N° d'ordre NNT :
2016LYSE1279

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N° ED 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat :
Génétique, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue publiquement le 15/12/2016, par :

Gweltaz AGAËSSE

Identification des régulateurs de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 impliqués dans l'invasion précoce du mélanome cutané

Devant le jury composé de :

Le Guellec, Dominique	PhD/Pr	IBCP UMS 3760/UCBL Lyon1	Président
Le Naour, François	PhD/DR2	U785/INSERM	Rapporteur
Delmas, Véronique	PhD/DR2	UMR3347 Institut Curie / CNRS	Rapporteure
Degoul, Françoise	PhD/CR1	UMR0990/INSERM	Examinatrice
Masse, Ingrid	PhD/MCF	CRCL UMR1052/1586/ UCBL Lyon1	Directrice de thèse

VERSION EXPURGÉE – LA VERSION COMPLÈTE QUI INCLUE LES ARTICLES SOUMIS AUX COPYRIGHTS DES MAISONS D'ÉDITION EST DISPONIBLE SUR L'INTRANET DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

RÉSUMÉ

De toutes les affections de la peau, le mélanome cutané est la pathologie la plus meurtrière. Afin de pouvoir être traité efficacement, ce cancer nécessite un diagnostic et une exérèse chirurgicale précoce des lésions primitives non-invasives. En effet, le mélanome possède une forte propension à disséminer dans de nombreux organes, et bien que les nouvelles thérapies développées permettent une amélioration globale de la survie des patients, des résistances aux traitements se développent rapidement. Les patients voient ainsi leurs chances de survie chuter drastiquement lorsqu'ils sont atteints de métastases. Aussi, il est crucial pour lutter contre ce cancer de découvrir de nouvelles pistes thérapeutiques, d'autant que le diagnostic du mélanome survient parfois tardivement et n'est pas toujours évident à poser selon le type de mélanome considéré.

Le mélanome se développe suite à la transformation maligne des mélanocytes responsables de la pigmentation de la peau. Les cellules tumorales prolifèrent tout d'abord de façon anarchique dans l'épiderme, mais avec la progression du mélanome, certaines cellules acquièrent un potentiel invasif. Elles peuvent alors dégrader la lame basale de l'épiderme appelée jonction dermo-épidermique (JDE), et envahir le derme. Les vaisseaux sanguins et lymphatiques présents dans le derme permettent alors aux cellules tumorales de disséminer à distance.

Ainsi, le franchissement de la JDE est la première étape de l'invasion précoce qui mène à la dissémination métastatique du mélanome cutané.

Grâce à un modèle de cellules humaines de mélanome qui mime la transition d'un phénotype prolifératif vers un phénotype invasif, l'équipe a précédemment identifié la protéine TSPAN8 comme un acteur clé de l'invasion précoce du mélanome cutané. TSPAN8 fait partie de la famille des tétraspanines dont plusieurs membres sont déjà connus pour leurs implications dans la progression de plusieurs cancers. Dans le cas de TSPAN8, l'équipe a montré pour la première fois son implication dans la progression du mélanome, puisque l'expression transcriptionnelle et protéique du gène TSPAN8 est absente de la peau et apparait lors de la progression du mélanome, ce qui confère un phénotype invasif aux cellules.

En effet, l'expression de TSPAN8 dans des cellules de mélanome permet l'invasion du derme après la dégradation de la JDE dans un modèle de peau humaine reconstruite. *In vivo,* lors de xénogreffes chez la souris nude, l'expression de TSPAN8 permet une plus forte tumorigénicité ainsi qu'un plus fort potentiel métastatique des cellules de mélanome.

Ainsi, le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a pour but d'identifier les premiers régulateurs de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires agissant lors de l'invasion précoce du mélanome cutané.

Pour cela, nous avons criblé 150 gènes impliqués dans les processus métastatiques grâce à une technologie novatrice de criblage basée sur l'interférence à l'ARN et sur une construction rapportrice GFP. Cela nous a permis de mesurer l'impact de l'inhibition de ces gènes sur l'activité transcriptionnelle du promoteur fonctionnel de TSPAN8 en mesurant les variations de fluorescence des cellules de mélanome.

En étudiant certains des régulateurs identifiés, nous avons pu montrer *in vitro* que l'invasion dépendante de TSPAN8 dans le mélanome cutané est favorisée par l'expression de β-caténine et de LCMR1/MED19, un membre du complexe Mediator. À l'inverse, l'expression du suppresseur de tumeur p53 inhibe l'invasion en réprimant l'expression de TSPAN8. Nous montrons également que la transcription de TSPAN8 est régulée directement par le recrutement de p53 et β-caténine sur son promoteur.

De plus, l'analyse des prélèvements de tissus effectués sur des patients révèle que l'expression protéique de LCMR1 et celle de TSPAN8 sont colocalisées *in situ* dans les tumeurs primaires, alors que dans les métastases, une forte expression de l'ARNm LCMR1 corrèle avec une forte expression de l'ARNm TSPAN8.

De façon intéressante, l'expression de LCMR1 et celle de TSPAN8 sont inhibées *in vitro* lors du traitement des cellules au Vemurafenib, une drogue utilisée en thérapie ciblée chez les patients pour inhiber la MAPK BRAF qui est mutée dans plus de 50% des mélanomes. Ceci suggère que TSPAN8 et LCMR1 pourraient être des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement du mélanome.

Les résultats obtenus grâce à ces travaux permettent de mieux comprendre les mécanismes qui mènent à l'apparition de l'expression de TSPAN8, donc au phénotype invasif dépendant de cette protéine dans le mélanome cutané. Sur le long terme, ces résultats, ainsi que l'étude des autres gènes identifiés grâce au criblage permettront une meilleure compréhension de l'invasion précoce du mélanome cutané. Ainsi, ces travaux devraient permettre l'identification de nouveaux marqueurs de pronostic et de nouvelles pistes thérapeutiques pour lutter plus efficacement contre le mélanome. De plus, une meilleure compréhension de la régulation de TSPAN8 sera très certainement précieuse pour lutter contre les autres pathologies dans lesquelles TSPAN8 est impliquée telle que les cancers du système digestif (côlon, estomac, œsophage, foie, pancréas), mais également les cancers de l'ovaire, de la prostate et le glioblastome.

Mots clés : Cancer, Mélanome cutané, Invasion, TSPAN8, Tétraspanine, Régulation transcriptionnelle, Criblage haut débit, Biologie moléculaire

ABSTRACT

Of all skin conditions, cutaneous melanoma is the deadliest disease. Treating efficiently this cancer requires an early surgical resection of non-invasive primary lesions. This is due to the high propensity of melanoma to disseminate in many organs, as well as the quick development of treatment resistances within melanoma lesions. The survival chances of patients with invasive melanoma are much lower. Hence, to fight this cancer it is crucial to discover new therapeutic approaches, especially since melanoma is not always easy to diagnose early enough.

Melanoma develops in the wake of the malignant transformation of melanocytes that pigment the skin. Tumor cells initially proliferate in the epidermis. But with melanoma progression some cells acquire an invasive potential. They may then degrade the basal lamina of the epidermis known as dermal-epidermal junction (DEJ), and invade the dermis. In the dermis, the blood and lymph vessels allow tumor cells for a rapid remote metastatic dissemination.

Thus, crossing the DEJ is the first step of cutaneous melanoma early invasion which leads to metastasis.

Using a model of human melanoma cells that mimics the transition from a proliferative phenotype to an invasive phenotype, the team previously identified the protein TSPAN8 as a key factor in the early invasion of cutaneous melanoma. TSPAN8 is a member of the tetraspanin family. Several members of this family are already known for their involvement in the progression of several cancers. The team showed for the first time the involvement of TSPAN8 in melanoma progression. Indeed, the transcriptional and protein expression of the gene TSPAN8 is absent in the skin and appears with melanoma progression, conferring the cells an invasive phenotype.

Indeed, TSPAN8 expression in melanoma cells allows the invasion of the dermis after degradation of the DEJ in a model of human skin reconstruct. *In vivo,* the expression of TSPAN8 allows for a higher tumorigenicity and a stronger metastatic potential of melanoma cells xenografted in nude mice.

Therefore, the aim of the present thesis was to identify the first regulators of TSPAN8 transcriptional expression in order to better understand the molecular mechanisms that underlie the early invasion of cutaneous melanoma.

We have screened 150 genes known to be involved in metastatic processes through an innovative screening technology based on RNA-interference and on a GFP reporter construct. This allowed us to measure the impact of the inhibition of these genes on the TSPAN8 functional promoter transcriptional activity by measuring the fluorescence variation of the transfected melanoma cells.

The study of some screen-identified regulators allowed us to show that cutaneous melanoma TSPAN8-dependent invasion is increased *in vitro* by the expression of β-catenin and LCMR1/MED19, which is a member of the mediator complex. On the opposite, the expression of the tumor suppressor p53 inhibits the invasion induced by the expression of TSPAN8. We also show that TSPAN8 is directly regulated by the recruitment of p53 and β-catenin on its promoter.

Analysis of patient tissue samples revealed that the protein expressions of LCMR1 and TSPAN8 are correlated *in situ* in tumor tissue samples, whereas in metastasis a high expression of LCMR1 mRNA correlates with a high expression of TSPAN8 mRNA. Interestingly, we also report that the expressions

of LCMR1 and TSPAN8 are inhibited *in vivo* when cells are treated with Vemurafenib, a drug used as a targeted therapy in patients to inhibit the MAPK BRAF which is mutated in over 50% of melanomas.

The results obtained with this work provide new insights into the mechanisms that lead to the onset of TSPAN8 expression, hence to the invasive phenotype induced by this protein in cutaneous melanoma. In the long term, these results, as well as the study of the other TSPAN8 regulators identified through the screening, should allow for a better understanding of the mechanisms of cutaneous melanoma early invasion. We hope that this work will *in fine* lead to the identification of new prognostic markers as well as new therapeutic approaches to treat melanoma more efficiently. Finally, a better understanding of TSPAN8 regulation will certainly be beneficial in the study of other pathologies in which TSPAN8 is involved such as the cancers of the digestive system (colon, stomach, esophagus, liver, pancreas), but also in the ovarian and prostatic cancers as well as the glioblastoma.

Key words: Cancer, Cutaneous melanoma, Invasion, TSPAN8, Tetraspanin, Transcriptional regulation, High throughput screening, Molecular biology.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements **7**

Liste Des Abréviations **9**

Liste Des Illustrations **13**

1 : Liste des Figures 13

2 : Liste des Tableaux 14

3 : Liste des Figures et Tableaux des Publications 15

3.1.1 : Partie I : Un criblage haut débit par interférence à l'ARN identifie LCMR1 comme un régulateur de l'invasion dépendante de TSPAN8 par le mélanome cutané 15

3.1.2 : Partie II : p53 inhibe l'invasion induite par TSPAN8 dans les cellules de mélanome 15

3.1.3 : Annexe 2 : Revue : Les tétraspanines dans la physiopathologie de la peau 15

Introduction Générale **17**

Rappel Bibliographique **19**

Partie I : Du mélanocyte au mélanome cutané **21**

1 : La peau: 22

2 : Le mélanocyte 24

2.1 : L'origine des mélanocytes 24

2.2 : La fonction du mélanocyte cutané : la pigmentation de l'épiderme 24

2.3 : La régulation du mélanocyte 27

3 : Le mélanome 31

3.1 : Facteurs de risque 31

3.1.1 : Facteurs de risques environnementaux 31

3.1.2 : Facteurs de risques intrinsèques 32

3.2 : Les différents types histo-cliniques de mélanomes cutanés 33

3.2.1 : Mélanome superficiel extensif 33

3.2.2 : Mélanome Nodulaire 34

3.2.3 : Mélanome Lentigineux 34

3.2.4 : Mélanome Lentigineux Acral 34

3.3 : Épidémiologie 34

3.4 : Prévention 36

3.5 : Critères de pronostic 37

3.5.1 : Niveau d'invasion de Clark et Mihm 37

3.5.2 : Classification Tumeur - Ganglion (Node) - Métastase (TNM) 38

3.6 : Physiopathologie du mélanome 39
3.6.1 : Le modèle classique de la progression du mélanome 39
3.6.2 : Les autres modèles de la progression du mélanome 39
3.7 : Traitement du mélanome 42
3.7.1 : Chirurgie 42
3.7.2 : Chimiothérapie : Dacarbazine / Fotémustine 42
3.7.3 : Immunothérapies 42
3.7.4 : Les thérapies ciblées 43
3.7.5 : Les combinaisons de traitements. 44
Partie II : Génétique du mélanome 49
1 : MITF 50
1.1 : Le gène MITF et ses isoformes 50
1.2 : Régulation de l'expression de MITF 50
1.3 : Régulation de l'activité de MITF 51
1.4 : Fonction de MITF dans le mélanocyte 51
1.5 : Rôle de MITF dans le mélanome 52
2 : Les voies des MAPK 53
2.1 : La voie NRAS/BRAF/MEK/ERK dans le mélanome 54
2.1.1 : NRAS dans le mélanome 54
2.1.2 : BRAF dans le mélanome 54
2.1.3 : Effet de la suractivation de la voie NRAS/BRAF/MEK/ERK dans le mélanome 55
2.1.4 : L'activation de ERK et les modifications de la Matrice extracellulaire (MEC) 56
3 : La voie PI3K / PTEN / AKT 59
3.1 : PI3K 60
3.2 : PTEN 60
3.3 : AKT 60
3.4 : La voie PI3K / PTEN / AKT dans le mélanome 61
4 : La β-caténine 64
4.1 : Structure de la β-caténine 64
4.2 : Localisations, régulations et fonctions de β-caténine 65
4.3 : Implication de β-caténine dans le mélanome 70
4.3.1 : Rôles de β-caténine dans le mélanome chez l'homme et dans les modèles cellulaire de mélanomes humains : 70
4.3.2 : Rôle de β-caténine dans les modèles murins de mélanomes : 74
5 : Le suppresseur de tumeur p53 75
5.1 : Structure de p53 75
5.2 : Régulation de l'expression transcriptionnelle et traductionnelle de p53 76
5.3 : Régulation de l'activité de p53 76
5.4 : Implication de p53 dans le mélanome 78

