sanchez-Laorden B, Viros A, Turajlic S, Niculescu-Duvaz D, Zamboni A, Sinclair J, Hayes A, Gore M *et al* (2013) Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov* 3: 158–167
- Hanna J, Hossain GS, Kocerha J (2019) The potential for microRNA therapeutics and clinical research. *Front Genet* 10: 478
- Hashimoto Y, Kim DJ, Adams JC (2011) The roles of fascin in health and disease. *J Pathol* 224: 289–300
- Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, Larkin J, Marais R, Sahai E (2015) Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer Cell* 27: 574–588
- Ishida M, Selaru FM (2013) miRNA-based therapeutic strategies. *Curr Anesthesiol Rep* 1: 63–70
- Jansen S, Collins A, Yang C, Rebowski G, Svitkina T, Dominguez R (2011) Mechanism of actin filament bundling by fascin. *J Biol Chem* 286: 30087–30096
- Kano M, Seki N, Kikkawa N, Fujimura L, Hoshino I, Akutsu Y, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Matsubara H (2010) miR-145, miR-133a and miR-133b: tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 127: 2804–2814
- Kato R, Haratani K, Hayashi H, Sakai K, Sakai H, Kawakami H, Tanaka K, Takeda M, Yonesaka K, Nishio K *et al* (2021) Nintedanib promotes antitumor immunity and shows antitumor activity in combination with PD-1 blockade in mice: potential role of cancer-associated fibroblasts. *Br J Cancer* 124: 914–924
- Kent OA, Fox-Talbot K, Halushka MK (2013) RREB1 repressed miR-143/145 modulates KRAS signaling through downregulation of multiple targets. *Oncogene* 32: 2576–2585
- Kent OA, McCall MN, Cornish TC, Halushka MK (2014) Lessons from miR-143/145: the importance of cell-type localization of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 42: 7528–7538
- Kim MH, Kim J, Hong H, Lee SH, Lee JK, Jung E, Kim J (2016) Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. *EMBO J* 35: 462–478
- Kuwano K (2006) PTEN as a new agent in the fight against fibrogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 5–6
- Le Brigand K, Robbe-Sermesant K, Mari B, Barbry P (2010) MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics* 26: 3131–3132
- Li K, Tang M, Tong S, Wang C, Sun Q, Lv M, Sun X, Wang T, Jin S (2020) BRAFⁱ induced demethylation of miR-152-5p regulates phenotype switching by targeting TXNIP in cutaneous melanoma. *Apoptosis* 25: 179–191
- Liu R, Liao J, Yang M, Sheng J, Yang H, Wang YI, Pan E, Guo W, Pu Y, Kim SJ *et al* (2012) The cluster of miR-143 and miR-145 affects the risk for esophageal squamous cell carcinoma through co-regulating fascin homolog 1. *PLoS One* 7: e33987

- Long X, Miano JM (2011) Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) utilizes distinct pathways for the transcriptional activation of microRNA 143/145 in human coronary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem* 286: 30119–30129
- Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A et al (2017) Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol* 28: 1631–1639
- Ma Y, Li A, Faller WJ, Libertini S, Fiorito F, Gillespie DA, Sansom OJ, Yamashiro S, Machesky LM (2013) Fascin 1 is transiently expressed in mouse melanoblasts during development and promotes migration and proliferation. *Development* 140: 2203–2211
- Ma Y, Machesky LM (2015) Fascin1 in carcinomas: its regulation and prognostic value. *Int J Cancer* 137: 2534–2544
- Marin-Bejar O, Rogiers A, Dewaele M, Femel J, Karras P, Poznaniak J, Bervoets G, Van Raemdonck N, Pedri D, Swings T et al (2021) Evolutionary predictability of genetic versus nongenetic resistance to anticancer drugs in melanoma. *Cancer Cell* 39: 1135–1149.e1138
- Marine JC, Dawson SJ, Dawson MA (2020) Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat Rev Cancer* 20: 743–756
- Marusak C, Thakur V, Li Y, Freitas JT, Zmina PM, Thakur VS, Chang M, Gao M, Tan J, Xiao M et al (2020) Targeting extracellular matrix remodeling restores BRAF inhibitor sensitivity in BRAFi-resistant Melanoma. *Clin Cancer Res* 26: 6039–6050
- McCall MN, Kim M-S, Adil M, Patil AH, Lu Y, Mitchell CJ, Leal-Rojas P, Xu J, Kumar M, Dawson VL et al (2017) Toward the human cellular microRNAome. *Genome Res* 27: 1769–1781
- Meeth K, Wang JX, Micevic G, Damsky W, Bosenberg MW (2016) The YUMM lines: a series of congenic mouse melanoma cell lines with defined genetic alterations. *Pigment Cell Melanoma Res* 29: 590–597