Partie III : Les tétraspanines 83

1 : La structure des tétraspanines 84

2 : La localisation et la distribution des Tétraspanines 85

3 : Les réseaux tétraspanines (« Tetraspanin webs ») 85

4 : Les tétraspanines et le cancer 87
4.1 : CD9 87
4.2 : CD82 88
4.3 : CD151 89
4.4 : TSPAN12 90
4.5 : TSPAN8 91
4.6 : Implication des interactions tétraspanine-tétraspanine dans le cancer 93

5 : Les tétraspanines dans le mélanome cutané 95
5.1 : CD63 dans le mélanome 95
5.2 : CD9 dans le mélanome 95
5.3 : CD82 dans le mélanome 96
5.4 : CD151 dans le mélanome 96
5.5 : Interactions de CD9 et CD81 dans le mélanome 97
5.6 : TSPAN8 dans le mélanome 98

6 : Régulation transcriptionnelle des tétraspanines 99

Objectifs des travaux 103

Travaux 105

Partie I : Un criblage haut débit par interférence à l'ARN identifie LCMR1 comme un régulateur de l'invasion dépendante de TSPAN8 par le mélanome cutané 107

Partie II : p53 inhibe l'invasion induite par TSPAN8 dans les cellules de mélanome 111

Partie III : β-caténine promeut l'invasion des cellules de mélanome en favorisant l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 125

1 : Introduction 125

2 : Matériel & Méthodes 126
2.1 : Lignées cellulaires et culture 126
2.2 : Transfections transitoires 126
2.3 : Tests luciférase 126
2.4 : Extraction d'ARN et rétro-transcription 127
2.5 : PCR quantitative en temps réel (qPCR) 127
2.6 : Immuno précipitation de chromatine (ChIP) 128
2.7 : Western Blots 128
2.8 : Tests d'invasion de Matrigel™ en chambres de Boyden 129
2.9 : Comptage des cellules invasives 129
2.10 : Analyses statistiques 129

3 : Résultats 130
3.1 : β-caténine favorise l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 130
3.2 : β-caténine est recrutée sur les sites TCF/LEF du promoteur de TSPAN8 et régule son activité transcriptionnelle 131

3.3 : β-caténine favorise l'invasion dépendante de TSPAN8 par les cellules de mélanome... 134
3.4 : L'inhibition de l'expression de β-caténine et de LEF1 n'influe pas l'évolution du nombre de cellules en culture sur 96h... 135
3.5 : L'inhibition de p53 favorise l'expression de β-caténine... 136

4 : Conclusion... 137

DISCUSSION GÉNÉRALE... 139

1 : LCMR1 favorise l'invasion TSPAN8-dépendante dans le mélanome... 141

2 : p53 inhibe l'invasion TSPAN8-dépendante dans le mélanome... 142

3 : β-caténine favorise l'invasion TSPAN8-dépendante dans le mélanome... 144

4 : Bilan de l'étude fonctionnelle de la régulation de TSPAN8 par LCMR1, p53 et β-caténine : ... 146

5 : Les autres régulateurs identifiés par le crible... 148
5.1 : PTEN inhibe l'expression transcriptionnelle de TSPAN8... 148
5.2 : IQGAP1 inhibe l'expression transcriptionnelle TSPAN8... 149

6 : Modèle hypothétique de la régulation de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 par LCMR1, p53, β-caténine, PTEN, IQGAP1 et la voie BRAF... 150

Conclusion... 152

Annexes... 153

1 : L'inhibition de p53 par siARN favorise la prolifération des cellules de mélanome T1C3 et IC8... 154

2 : Revue : Les tétraspanines dans la physiopathologie de la peau... 156

Références Bibliographiques... 157

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord exprimer ma très grande gratitude à l'ensemble des membres de mon jury de thèse : Dominique Le Guellec, François Le Naour, Véronique Delmas, Françoise Degoul, et Ingrid Masse pour avoir accepté de m'accorder le temps et l'attention nécessaires à l'évaluation de mon travail.

Je tiens également à remercier particulièrement :

- *Guy Mouchiroud pour m'avoir permis de réaliser ma thèse et mes stages de master au sein de son unité, le GCPhiMC UMR5534.*
- *Jérôme Lamartine pour m'avoir accueilli dans son équipe pour mon master et ma thèse.*
- *Ingrid Masse et Odile Berthier-Vergnes pour m'avoir soutenu durant ces années et guidé dans mes travaux de thèse, mais aussi pour m'avoir permis de m'accomplir à travers la rédaction de ce manuscrit.*
- *L'équipe de Xavier Gidrol du CEA à Grenoble pour leur précieuse collaboration dans la réalisation du criblage des régulateurs de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8.*
- *Françoise Degoul et son équipe pour les expériences de Xénogreffes réalisées chez la souris.*
- *Aleth Callé pour sa grande disponibilité et ses conseils techniques avisés.*
- *Les membres des différentes équipes pédagogiques avec lesquelles j'ai eu l'opportunité et le plaisir de travailler dans le cadre de mon activité complémentaire d'enseignement.*
- *Les membres des services et des équipes des formations transversales des doctorants de l'Université de Lyon.*

Merci également pour l'atmosphère de travail agréable et tous les moments passés en votre compagnie :

- *Toutes les personnes qui sont passées par l'équipe : Jean-André, Manale, Nicolas, Choua, Aurora, Charlotte, Dounia, Morgane, Hélène et Margot.*
- *Mes collègues et amis doctorants et post doctorants des autres équipes.*
- *Ainsi que les autres membres du CGPhiMC et de l'INMG que je n'ai pas cité ici.*

Je remercie aussi chaleureusement :

L'ensemble des membres de l'association BioDocs Lyon et du réseau BIOTechno pour tout le temps que nous avons investis ensemble pour nos divers accomplissements associatifs, et pour tous ces moments agréables.

Enfin, « last but definitely not least » je tiens à remercier mes amis, les membres de ma famille et Céline ma compagne de m'avoir soutenu (et supporté ;) durant ces 3 années☺.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCB5	**A**TP-**B**inding **C**assette sub-family **B** member **5** also known as P-glycoprotein ABCB5
ACTN1	**Actin**in alpha **1**
ACTH	**A**dreno**C**ortico**T**ropic **H**ormone
ADAM	**A** **D**isintegrin **A**nd **M**etalloproteinase domain
AJCC	**A**merican **J**oint **C**ommittee on **C**ancer
αMSH	**M**elanocyte-**S**timulating **H**ormone
APC	**A**denomatous **P**olyposis **C**oli,
ARM	**ARM**adillo
ARF6	**A**DP **R**ibosylation **F**actor **6**
ATF	cyclic **A**MP-dependent **T**ranscription **F**actor
AKT	AKT serine/threonine kinase 1 *Egalement appelé **PKB** : **P**rotéine **K**inase B*
BAX	**B**CL-2 **A**ssociated **X** protein
bFGF	**b**asic **F**ibroblast **G**rowth **F**actor
BCAR1	**B**reast **C**ancer **A**nti-estrogen **R**esistance **1**
BCL2	**B**-**C**ell **L**ymphoma **2**
BRAF	v-**RAF** murine sarcoma viral oncogene homolog **B**
CAM	**C**ell **A**dhesion **M**olecule
CAV1	**Cav**éoline 1
CBP	**C**REB-**B**inding **P**rotein
CDK	**C**yclin **D**ependant **K**inase
CDKN2A	**C**yclin-**D**ependent **K**inase inhibitor **2A**
CK1	**C**asein **K**inase **1**
CREB	**c**AMP **R**esponse **E**lement **B**inding-protein
CTLA4	**CTL** **A**ntigen **4**
CTNNB1	**C**a**t**e**n**i**n** **B**eta **1**
CXCL8	**C-X-C** motif chemokine **L**igand **8**
DARC	**D**uffy **A**ntigen **R**eceptor for **C**hemokines
DCT	**D**opa**C**hrome **T**automerase
DIAPH1	**Diaph**anous homolog **1**
DHICA	5,6-**Di**h**y**droxy**i**ndole-2-**C**arboxylic **A**cid
DKK	**D**ic**kk**opf
DVL	**D**ishe**v**e**l**led
EGRF	**E**pithelial **G**rowth **F**actor **R**eceptor
EMT	**T**ransition **E**pithélio **M**ésanchymateuse
ERK	**E**xtracellular signal-**R**egulated **K**inase
ET1	**E**ndo**t**héline **1**
FAK	**F**ocal **A**dhesion **K**inase
FASL	**FAS** **L**igand
FGF	**F**ibroblast **G**rowth **F**actor
FGFR	**F**ibroblast **G**rowth **F**actor **R**eceptor
FZD	**F**ri**z**zle**d**
GEF	**G**DP **E**xchange **F**actor
GFP	**G**reen **F**luorescent **P**rotein
GM	**G**anglioside **M**onosialique
GRB2	**G**rowth factor **R**eceptor **B**ound protein **2**
GSK3β	**G**lycogen **S**ynthase **K**inase **3** **B**eta
HGF	**H**epatocyte **G**rowth **F**actor
HGFR	**H**epatocyte **G**rowth **F**actor **R**eceptor

HIF1α **H**ypoxia-**I**nducible **F**actor **1** **alpha**
HMG **H**igh **M**obility **G**roup
HZF **H**ematopoietic **Z**inc **F**inger
ICAT **I**nhibitor of β-**Cat**enin **A**nd **T**CF
IDC **I**nvasive **D**uctal **C**arcinoma
IGF **I**nsulin-like **G**rowth **F**actor
IGFR **I**nsulin-like **G**rowth **F**actor **R**eceptor
IL8 **I**nter**L**eukine **8**
ILC **I**nvasive **L**obular **C**arcinoma
IRES **I**nternal **R**ibosome **E**ntry **S**ites
ITGAV **I**n**t**e**g**rin subunit **A**lpha **V**
IQGAP1 **IQ** motif containing **GT**Pase **A**ctivating **P**rotein **1**
IQSEC1 **IQ** motif and **Sec**7 domain **1**
JDE **J**onction **D**ermo-**E**pidermique
JNK c-**J**un **N**-terminal **K**inase
LCMR1 **L**ung **C**ancer **M**etastasis-**R**elated protein **1**
LDH **L**actate **D**és**H**ydrogénase
LEF1 **L**ymphoid **E**nhancer-Binding **F**actor **1**
LLC **L**ewis-**L**ung **C**arcinoma
LOH **L**oss **o**f **H**eterozygosity
MAPK **M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inases
MCL1 induced **M**yeloid **L**eukemia **C**ell differentiation protein **1**
MC1R **M**elano**C**ortin **1** **R**eceptor
MDM2 **M**ouse **D**ouble **M**inute **2** homolog
MDM4 **M**ouse **D**ouble **M**inute **4** homolog
MEC **M**atrice **E**xtra-**C**ellulaire
MED<n> Sous-unité « n » du complexe **Med**iator
MEK **M**itogen-activated protein **K**inase
MITF **MI**crophtalmia associated **T**ranscription **F**actor
MMPn **M**atrix **M**etallo**P**rotease <n>
MRP-1 **M**otility **R**elated **P**rotein **1**
MSH **M**elanocyte **S**timulating **H**ormone
mTOR **m**ammalian **T**arget **O**f **R**apamycin
NES **N**uclear **E**xport **S**equence
NDRG1 **N**-Myc **D**ownstream **R**e**g**ulated **1**
NGA **N**euro**g**landular **A**ntigen
NLS **N**uclear **L**ocalization **S**equence
NME1 **N**ucleoside diphosphate kinase A
NRAS **N**euroblastoma **RAS** viral oncogene homolog
PCR **P**olymerase **C**hain **R**eaction
PDKn **P**hosphoinositide-**D**ependent **K**inase-<n>
PDGF **P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor
PERP **p**53 apoptosis **E**ffector **R**elated to **P**MP-22
PH **P**leckstrin **H**omology
PI3K **P**hospho**I**nositide **3**-**K**inase
PIG3 **p**53 **I**nducible **G**ene **3**
PIP2 **P**hospho**i**nositol bi **P**hosphate
PIP3 **P**hosphoinositol tri **P**hosphate
PKA **P**rotein **K**inase **A**
PMEL **P**re**MeI**anosome protein
POMC **P**ro-**O**pio**M**élano**C**ortine
PTEN **P**hosphatase and **T**ensin Homolog

PUMA	**p**53 **U**pregulated **M**odulator of **A**poptosis
RBP	**R**ecombining **B**inding **P**rotein
RCPG	**R**écepteur **C**ouplé aux **P**rotéines **G**
RGP	**R**adial **G**rowth **P**hase
ROCK	**R**ho-associated protein **K**inase
RTK	**R**écepteur à **T**yrosine **K**inase
RXFP1	**R**elaxin/insulin like **F**amily **P**eptide receptor **1**
SATB1	**S**pecial **AT**-rich sequence-**B**inding protein **1**
SCF	**S**tem **C**ell **F**actor
SH2	**S**RC **H**omology domain **2**
SOS	**S**on **O**f **S**evenless
SSM	**S**uperficial **S**preading **M**elanoma
TBX2	**T**-**B**o**x** transcription factor **2**
TEM	**T**etraspanin **E**nriched **M**icrodomains
TCFn	**T**ranscription **F**actor <n>
TGFβ	**T**ransforming **G**rowth **F**actor beta 1
TNC	**T**e**n**ascine**C**
TNM	**T**umor – **N**ode - **M**etastase
TPT1	**T**umor **P**rotein, **T**ranslationally-Controlled **1**
TSPANn	**T**etra**span**ine <**n**>
TSS	**T**ranscription **S**tart **S**ite
TYRP1	**Ty**rosinase-**R**elated **P**rotein **1**
VEGF	**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor
VEGFR	**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor **R**eceptor
VGP	**V**ertical **G**rowth **P**hase
WNT	**W**ingless integration site

LISTE DES ILLUSTRATIONS

1 : Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une section de peau, avec un zoom sur la région épidermique. ... 23

Figure 2 : Représentation schématique d'une unité de mélanisation. ... 24

Figure 3 : Photos en microscopie électronique de mélanosomes représentant les 4 stades de maturation des eumélanosomes. ... 25

Figure 4 : Photo de microscopie qui montre les chapes de mélanines au-dessus des noyaux des kératinocytes de la lame basale. ... 25

Figure 5 : Représentation schématique de la synthèse des deux types de mélanines et des principales enzymes impliquées. ... 26

Figure 6 : Représentation schématique du niveau de pénétration des Rayons UV dans l'atmosphère et dans la peau. ... 27

Figure 7 : Résumé schématique des régulations de l'activité mélanocytaire. ... 29

Figure 8 : Carte mondiale de l'incidence (bleu) et de la mortalité (en rouge) du mélanome cutané en 2012. 35

Figure 9 : Représentation schématique des niveaux d'invasion de Clark et Mihm. ... 37

Figure 10 : Représentation schématique des phases de progression du mélanome cutané. ... 39

Figure 11 : Mise en évidence du potentiel de « cellule souche tumorale » par xénogreffe de sous-populations tumorales. ... 40

Figure 12 : Comparaison des modèles de progression tumorale du mélanome. ... 41

Figure 13 : Un traitement combinant Dabrafenib et Trametinib permet l'amélioration de la survie (A) et l'inhibition de la progression (B) par rapport au traitement par le Vemurafenib seul. ... 44

Figure 14 : Courbes de « Kaplan-Meier » de survie sans progression des patients atteints de mélanome qui sont traités par l'Ipilimumab + Dacarbazine (A) ou par le Vemurafenib (B). ... 44

Figure 15 : Représentation schématique des courbes de survie « Kaplan-Meier » hypothétiques représentant l'intérêt théorique des combinaisons thérapeutiques. ... 45

Figure 16 : Représentation schématique des neuf isoformes de MITF. ... 50

Figure 17 : Représentation schématique simplifiée de la voie ERK, des rétrocontrôles négatifs et des principaux traitements utilisés pour inhiber cette voie dans le traitement du mélanome ... 53

Figure 18 : Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K / PTEN / AKT. ... 59

Figure 19 : Représentation schématique simplifiée de la structure protéique de β-caténine. ... 64

Figure 20 : Représentation schématique simplifiée des différentes interactions et localisations de β-caténine. ... 66

Figure 21 : Les facteurs de transcription de la famille de p53. ... 75

Figure 22 : Représentation schématique des différentes voies activées par p53. ... 77

Figure 23 : Représentation schématique de la structure moléculaire commune aux protéines de la famille des tétraspanines. ... 84

Figure 24 : Prédiction des sites de fixation des facteurs TCF/LEF dans la séquence promotrice fonctionnelle de TSPAN8. ... 125

Figure 25 : Représentation schématique d'une expérience d'invasion sur Matrigel™ en chambre de Boyden. 129
Figure 26 : β-caténine et LEF1 favorisent l'expression de TSPAN8 au niveau de l'ARNm et de la protéine. ... 130
Figure 27 : Représentation schématique des sites de fixation prédits pour β-caténine sur la séquence promotrice de TSPAN8. 131
Figure 28 : Enrichissement comparatif des séquences amont et aval du promoteur de TSPAN8 lors de l'immuno précipitation de la chromatine par un anticorps anti β-caténine. 132
Figure 29 : L'expression ectopique de β-caténine stimule l'activité transcriptionnelle du promoteur de TSPAN8. 133
Figure 30 : La surexpression de β-caténine favorise l'activité transcriptionnelle du promoteur de TSPAN8, préférentiellement via la région aval du promoteur. 133
Figure 31 : L'inhibition de β-caténine et de LEF1 par siARN réprime le potentiel invasif des cellules de mélanome. 134
Figure 32 : La surexpression ectopique de β-caténine favorise l'invasion du Matrigel™ par les cellules de mélanome de façon dépendante de TSPAN8. 135
Figure 33 : L'évolution du nombre de cellules T1C3 en culture n'est pas influencée par l'inhibition de β-caténine et de LEF1. 135
Figure 34 : L'inhibition de p53 par siARN favorise l'expression transcriptionnelle et protéique de β-caténine. 136
Figure 35 : Modèle de la régulation de l'invasion dépendante de TSPAN8 dans le mélanome cutané. 147
Figure 36 : Modèle hypothétique global de la régulation de l'expression de TSPAN8 lors de la progression du mélanome. 151
Figure 37 : L'inhibition de p53 par siARN favorise l'augmentation du nombre de cellules de mélanome en culture. 155

2 : Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification des phototypes en fonction de la sensibilité cutanée à l'exposition solaire, accompagnée des conseils de protection. 32
Tableau 2 : Amorces utilisées pour les réactions de qPCR. 127
Tableau 3 : Cycles utilisés pour les réactions de qPCR. 127

3 : Liste des Figures et Tableaux des Publications

3.1.1 : Partie I : Un criblage haut débit par interférence à l'ARN identifie LCMR1 comme un régulateur de l'invasion dépendante de TSPAN8 par le mélanome cutané

Figure 1. Identification of TSPAN8 isoforms and TSPAN8 functional promoter.

Figure 2. High-content siRNA screen identified genes involved in TSPAN8 promoter modulation.

Figure 3. LCMR1 positively regulated endogenous TSPAN8 expression in invasive T1C3 melanoma cells.

Figure 4. LCMR1 and TSPAN8 decreased adhesion in invasive melanoma cells.

Figure 5. LCMR1 and TSPAN8 increased melanoma invasiveness and TSPAN8 expression promotes tumorigenicity in nude mice.

Figure 6. LCMR1 was overexpressed in primary melanoma lesions and expression correlated with that of TSPAN8 in those samples.

Figure 7. LCMR1 and TSPAN8 expression correlated in metastases.

Figure 8. TSPAN8 and LCMR1 expression can be target genes of PLX4032 inhibitor *in vitro.*

3.1.2 : Partie II : p53 inhibe l'invasion induite par TSPAN8 dans les cellules de mélanome

Figure 1 : TSPAN8 functional promoter and p53 expression in melanoma cells.

Figure 2 : p53 silencing in non-invasive and invasive melanoma cells increases TSPAN8 expression.

Figure 3 : p53 is recruited onto p53-consensus binding sites in TSPAN8 promoter and represses TSPAN8 expression.

Figure 4 : p53 modulates Matrigel™ invasion in invasive cells in a TSPAN8-dependent manner.

3.1.3 : Annexe 2 : Revue : Les tétraspanines dans la physiopathologie de la peau

Figure 1 : Représentation schématique de la structure moléculaire commune aux protéines de la famille des tétraspanines.

Figure 2 : Représentation schématique de l'expression des tétraspanines dans les kératinocytes et les mélanocytes de la couche basale de l'épiderme.

Tableau I : Expression et fonctions des tétraspanines dans les carcinomes cutanés.

Tableau II : Expression et fonctions des tétraspanines dans les mélanomes cutanés.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le mélanome cutané, la plus meurtrière des maladies de la peau, est un enjeu de santé publique majeur dans plusieurs pays. En effet, nous ne disposons à l'heure actuelle d'aucun traitement efficace contre les formes disséminées de ce cancer très agressif, et son incidence n'a fait que progresser durant les dernières décennies. Le mélanome résiste aux thérapies classiques, et les nouveaux traitements développés tels que le Vemurafenib ne permettent qu'une rémission temporaire pour la grande majorité des patients. Ainsi, le seul traitement efficace contre le mélanome reste à l'heure actuelle la résection chirurgicale des lésions détectées précocement, c'est-à-dire avant qu'il y ait eu dissémination de métastases à distance.

Le mélanome cutané se développe à partir de la transformation maligne des mélanocytes de la peau, le plus souvent suite à une exposition excessive aux rayonnements solaires, en particulier chez les patients présentant un phototype à risque, c'est-à-dire une peau claire qui bronze difficilement. Les mélanocytes sont localisés dans l'épiderme contre la lame basale de la peau appelée « jonction dermo-épidermique » et ont pour fonction de pigmenter la peau afin de protéger les cellules du stress cytotoxique causé par les rayonnements solaires. Lorsqu'il est transformé, le mélanocyte devient une cellule de mélanome et commence par proliférer *in situ* dans l'épiderme durant ce que l'on appelle la phase de croissance radiale. Mais avec la progression du mélanome, certaines cellules vont acquérir la capacité de dégrader la matrice extra-cellulaire de la jonction dermo-épidermique, et vont envahir le derme durant ce que l'on appelle la phase de croissance verticale. Cette transition vers une forme de mélanome invasif est une étape cruciale car elle rend possible la dissémination de métastases à distance puisque les cellules ont alors accès aux vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Les travaux menés dans le laboratoire sont centrés sur cette transition d'un phénotype de prolifération « *in situ* » vers un phénotype invasif. En particulier, nous étudions les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette transition afin de déterminer quels en sont les acteurs majeurs. Nous espérons ainsi identifier de nouveaux marqueurs pronostics et diagnostics, mais également de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Dans ce but, un modèle d'étude avait été mis en place grâce à deux lignées de cellules de mélanome humaines : une lignée invasive et une lignée non-invasive, toutes deux issues d'une même lignée parentale.

Les travaux précédents de l'équipe ont permis d'identifier grâce à ce modèle un nouvel acteur de l'invasion précoce du mélanome cutané : la Tétraspanine 8 (TSPAN8). Son expression est absente de la peau saine, mais apparait avec la progression du mélanome et confère aux cellules un phénotype invasif. Cette protéine codée par le gène TSPAN8 fait partie de la famille des tétraspanines, des protéines membranaires qui structurent des « réseaux tétraspanine » dont la fonction est de réguler les protéines partenaires impliquées dans divers processus biologiques cruciaux pour la cellule tels que l'adhérence et la transduction de signaux.