- Misek SA, Appleton KM, Dexheimer TS, Lisabeth EM, Lo RS, Larsen SD, Gallo KA, Neubig RR (2020) Rho-mediated signaling promotes BRAF inhibitor resistance in de-differentiated melanoma cells. *Oncogene* 39: 1466–1483
- Müller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, Kong X, Possik PA, Cornelissen-Steijger PDM, Foppen MHG et al (2014) Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 5: 5712
- Nazarian R, Shi H, Wang QI, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee M-K, Attar N, Sazegar H et al (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468: 973–977
- Orgaz JL, Crosas-Molist E, Sadok A, Perdrux-Rosell A, Maiques O, Rodriguez-Hernandez I, Monger JO, Mele S, Georgouli M, Bridgeman V et al (2020) Myosin II reactivation and cytoskeletal remodeling as a hallmark and a vulnerability in melanoma therapy resistance. *Cancer Cell* 37: 85–103.e109
- Poli V, Secli L, Avalle L (2020) The microRNA-143/145 cluster in tumors: a matter of where and when. *Cancers (Basel)* 12: 708
- Pottier N, Cauffiez C, Perrais M, Barbry P, Mari B (2014) FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 35: 119–126
- Rambow F, Rogiers A, Marin-Bejar O, Aibar S, Femel J, Dewaele M, Karras P, Brown D, Chang YH, Debiec-Rychter M et al (2018) Toward minimal residual disease-directed therapy in melanoma. *Cell* 174: 843–855.e819
- Rambow F, Marine JC, Goding CR (2019) Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev* 33: 1295–1318
- Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Ben Jouira R, Garcia E, Larbret F, Gesson M, Audebert S, Lacour JP et al (2019) Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 38: 5873–5889
- Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, Chiarion Sileni V, Schachter J, Garbe C, Bondarenko I et al (2019) Five-year outcomes with dabrafenib plus trametinib in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 381: 626–636
- Savary G, Dewaeles E, Diazzi S, Buscot M, Nottet N, Fassy J, Courcot E, Henaoui IS, Lemaire J, Martis N et al (2019) The long noncoding RNA DNMT3OS is a reservoir of fibromirs with major functions in lung fibroblast response to TGF-beta and pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 200: 184–198
- Scott K, Nogueira C, Heffernan T, van Doorn R, Dhakal S, Hanna J, Min C, Jaskelioff M, Xiao Y, Wu C-J et al (2011) Proinvasion metastasis drivers in early-stage melanoma are oncogenes. *Cancer Cell* 20: 92–103
- Shain AH, Bastian BC (2016) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 16: 345–358
- Shen S, Faouzi S, Bastide A, Martineau S, Malka-Mahieu H, Fu YU, Sun X, Mateus C, Routier E, Roy S et al (2019) An epitranscriptomic mechanism underlies selective mRNA translation remodelling in melanoma persister cells. *Nat Commun* 10: 5713
- Song C, Piva M, Sun LU, Hong A, Moriceau G, Kong X, Zhang H, Lomeli S, Qian J, Yu CC et al (2017) Recurrent tumor cell-intrinsic and -extrinsic alterations during MAPKi-induced melanoma regression and early adaptation. *Cancer Discov* 7: 1248–1265
- Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJE, Prahallad A, Robert C, Haanen J, Blank C, Wesseling J, Willems SM et al (2014) Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508: 118–122
- Titz B, Lomova A, Le A, Hugo W, Kong X, ten Hoeve J, Friedman M, Shi H, Moriceau G, Song C et al (2016) JUN dependency in distinct early and late BRAF inhibition adaptation states of melanoma. *Cell Discov* 2: 16028
- Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, Wong DJL, Atefi M, Shirazi R, Wang X et al (2018) Multi-stage differentiation defines melanoma subtypes with differential vulnerability to drug-induced iron-dependent oxidative stress. *Cancer Cell* 33: 890–904.e895
- Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, Wubbenhorst B, Xu X, Gimotty PA, Kee D et al (2010) Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 18: 683–695
- Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, Kolb M (2015) Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 45: 1434–1445
- Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2009) MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev* 23: 2166–2178
- Yang S, Cui H, Xie N, Icyuz M, Banerjee S, Antony VB, Abraham E, Thannickal VJ, Liu G (2013) miR-145 regulates myofibroblast differentiation and lung fibrosis. *FASEB J* 27: 2382–2391



License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.