Comme l'expression de TSPAN8, tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau de la protéine, apparait dans la peau lors de la progression du mélanome vers un phénotype invasif, le but de ma thèse a été d'identifier les régulateurs de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8. Ce manuscrit est composé en premier lieu d'une introduction bibliographique non exhaustive sur le mélanome cutané, sur les mécanismes génétiques connus pour leurs implications dans le développement et la progression de cette maladie ; et sur les tétraspanines et TSPAN8 en particulier. Après la présentation des résultats obtenus, une discussion générale présente les hypothèses et les perspectives qu'offre ce travail.

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I : Du mélanocyte au mélanome cutané

Le mélanome cutané est une transformation maligne qui se développe à partir des mélanocytes, les cellules pigmentaires localisées dans l'épiderme qui protègent la peau de l'agression des rayonnements solaires.

Il s'agit du cancer cutané le plus mortel à travers le monde et son incidence est en constante augmentation depuis plusieurs décennies, en particulier chez les populations à peaux claires. La recrudescence des cas est majoritairement imputable aux expositions solaires excessives des populations à partir du plus jeune âge.

Le fort taux de mortalité est dû au fait que les lésions de mélanome sont résistantes aux traitements de référence, et possèdent une forte propension à disséminer des métastases à distance dans de nombreux organes. Bien que nous disposons aujourd'hui de traitements innovants tels que l'Ipilimumab (Inhibiteur de CTL-A4) qui permet chez certains patients une amélioration dans la durée ; et le Vemurafenib (inhibiteur de BRAF), qui permet un fort taux de réponse et une rémission très rapide de patients atteints de mélanomes porteurs d'une mutation BRAF, l'enjeu en matière de santé publique est loin d'être résolu. En effet, dans les 5 années qui suivent, la plupart des patients développent de nouvelles lésions résistantes à ces traitements, et décèdent rapidement.

Dans ce premier chapitre, nous étudierons l'évolution du mélanocyte sain dans la peau jusqu'au stade du mélanome malin.

1 : La peau:

La peau est un organe majeur de par son poids et sa surface, mais également de par les fonctions qu'elle remplit. En tant qu'enveloppe du corps, la peau constitue une barrière efficace contre la dessiccation et nous protège des agressions physiques, chimiques, mécaniques, mais aussi organiques grâce à la présence de cellules immunitaires telles que les cellules de Langerhans. La peau exerce également des fonctions sensorielles importantes, ainsi qu'une fonction de thermorégulation qui est essentielle puisque l'homme est une espèce homéotherme. Toutefois, ces différents aspects ne seront pas développés dans ce manuscrit.

Le maintien de ces fonctions dépend de la bonne intégrité des différentes structures de la peau qui sont illustrées en **Figure 1** :

Figure 1 (A):

- À l'interface avec le reste du corps la peau repose sur l'hypoderme, un tissu conjonctif richement vascularisé qui peut assurer de par sa teneur en tissu adipeux une protection thermique et mécanique, ainsi qu'un rôle de stockage de l'énergie sous forme de lipides.

- Sur l'hypoderme repose le derme, un tissu conjonctif innervé richement vascularisé avec une matrice extracellulaire riche en fibres protéiques qui confèrent à la peau sa résistance mécanique élastique et plastique. Le derme peut être subdivisé en 3 régions :

    - le derme profond en contact avec l'hypoderme et parfois difficile à distinguer du derme réticulaire sus-jacent.

    - le derme réticulaire constitué de fibres élastiques d'élaunine et de fibres de collagène denses en faisceaux.

    - le derme papillaire constitué de fibres de collagène plus lâches et de fibres élastiques d'oxytalane fines et perpendiculaire à la Jonction Dermo-Épidermique.

Figure 1 (B):

- **Sur le derme se trouve** l'épiderme, un épithélium pavimenteux pluristratifié kératinisé dont la lame basale est appelée Jonction Dermo-Épidermique (JDE). Le derme se divise en plusieurs couches : basale, épineuse, granuleuse, claire et cornée ; qui correspondent à différents degrés de maturation des kératinocytes.

  C'est dans l'épiderme, au sein de la couche kératinocytaire basale au contact de la JDE que sont localisés les mélanocytes.

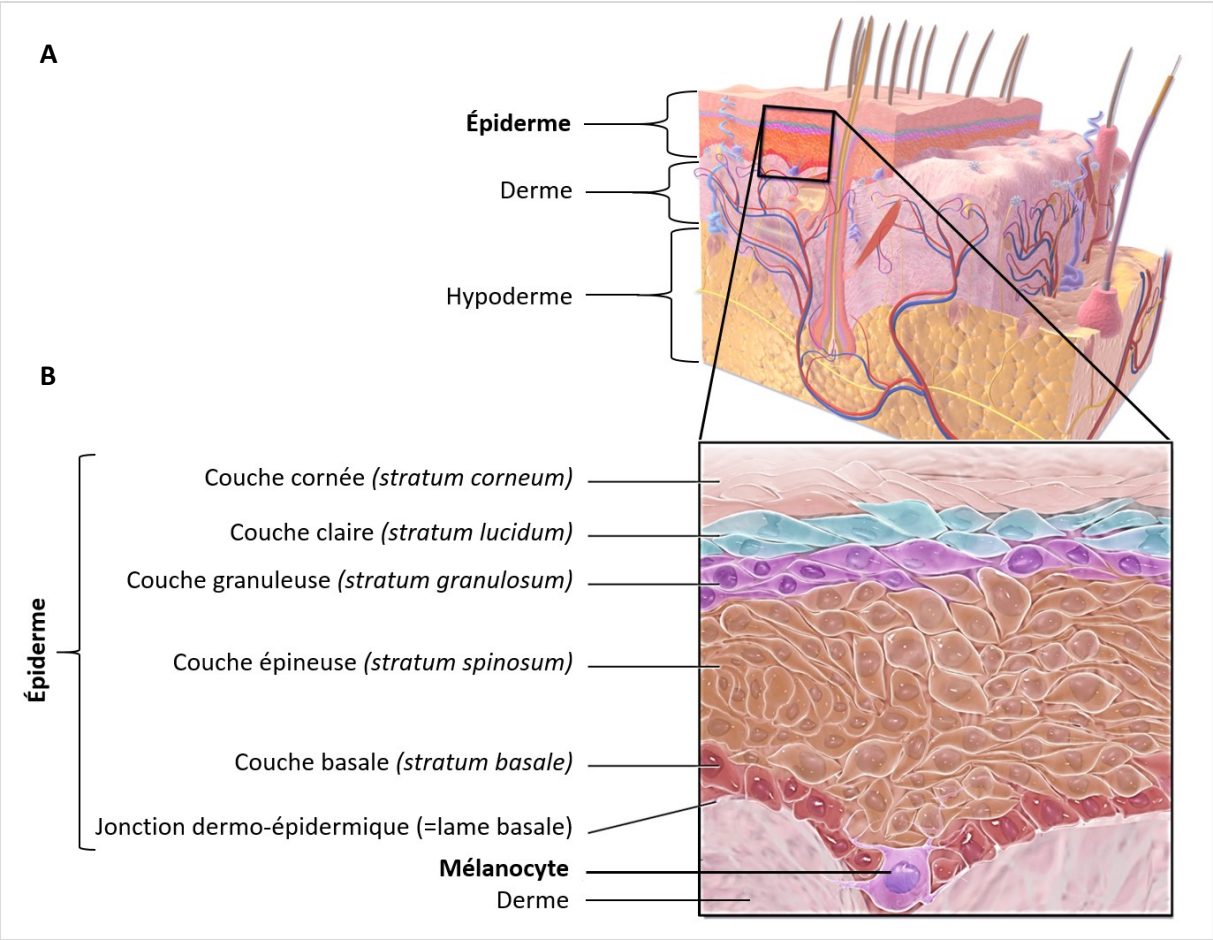


Figure 1 : Représentation schématique d'une section de peau, avec un zoom sur la région épidermique.

(A) : Les différentes couches de la peau sont représentées : l'hypoderme et le derme sont vascularisés. La jonction dermo-épidermique (JDE) sépare le derme de l'épiderme qui n'est pas vascularisé. **(B) :** L'agrandissement de l'épiderme permet de détailler les différentes couches qui le composent (basale, épineuse, granuleuse, claire et cornée ; *accompagnées de leurs noms latins*). Le mélanocyte est localisé dans la couche basale au contact de la JDE, et étend ses dendrites pour mélaniser les kératinocytes de son unité de mélanisation.
(Source : https://en.wikipedia.org/wiki/Epidermis#/media/File:Blausen_0353_Epidermis.png - Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". WikiJournal of Medicine 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436.).

2 : Le mélanocyte

Les mélanocytes sont des cellules pigmentaires localisées dans différents types de tissus tels que l'uvée de l'œil, la *stria vascularis* de l'oreille et les méninges. Cependant, le présent manuscrit se focalise sur le mélanocyte cutané à l'origine du mélanome cutané qui est notre modèle d'étude.

2.1 : L'origine des mélanocytes

Il est couramment admis que les mélanocytes sont issus de progéniteurs originaires de la crête neurale : les mélanoblastes qui vont migrer jusqu'à leur destination tissulaire finale pour s'y différencier en mélanocytes. Cette migration est soit dorso-latérale et spécifique du lignage mélanocytaire, soit ventrale et concerne alors des progéniteurs bi-potents (précurseurs mélanoblastiques et des cellules de Schwann) (pour revue, Bonaventure et al., 2013) qui auraient tendance à se différencier en mélanocytes lorsque le contact avec les nerfs est perdu (Adameyko et al., 2009).

2.2 : La fonction du mélanocyte cutané : la pigmentation de l'épiderme

Le mélanocyte est responsable de la synthèse de la mélanine à l'origine de la pigmentation qui protège l'épiderme contre les rayonnements ultraviolets (UV) pour éviter le développement de cancers cutanés dont fait partie le mélanome.

Chaque mélanocyte est le cœur d'une unité épidermique de mélanisation, et alimente en mélanine, grâce à ses dendrites, en moyenne 36 kératinocytes des couches basales et épineuses de l'épiderme (**Figure 2**).

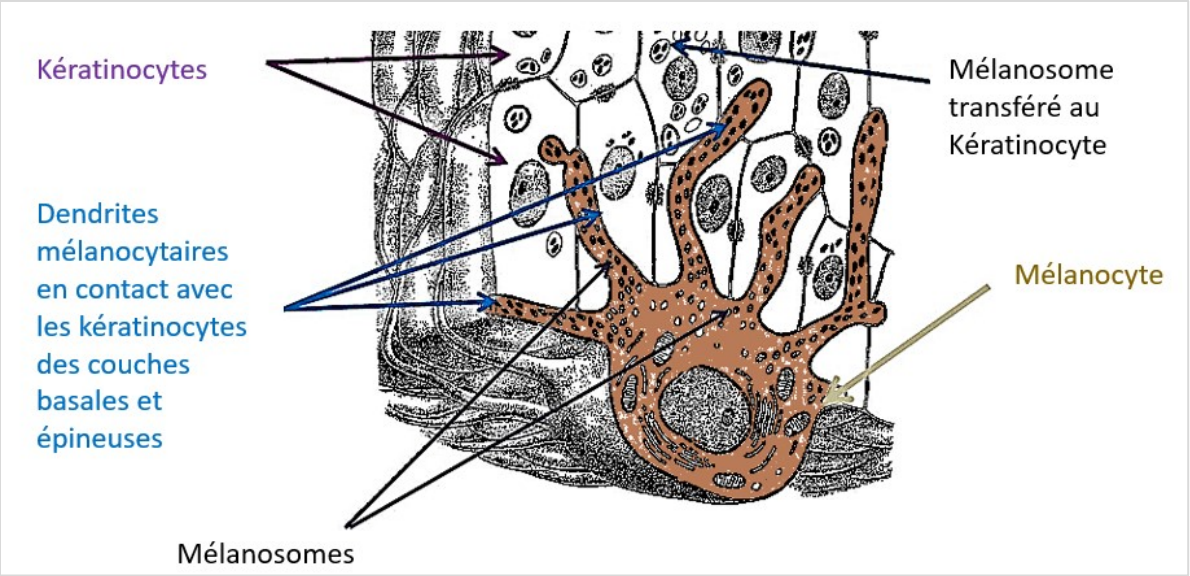


Figure 2 : Représentation schématique d'une unité de mélanisation.

Les différents kératinocytes de cette unité de mélanisation sont mélanisés par le mélanocyte présent dans la couche basale qui leur transfère la mélanine synthétisée au sein des mélanosomes grâce à ses dendrites.
(Source : http://www.ledacademy.fr/details-pigmentation+et+lumiere+visible-213.html selon le Pr Thierry Passeron. - Autorisation du Dr. Michèle Pelletier, présidente de l'association European Led Academy).

La synthèse et la maturation de la mélanine se déroule au sein des mélanosomes qui sont ensuite transférés aux kératinocytes avoisinants (pour revue, Delevoye et al., 2011). Ces organites intracellulaires spécialisés sont des lysosomes sécrétoires spécifiques des mélanocytes. Ces mélanosomes se différencient en quatre stades de maturation (I-IV) (**Figure 3**), et sont déterminés en fonction de leur structure, de la quantité et de la qualité de mélanine qu'ils contiennent.

Le mélanosome de stade I est rond, localisé à proximité du noyau et ne possède pas d'activité tyrosinase. Le mélanosome passe au stade II avec l'incorporation de Melan-A et de la protéine de structure vésiculaire PMEL17 qui forme des fibres et confère une forme allongée ovale au mélanosome. L'incorporation des enzymes TYR et TYRP1 nécessaires à la mélanogenèse permet le passage du mélanosome au stade III dans lequel la mélanine se localise au niveau des structures fibrillaires. Les mélanosomes de stade IV sont matures et contiennent une très grande quantité de mélanine et se distribuent en périphérie de la cellule. Notons que les phéomélanosomes arrêtent leur maturation au stade II et conservent leur forme arrondie non fibrillaire.

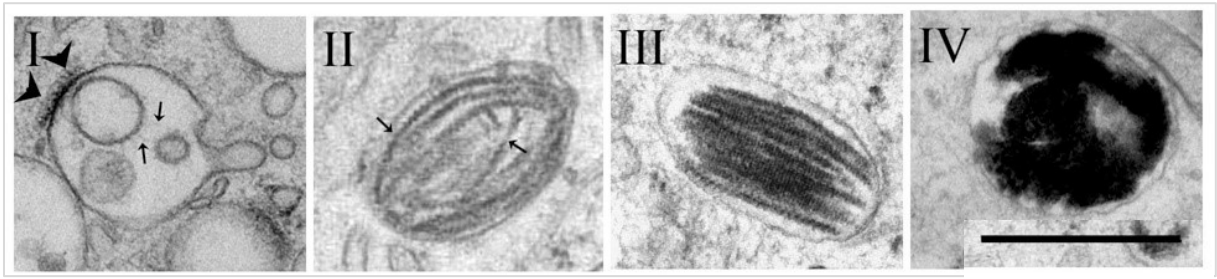


Figure 3 : Photos en microscopie électronique de mélanosomes représentant les 4 stades de maturation des eumélanosomes.

Photos de microscopie électronique de la structure des mélanosomes de stades I à IV de cellules humaines de mélanome hyperpigmentées MNT-1. Stade I : la pointe de flèche montre la double enveloppe, alors que les flèches pointent les vésicules intraluminales. Stade II : les flèches pointent les structures fibrillaires protéiques. Stades III et IV : les structures de plus en plus noires témoignent des concentrations croissantes de mélanine au sein des mélanosomes. Barre d'échelle : 0,5 µm. *(Source : Raposo et Mark 2007 - Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology, DOI:10.1038/nrm2258, copyright 2007 - autorisation RightsLink n° 4060290423301).*

Les mélanosomes matures sont transférés aux kératinocytes au niveau des dendrites mélanocytaires. Dans le kératinocyte, grâce à un mécanisme impliquant la dynéine, les mélanosomes sont rassemblés au-dessus du noyau pour former une « chape » de mélanine qui protège le matériel génétique des UV (**Figure 4**) (Byers et al., 2003; Gates et Zimmermann, 1953).

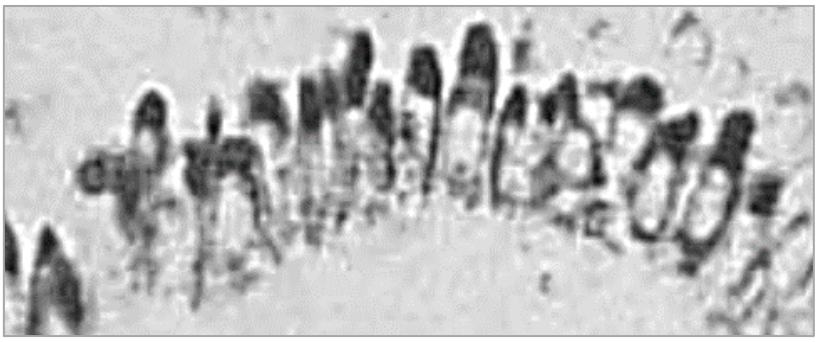


Figure 4 : Photo de microscopie des chapes de mélanines au-dessus des noyaux des kératinocytes de la lame basale.

Photos de microscopie optique d'une section non-marquée d'une biopsie de peau humaine, centrée sur la couche basale de l'épiderme. *(Source :* Reprinted from JID, Volume 21, Issue 6, Pages 339–348, *Gates and Zimmermann, Comparison of skin color with melanin content* Copyright 1953, with permission from Elsevier - http://dx.doi.org/10.1038/jid.1953.114 - *autorisation RightsLink n°* 4060290837349*).*

La mélanogenèse se déroule au sein des mélanosomes principalement grâce à 3 enzymes (**Figure 5**). La synthèse commence par la métabolisation de la L-tyrosine en L-DOPA puis en DOPA-quinone grâce à l'enzyme Tyrosinase. L'eumélanine (pigment marron-noir) est obtenue grâce aux enzymes TYRP1 (Tyrosinase DHICA oxidase, TRP-1) qui permet la métabolisation de la DOPA-quinone en DHI (Dihydroxyindole) puis en Eumélanine, alors que TYRP2 (DCT pour Dopachrome Tautomerase, TRP-2) permet la métabolisation du DOPA-chrome en DHICA (Dihydroxyindole-2-carboxylic acid) puis en Eumélanine. La phéomélanine (pigment jaune-rouge) est obtenue lorsque la cystéine est inclue dans la cascade réactionnelle avec l'obtention de Cysteinyl-dopa. La couleur de la peau et des poils dépendent directement des quantités et des proportions de ces deux pigments (Simon et al., 2009).

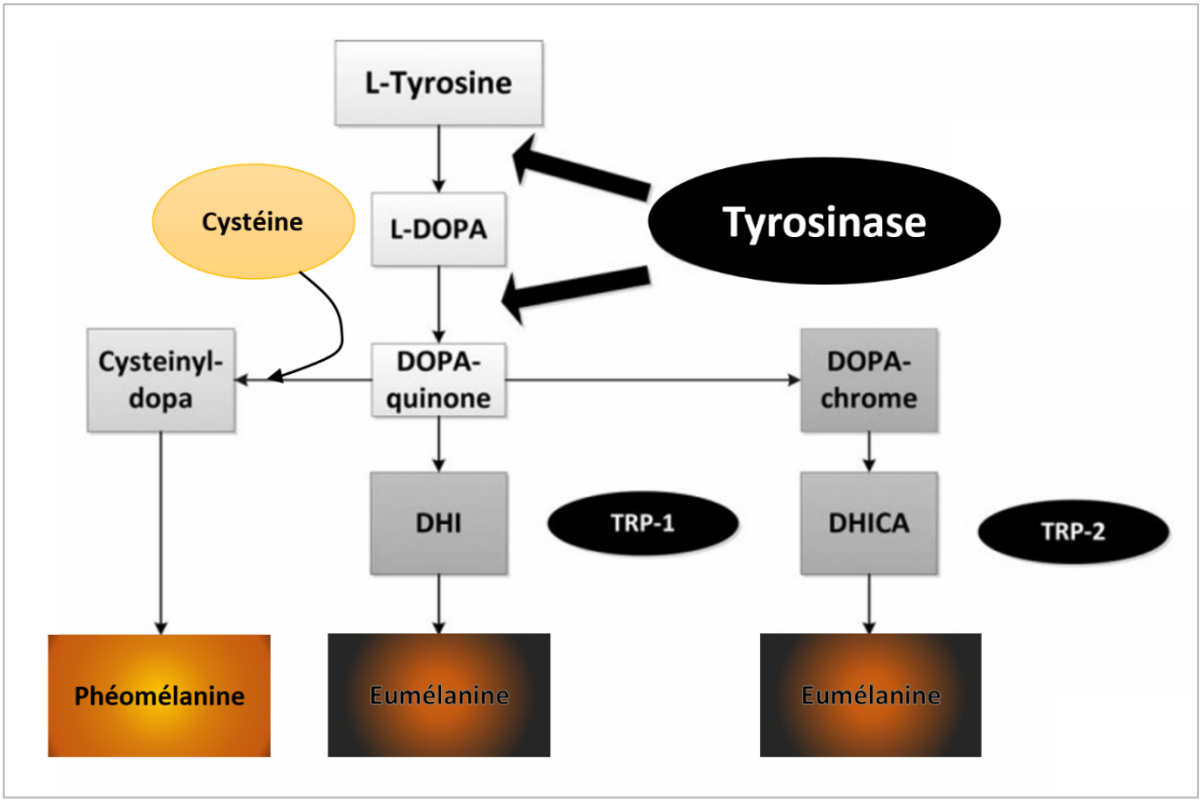


Figure 5 : Représentation schématique de la synthèse des deux types de mélanines et des principales enzymes impliquées.

La métabolisation de la Tyrosine par la Tyrosinase, TRP-1 et TRP-2 permet la synthèse de Eumélanine et, avec l'incorporation de Cystéine dans la cascade enzymatique, de Phéomélanine *(Adapté à partir de Videira et al., 2013 - © Anais Brasileiros de Dermatologia - DOI : 10.1590/S0365-05962013000100009).*

2.3 : La régulation du mélanocyte

La régulation de l'activité du mélanocyte est cruciale dans la biologie de la peau. En effet, le mélanocyte doit pouvoir augmenter son activité en réponse aux stress induits par une exposition de la peau au soleil. Cette augmentation d'activité se traduit par le bronzage qui consiste en une augmentation de la pigmentation de la zone cutanée exposée aux rayons. Le bronzage est la conséquence d'une augmentation de la synthèse de mélanine, mais également d'une augmentation de la maturation et du transfert des mélanosomes aux kératinocytes. Le bronzage a pour but de diminuer les stress induits lors des prochaines expositions aux UV. Les différences de couleurs de peau innées et celles induites lors du bronzage, sont principalement dues à des différences de nombre et de taille des mélanosomes ainsi que de leur composition en mélanine tant en termes de quantité que de qualité (Jimbow et al., 1976).

Les rayonnements UV sont les principaux facteurs environnementaux de régulation de l'activité des mélanocytes. Les UV émis par le soleil sont subdivisés en trois types :

- **UVA (320-400nm) :** Ces UV représentent la plus grosse majorité (>95%) des UV atteignant la surface du globe, et 15% pénètrent la peau jusqu'au niveau du derme. Leur effet néfaste sur les cellules est dû à l'induction d'un stress oxydant par le biais de production de radicaux libres lors de leur absorption par certaines molécules.
- **UVB (280-320nm) :** Ces UV parviennent à la surface du globe malgré une importante absorption de ces longueurs d'ondes par la couche d'ozone, et 15% des UVB pénètrent la peau jusque dans la couche basale de l'épiderme. Ils sont responsables de la réaction inflammatoire connue sous le nom de « coup de soleil ». Les UVB ont un impact direct sur les molécules d'ADN qui absorbent ces longueurs d'ondes. Cette absorption induit la formation de ponts covalents entre les bases pyrimidiques (T et C) qui peuvent être à l'origine de mutations somatiques si la cellule ne répare pas son ADN.
- **UVC (200-280nm) :** Ces UV ont les mêmes effets biologiques que les UVB, et bien qu'étant les plus énergétiques, ils sont les moins dangereux pour l'homme car ils sont complètement absorbés par la couche d'ozone.

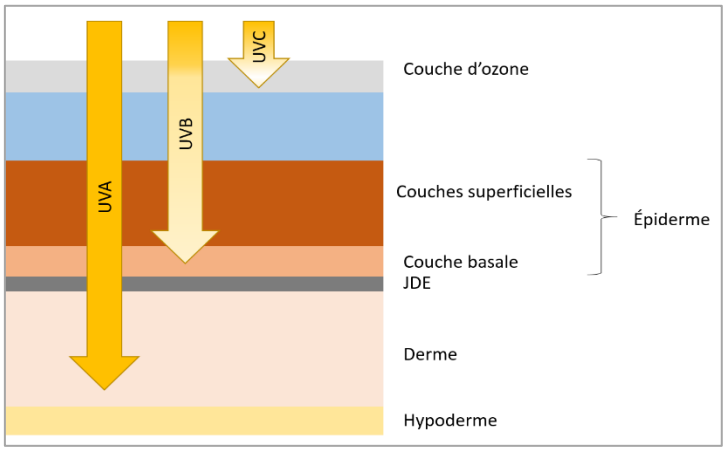


Figure 6 : Représentation schématique du niveau de pénétration des Rayons UV dans l'atmosphère et dans la peau.

Les UVA pénètrent profondément la peau jusque dans le derme. Les UVB partiellement absorbés par l'atmosphère sont rapidement absorbés par les couches superficielles de la peau. Enfin, Les UVC sont totalement absorbés par la couche d'ozone.

L'exposition aux UV stimule l'activité de p53 dans les kératinocytes, qui vont favoriser l'expression et de l'activation de MITF dans les mélanocytes, ainsi que d'autres voies de signalisation importantes (**Figure 7**) (pour revue, Osawa, 2008 ; Yamaguchi et Hearing, 2009). MITF-M (MIcrophtalmia associated Transcription Factor –isoforme M) est le facteur de transcription spécifique indispensable à l'établissement et à l'homéostasie du lignage mélanocytaire jusqu'à la régulation des fonctions des mélanocytes différenciés (Goding, 2000). En effet, MITF fait office de plaque tournante dans la régulation génétique du mélanocyte, non seulement de par les cibles qu'il va réguler (Hoek et al., 2008a), mais également de par les voies de signalisations dont il est tributaire.

Lorsque les UV stimulent l'activité de p53 dans les kératinocytes, cela réprime la signalisation par le TGF-β, ce qui permet à PAX3 d'induire l'expression de MITF. De plus, p53 promeut l'expression de Kitl/SCF (kit ligand / Stem Cell Factor) par le kératinocyte et augmente ainsi la signalisation par la voie Kit – MAPK dans le mélanocyte. En plus de l'effet classique de cette voie de signalisation sur la prolifération et la survie, elle conduit dans le mélanocyte à l'activation de MITF par phosphorylation.

L'activation de p53 dans le kératinocyte permet également d'induire la transcription de POMC (Pro-OpioMélanoCortine) qui est clivé pour produire les hormones mélanotropes telles que l'αMSH (Melanocyte-Stimulating Hormone) et ACTH (AdrenoCorticoTropic Hormone). La fixation de ces hormones sur leur récepteur MC1R (MelanoCortin 1 Receptor) exprimé par le mélanocyte induit une cascade de signalisation dépendante de l'AMPc qui favorise l'activité de CREB (cAMP Response Element Binding-protein). CREB va alors à la fois induire l'expression de MITF mais également participer à l'induction d'expression de certains de ses gènes cibles dont TYR (Tyrosinase), TYRP1 (Tyrosinase-Related Protein 1 – TRP1) et DCT/TYRP2 (DopaChrome Tautomerase / Tyrosinase-Related Protein 2 – TRP2), qui sont impliqués dans la mélanogenèse. L'expression et l'activation de MITF dans le mélanocyte mature favorise la mélanogenèse via l'expression des enzymes TYR, TYRP1 et TYRP2, ainsi que l'expression des protéines Pmel17 (PreMelanosome protein 17) et Rab27 impliquées dans la formation et le transport des mélanosomes (pour revue, Osawa, 2008 ; Yamaguchi et Hearing, 2009).

Mais MITF permet également la régulation de SNAIL2/SLUG, pour promouvoir la migration nécessaire entre autres à la colonisation des tissus par les progéniteurs mélanocytaires lors de l'embryogenèse (Pérez-Losada et al., 2002). Enfin, MITF contrôle la survie et la prolifération du mélanocyte via la régulation entre autre de BCL2 (B-Cell Lymphoma 2), de $P16^{Ink4a}$/$P21^{CIP1}$. En particulier, BCL-2 va être particulièrement important pour protéger le mélanocyte de l'apoptose et ainsi maintenir le potentiel de pigmentation cutanée.

Le Kératinocyte favorise également la survie du mélanocyte indépendamment de MITF entre autres par l'expression de Jagged qui stimule la voie Notch/RBP-J. Le kératinocyte libère également dans l'environnement des facteurs de croissance tels que le HGF (Hepatocyte Growth Factor), le PDGF (Platelet- Derived Growth Factor) et l'endothéline 1 (ET1), qui inhibent l'expression de E-cadhérine, connexine 43 et des desmogléines qui sont des molécules essentielles pour l'adhérence du mélanocyte à la matrice et aux kératinocytes. La perte d'ancrage qui s'en suit permet au mélanocyte de proliférer (Haass et Herlyn, 2005). Par ailleurs, suite à une exposition aux UV, αMSH et ET1 sont capables d'activer une réponse anti apoptotique et de réduire les dommages à l'ADN (Kadekaro et al., 2005).

Les fibroblastes du derme peuvent eux aussi réguler l'activité du mélanocyte via l'expression de facteurs de croissance tels que l'HGF, le SCF et le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor). Il est également connu que les fibroblastes peuvent réguler la signalisation β-caténine qui est d'une grande importance pour les mélanocytes et leur lignage. Ainsi, alors que le kératinocyte active β-caténine en exprimant le ligand WNT, le fibroblaste l'inhibe via l'expression de l'antagoniste Dickkopf (DKK1). Cette régulation par les fibroblastes est importante pour la physiologie cutanée puisqu'une expression élevée de DKK1 est responsable de la moindre pigmentation des zones palmo-plantaires due à une diminution du nombre de mélanocytes (Yamaguchi et al., 2004).

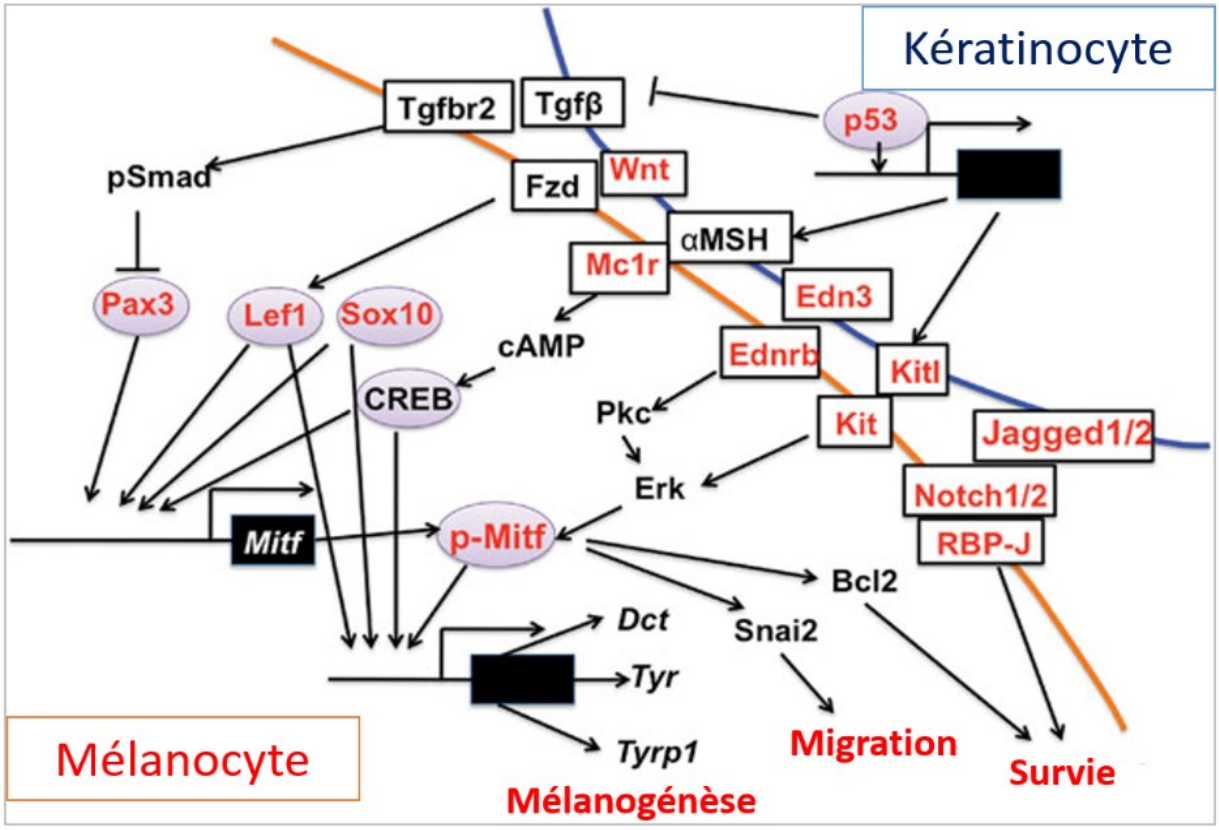


Figure 7 : Résumé schématique des régulations de l'activité mélanocytaire.

L'activité mélanocytaire est régulée en grande partie au travers de son interaction avec le kératinocyte. Le facteur de transcription spécifique du lignage mélanocytaire joue un rôle central dans ces régulations. La régulation du mélanocyte au contact du kératinocyte passe par différentes voies de signalisation dont font partie Jagged/Notch, Endothéline 3 (Edn3/Edrb), WNT/FZD/(β-caténine/TCF)/LEF. De plus, l'activation de p53 dans le kératinocyte - notamment suite à un stress induit par les rayons UV - mène à l'expression de plusieurs gènes dont l'αMSH et Kitl, mais cela mène également à l'inhibition de la voie TGFβ. Au sein du mélanocyte, MITF joue un rôle central, notamment dans le contrôle de la mélanogénèse, la survie, et la migration. MITF se trouve régulé tant au niveau de son expression (par PAX3, LEF1, SOX10 et CREB), qu'au niveau de son activation par phosphorylation (P-MITF ; par ERK). De plus, CREB favorise également l'expression des gènes cibles de MITF impliqués dans la mélanogénèse : DCT TYR et TYRP1 (TRP1). *(Source :Melanocytes Stem Cells, Osawa, 2008 – Copyright © 2009 Masatake Osawa).*

3 : Le mélanome

Le mélanome est le cancer issu de la transformation maligne du mélanocyte. Tel que précisé précédemment, différents tissus contiennent une population mélanocytaire et peuvent donc être le siège d'un développement de mélanomes dont les caractéristiques sont tissu-spécifiques. Cependant dans le présent manuscrit, seul sera évoqué le cas du mélanome cutané qui fut le modèle d'étude de ma thèse.

3.1 : Facteurs de risque

3.1.1 : Facteurs de risques environnementaux

Le mélanome résulte de la transformation maligne de mélanocytes qui ont accumulé des anomalies génétiques suite à une série d'évènements imposant un stress génotoxique aux cellules. La principale cause de développement de mélanomes est une exposition excessive aux rayons UV (65 à 95% des cas). Aussi, les cellules de mélanome présentent un défaut de réparation des cassures de l'ADN induites par l'exposition aux UV (Murray et al., 2015).

- Exposition aux rayons du soleil

Il est communément admis que les coups de soleils augmentent le risque de mélanome et cela a été démontré par de nombreuses études ces dernières décennies (pour revue, Chang et al., 2009). Une exposition solaire excessive pendant l'enfance augmente particulièrement le risque de développer un mélanome. Une étude récente basée sur les données de plus de 100 000 patients montre qu'un historique personnel de coups de soleils graves et fréquents est associé avec une augmentation prononcée du risque de développer un mélanome. De plus, le risque de développer un mélanome après de nombreux coups de soleils est plus prononcé chez les hommes au niveau du tronc qu'au niveau du reste du corps (Wu et al., 2016).

Un nombre élevé de coups de soleils graves n'augmente pas le risque de développer deux autres types de cancers cutanés, les carcinomes épidermoïde et basocellulaire (Wu et al., 2016). Ceci est en accord avec ce qui était déjà démontré : les expositions solaires intenses et intermittentes sont associées à une augmentation du risque de développer un mélanome, alors que les expositions chroniques sont plutôt associées aux carcinomes kératinocytaires et épidermoïdes (pour revue, Chang et al., 2009).

- UV artificiels

L'utilisation des cabines de bronzage à UV artificiels est associée à un risque accru de développement de mélanomes (pour revue, Boniol et al., 2012).

Pourtant, comme les personnes avec une peau très pigmentée présentent moins de risques de développer un mélanome et de subir des coups de soleil, certaines personnes croient que les UV artificiels permettent de maintenir son bronzage et de préparer sa peau à l'exposition solaire. Cependant, tel que le montre une étude récente portant sur les conséquences de ce comportement chez des étudiants américains qui utilisent les cabines UV pour se préparer à l'exposition solaire avant « Spring Break » (Dennis et Lowe, 2013), cette pratique est inefficace et pourrait même induire une légère augmentation de la survenue de coups de soleils lors de l'exposition solaire chez certaines personnes.

Non seulement l'utilisation des UV artificiels ne présente aucun avantage sur le court terme puisque cela « n'immunise » pas contre les coups de soleils, mais c'est extrêmement dangereux sur le long terme car cela augmente drastiquement le risque de développer un mélanome, en particulier chez les adolescents et les jeunes adultes (pour revue, Boniol et al., 2012).

3.1.2 : Facteurs de risques intrinsèques

- Le Phototype (**Tableau 1**)

Le phototype permet de classifier la prédisposition d'une personne à subir des coups de soleil et la capacité de bronzer sur une échelle de 1 (peau qui ne bronze pas et prend toujours des coups de soleil), à 6 (peau noire qui prend rarement des coups de soleil) (Fitzpatrick, 1988). Les personnes à peau claire présentent un risque accru de développer un mélanome cutané. En effet, leur peau n'est pas protégée efficacement contre les effets néfastes des UV, et le faible potentiel de bronzage de ces phototypes en réaction à une exposition solaire souligne leur vulnérabilité due au manque de réactivité de ces peaux face au stress subi lors de l'exposition.

PHOTOTYPE	CARACTÉRISTIQUES	RÉACTION AU SOLEIL	CONSEILS DE PROTECTION
1	Peau très blanche Cheveux roux ou blonds Yeux bleus/verts Souvent des tâches de rousseur	Coups de soleil systématiques Ne bronze jamais, rougit toujours	**Exposition fortement déconseillée** Rester à l'ombre le plus possible, ne pas chercher à bronzer, ne jamais s'exposer entre 12 h et 16 h **Au soleil, protection maximale indispensable :** vêtements, chapeau, lunettes de soleil, crème solaire indice FPS très haute protection (50+).
2	Peau claire Cheveux blonds/roux à châtains Yeux clairs à bruns Parfois apparition de tâches de rousseur	Coups de soleil fréquents Bronze à peine ou très lentement	
3	Peau intermédiaire Cheveux châtains à bruns Yeux bruns	Coups de soleil occasionnels Bronze graduellement	**Exposition prudente et progressive** Éviter le soleil entre 12 h et 16 h **Au soleil, haute protection recommandée :** vêtements, chapeau, lunettes de soleil, crème solaire indice FPS haute protection (30 - 50) ou protection moyenne (15 à 25).
4	Peau mate Cheveux bruns/noirs Yeux bruns/noirs	Coups de soleil occasionnels lors d'expositions intenses Bronze bien	
5	Peau brun foncé Cheveux noirs Yeux noirs	Coups de soleil rares Bronze beaucoup	**Exposition progressive** Éviter le soleil entre 12 h et 16 h **Au soleil, protection recommandée :** chapeau, lunettes de soleil, crème solaire indice FPS protection moyenne (15 à 25).
6	Peau noire Cheveux noirs Yeux noirs	Coups de soleil très exceptionnels	

Tableau 1 : Classification des phototypes en fonction de la sensibilité cutanée à l'exposition solaire, accompagnée des conseils de protection.

On distingue 6 phototypes selon la couleur de la peau, des cheveux et des yeux, mais également selon la sensibilité de la peau à l'exposition solaire et sa capacité à bronzer. Ces 6 phototypes se regroupent par 2 selon 3 profils de comportements à adopter face à l'exposition solaire pour protéger la peau.
(Source : http://www.syndicatdermatos.org/wp-content/uploads/2014/08/Image14.png; http://www.syndicatdermatos.org/dossier/les-risques-des-cabines-uv/; copyright Syndicat National des Dermatologues).

- Le nombre et le type de Nævi

Environ 30% des mélanomes se développent à partir d'un nævus préexistant. Un nombre élevé de nævi, de même que la présence d'un nævus congénital géant, représentent tous deux un facteur de risque accru de développer un mélanome.

- Antécédents personnels et familiaux de mélanomes

Les personnes ayant des antécédents personnels (Youlden et al., 2016) et /ou familiaux ont un risque accru de (re)développer un mélanome. De plus, il a été établi que le risque de développer un mélanome est accru chez les personnes ayant déjà développé un carcinome cutané.

En ce qui concerne les formes familiales de mélanome, elles représentent 5 à 10% des mélanomes, et présentent dans 20 à 40% des cas, une mutation héréditaire du gène CDKN2A/p16 soulignant l'importance de ces gènes dans le développement de la maladie. Une mutation de CDK4, beaucoup plus rare, a également été retrouvée dans certaines formes familiales.

- Autres facteurs de risque

Les traitements immunosuppresseurs prescrits aux receveurs de greffes et les états immunodéprimés sont connus pour accroitre le risque de développer des mélanomes (Vajdic et al., 2009). De façon intéressante, une étude récente montre que les personnes possédant un terrain atopique présentent moins de risques de développer un mélanome. Les auteurs suggèrent que cela est dû à une surveillance immunitaire accrue dans la peau de ces patients. Toutefois, lorsqu'un mélanome se développe, le pronostic vital n'est pas influencé par l'atopie (Marasigan et al., 2016).

On observe également un risque accru de développer un mélanome chez les patients atteints de certaines formes de *Xeroderma Pigmentosum*, une maladie héréditaire rare due à un défaut de réparation de l'ADN, en particulier pour les dimères de thymines causés par les UV (Paszkowska-Szczur et al., 2013).

3.2 : Les différents types histo-cliniques de mélanomes cutanés

L'OMS classifie les mélanomes cutanés selon quatre principales formes histo-cliniques.

3.2.1 : Mélanome superficiel extensif

Il s'agit du mélanome le plus courant qui représente près des trois quart (70% à 80%) des mélanomes diagnostiqués, localisé principalement sur les membres. Il est connu en anglais sous l'acronyme SSM pour Superficial Spreading Melanoma. Il se développe selon deux phases classiques que nous verrons par la suite : une longue phase de croissance horizontale (ou croissance radiale) qui précède une phase d'invasion dermique (croissance verticale).

Ce type de mélanome correspond tout à fait aux critères ABCDE que nous verrons par la suite. Il se présente sous la forme d'une tache cutanée pigmentée qui évolue dans le temps et présente des teintes et des contours irréguliers et asymétriques. La longue phase de croissance radiale explique le fait que ce type de mélanome présente le meilleur pronostic de survie lorsqu'il est diagnostiqué de façon précoce.

3.2.2 : Mélanome Nodulaire

Ce type de mélanome est plus rare (10 à 20% des cas). Il se présente sous la forme d'un nodule noir ou brun qui augmente rapidement en taille. Cependant, il arrive qu'il ne soit pas pigmenté, ce qui rend son diagnostic plus compliqué.

Le mélanome nodulaire présente une évolution beaucoup plus rapide que le mélanome superficiel car il ne développe quasiment pas de RGP, et le pronostic est donc bien moins favorable puisque le risque de dissémination métastatique est présent dès le début du développement de la lésion.

3.2.3 : Mélanome Lentigineux

Ce mélanome est relativement rare(5 à 10% des cas). Il est accompagné d'une atrophie de l'épiderme et affecte la peau des patients âgés au niveau des zones les plus exposées au soleil durant leur vie, c'est à dire le visage et les mains. L'évolution de ce type de mélanome est lente et ne progresse que rarement vers une forme maligne aussi appelée mélanome de Dubreuil (LMM : Lentigo malignant melanoma).

3.2.4 : Mélanome Lentigineux Acral

Ce type de mélanome n'est pas lié à l'exposition aux UV et touche les zones palmaires, plantaires et unguéales plus particulièrement chez les populations africaines et asiatiques (60% des mélanomes développés chez les personnes à peau foncée, contre 5% des mélanomes chez les personnes à peau blanche). Bien que le mélanome lentigineux acral puisse apparaitre à tout âge, les femmes de plus de 50 ans sont plus touchées par ce type de mélanome.

3.3 : Épidémiologie

Comme le montrent les données publiées sur GLOBOCAN (**Figure 8**), parmi les pays les plus touchés se trouvent l'Australie, la Nouvelle-Zélande, la Russie, les pays d'Amérique du nord, l'Afrique du Sud et les pays du continent européen. Cependant, l'Australie et la Nouvelle-Zélande sont nettement plus touchées par le mélanome, tant en termes de prévalence, qu'en termes d'incidence et de mortalité.

Cette répartition mondiale de la prévalence du mélanome est la conséquence directe de l'histoire des peuplements de ces pays, aujourd'hui majoritairement peuplés par des personnes aux peaux claires voire très claires.

Ainsi, la Nouvelle Zélande et l'Australie sont peuplées de descendants de colons britanniques aux phototypes de peaux très claires et très sensibles. Or, ces pays sont fortement ensoleillés, et ont de plus subi plusieurs épisodes de « trous dans la couche d'ozone ». Lors de ces épisodes, l'épaisseur de la couche d'ozone peut être réduite à 50% de son épaisseur « normale », et de ce fait elle ne remplit plus correctement son rôle de « filtre à rayons ». Ainsi, une augmentation moyenne de 10% des UVB atteignant la surface terrestre fut relevée entre 1986 et 1996.

À cet égard, la prise de conscience du problème de santé publique que représente le mélanome a conduit certains États à initier des politiques de prévention sanitaire plus strictes. C'est ainsi que les cabines à UV sont interdites depuis le 1er janvier 2015 en Australie. En France l'interdiction est prévue pour l'horizon 2017, après une longue phase de réglementation ayant débuté en 1997. Ces mesures semblent appropriées puisqu'il apparait aujourd'hui qu'une utilisation de ces cabines avant l'âge de 35 ans augmente le risque de développer un mélanome de 75% (pour revue, Boniol et al., 2012).

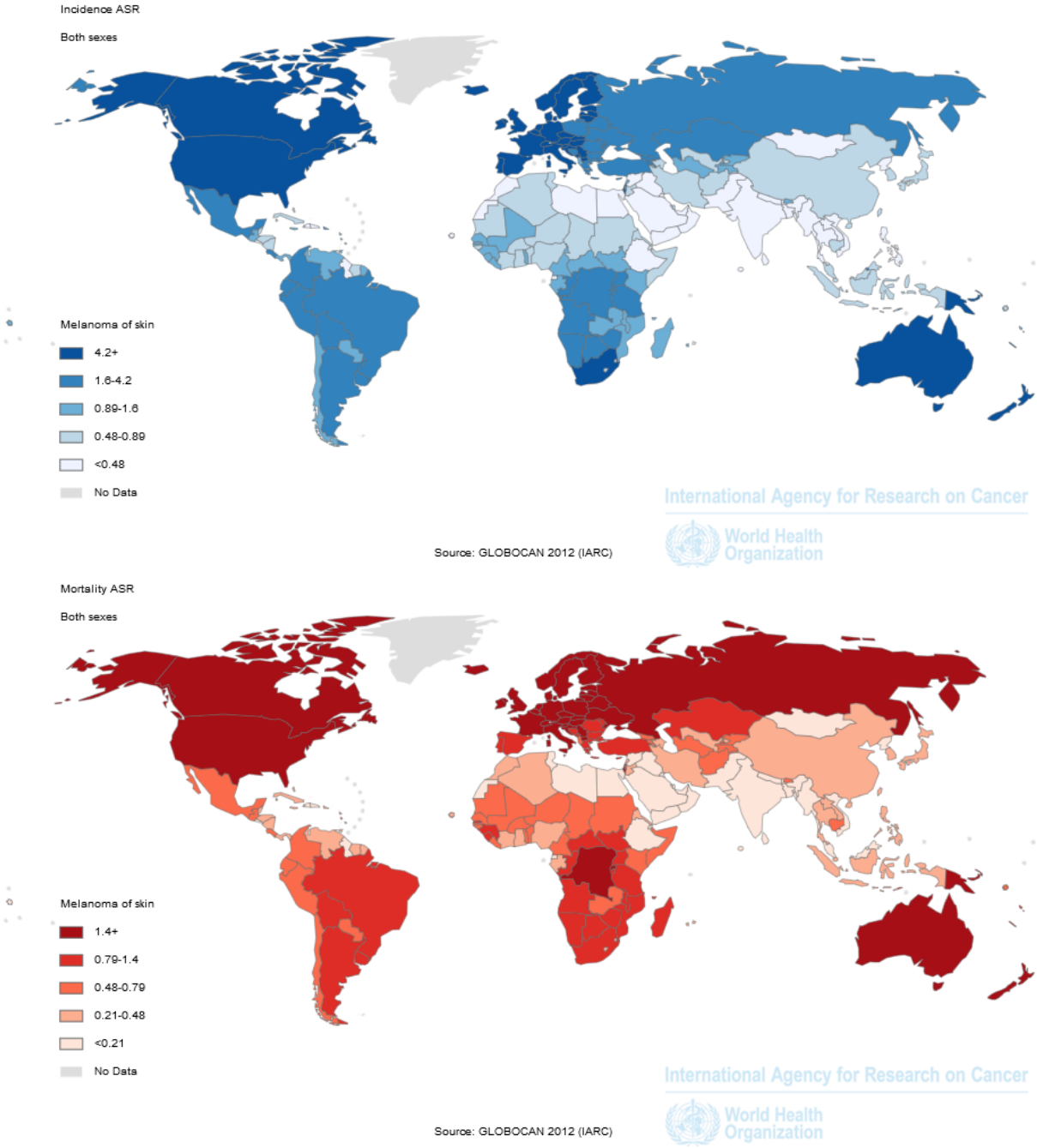


Figure 8 : Carte mondiale de l'incidence (bleu) et de la mortalité (en rouge) du mélanome cutané en 2012.

Ces cartes représentent par pays l'incidence et la mortalité du mélanome cutané pour 100 000 individus standardisée par rapport à l'âge. *(Source : Globocan.iarc.fr – autorisation fournie par Mr N. O'Connor - Estimated age-standardized rates (World) of incident cases, both sexes, melanoma of skin, worldwide in 2012 - Estimated age-standardized rates (World) of deaths, both sexes, melanoma of skin, worldwide in 2012- From Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx, accessed on 08/03/2017.).*

3.4 : Prévention

La principale mesure de prévention du mélanome consiste à éviter l'exposition aux rayons UV. À cette première mesure s'ajoute la détection précoce des lésions. Ces deux mesures sont à l'heure actuelle les meilleurs moyens à notre disposition pour lutter contre le mélanome.

En effet, alors que le pronostic est très positif lorsqu'un mélanome précoce est traité par exérèse, les thérapies actuelles ne permettent pas de traiter efficacement les métastases des stades avancés de mélanomes. C'est pourquoi une détection précoce du mélanome est cruciale pour la survie du patient. Si un mélanome est suspecté, un suivi doit être réalisé par un dermatologue, et seul un examen anatomo-pathologique sera en mesure déterminer la nature exacte de la lésion.

La règle **ABCDE** permet aux patients de s'examiner eux-mêmes, en surveillant cinq critères qui permettent de savoir si un mélanome potentiel se cache derrière leurs lésions pigmentées :

- A : Asymétrie
- B : Bords irréguliers
- C : Couleur hétérogène
- D : Diamètre élevé (>6mm)
- E : Évolution de la lésion

L'évolution étant un critère important, les sept points de Glasgow permettent de préciser l'observation de la lésion :

- 1 : Changement de taille
- 2 : Changement de forme
- 3 : Changement de couleur
- 4 : Diamètre ≥ 7mm
- 5 : Présence d'inflammation
- 6 : Présence de saignements ou d'ulcération
- 7 : Devient sensible

Cependant, ces méthodes qui sont pertinentes pour le mélanome superficiel extensifs (SSM) sont bien moins efficaces pour détecter les mélanomes acraux et nodulaires. De même, un mélanome achromique peut facilement être laissé de côté lors de ces examens, à fortiori si le patient s'auto-examine.

De plus, il a été récemment démontré le danger que constitue l'excès de confiance dans ce seul examen en Australie. En effet, ce pays durement touché par le mélanome a fait d'énormes efforts de prévention. Il en ressort aujourd'hui que dans l'état du Queensland, les décès sont désormais plus souvent imputables à des mélanomes de petites tailles qui présentent pourtant un taux de survie à 20 ans de 96% en temps normal (Whiteman et al., 2015).

3.5 : Critères de pronostic

Principalement basés sur le volume et la profondeur de la tumeur et sur les métastases, les critères de pronostic ont été déterminés par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC). Ces outils sont nécessaires à la mise en place d'un traitement adapté au stade de mélanome dont le patient est atteint.

3.5.1 : Niveau d'invasion de Clark et Mihm

Cette méthode classifie en cinq niveaux la gravité d'invasion du mélanome (**Figure 9**) selon l'atteinte des tissus sous-jacents lorsque l'invasion dermique ne dépasse pas le millimètre.

- Niveau I : Derme sain (localisation uniquement intra-épidermique)
- Niveau II : Derme papillaire atteint (Jonction Dermo-Épidermique détruite)
- Niveau III : Derme papillaire envahi profondément mais derme réticulaire sain
- Niveau IV : Derme réticulaire atteint
- Niveau V : Hypoderme atteint

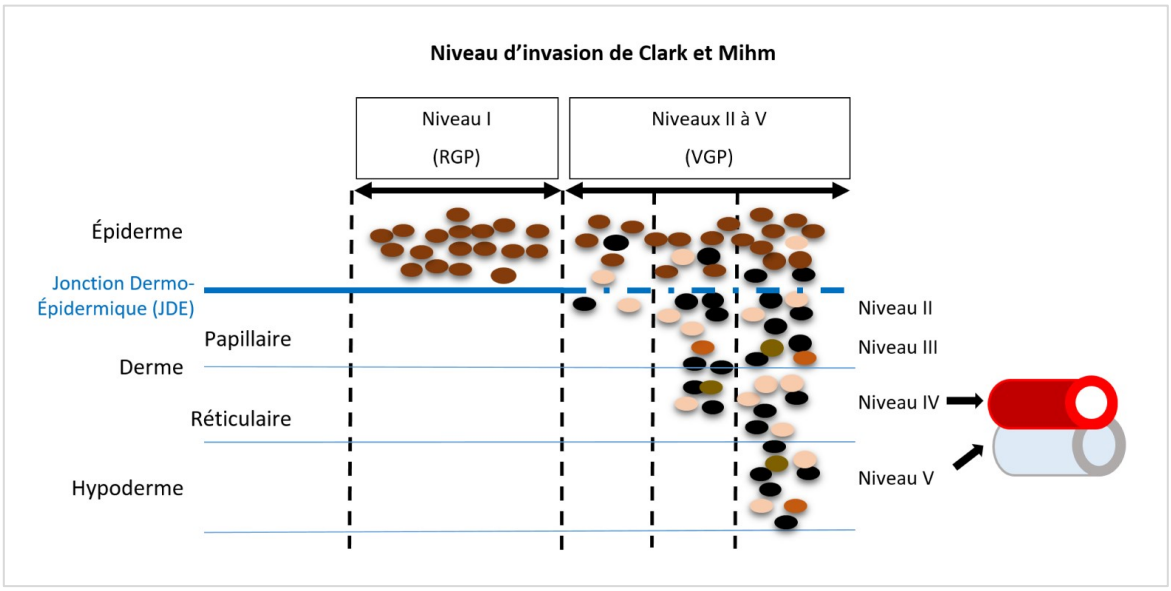


Figure 9 : Représentation schématique des niveaux d'invasion de Clark et Mihm.

Ce critère pronostic se base sur la profondeur de l'invasion des tissus sous-jacents : le derme et l'hypoderme. Il s'agit là d'une profondeur non pas quantitative mais plutôt qualitative (selon le tissu atteint, les cellules peuvent entrer en contact avec les vaisseaux sanguins et lymphatiques). Le niveau I correspond à une absence d'invasion, donc à une localisation uniquement épidermique des cellules de mélanome. Les niveaux II à IV correspondent à différents niveaux d'invasion du derme et de l'hypoderme, et à un risque croissant de dissémination métastatique.

3.5.2 : Classification Tumeur - Ganglion (Node) - Métastase (TNM)

La classification généraliste TNM permet de décrire les stades des cancers dont sont atteints les patients, selon un modèle initialement proposé dans les années 50 par le chirurgien français Pierre Denoix. Cette classification est réactualisée au fur et à mesure que les connaissances en oncologie progressent par l'UICC (Union for International Cancer Control) et l'AJCC (American Joint Committee on Cancer). À ce titre, la dernière mise à jour de la méthode détaillée dans l' « *AJCC Cancer Staging Manual (7th ed.)* » prend en compte l'indice de fréquence mitotique dans le cas du mélanome. La classification se base sur plusieurs méthodes détaillées ci-après.

3.5.2.1 : Indice de Breslow (T)

Cette méthode est prise en compte dans la classification TNM pour le mélanome. Elle se base sur la profondeur maximale d'invasion dermique atteinte par les cellules de mélanome. Les tumeurs sont classifiées selon une échelle de T1 à T4. La présence de saignements ou d'ulcération est prise en compte car elle est associée à un risque accru de dissémination métastatique ou d'une réapparition du mélanome *in situ* après résection.

- T0: pas de tumeur primitive
- T1 : <1mm (pour ces tumeurs, se référer aux niveaux de Clark et Mihm)
- T2 : de 1 à 2mm
- T3 : de 2 à 4mm
- T4 : > 4mm

3.5.2.2 : Métastases (N et M)

Les métastases des mélanomes sont connues pour disséminer dans la quasi-totalité des organes, pour leur résistance aux traitements classiques, mais également aux traitements plus récents à moyen terme avec des chances de survie à cinq ans assez faibles.

3.5.2.3 : Métastase ganglionnaires (N)

Lorsque le mélanome commence à disséminer, le système lymphatique va être envahi en partant du territoire lymphatique où le mélanome s'est développé. Aussi, l'évaluation du nombre de ganglions atteints permet de préciser le diagnostic :

- N0 : pas d'atteinte ganglionnaire
- N1 : 1 ganglion atteint
- N2 : 2 à 3 ganglions atteints (ou métastase en transit)
- N3 : 4 ganglions ou plus (métastases ganglionnaires et métastases en transit)

3.5.2.4 : Métastases à distance (M)

Lorsque les métastases sont sorties du système lymphatique local et ont atteint d'autres organes, le pronostic d'évolution positive chute encore :

- M0 : Pas de métastase à distance
- M1 : Présence de métastases à distance

Lorsqu'il y a dissémination à distance, plusieurs cas de figure se présentent selon la localisation des métastases, et selon le niveau de Lactate DesHydrogénase (LDH) sanguin. En effet un niveau élevé de LDH est synonyme de tissus endommagés, donc de mauvais pronostic.

- M1a : Taux de LDH normal et métastases distantes cutanées et sous-cutanées
- M1b : Taux de LDH normal et métastases pulmonaires
- M1c : Taux de LDH élevé ou toute autre métastase viscérale

3.6 : Physiopathologie du mélanome

3.6.1 : Le modèle classique de la progression du mélanome

Le modèle canonique de développement du mélanome identifie plusieurs phases représentées en **Figure 10**. À la suite d'évènements de transformation un mélanocyte va devenir une cellule de mélanome qui prolifère tout d'abord « *in situ* » dans l'épiderme durant la phase de croissance radiale RGP (Radial Growth Phase, Clark et Mihm niveau I). Cette prolifération erratique pousse les cellules à cesser leurs interactions avec les kératinocytes au profit d'interactions entre cellules tumorales. Avec la progression du mélanome, certaines cellules vont continuer d'accumuler des mutations et de se transformer pour acquérir des propriétés invasives. Le mélanome entre alors dans la phase de croissance verticale VGP (Vertical Growth Phase) qui consiste en la digestion de la lame basale de l'épiderme, c'est à dire la Jonction Dermo-Épidermique (JDE), suivie de l'invasion du derme. Une fois dans le derme, les cellules du mélanome ont accès aux vaisseaux sanguins et lymphatiques et peuvent donc commencer à disséminer. Les différences entre les phases RGP et VGP ont une incidence cruciale sur la survie telle que cela sera traité dans la partie prévention de ce manuscrit.

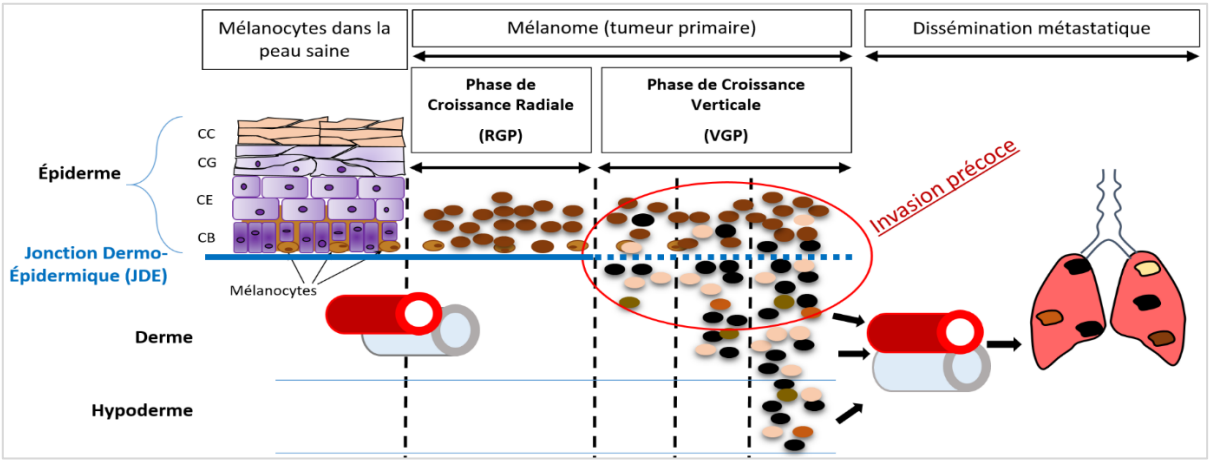


Figure 10 : Représentation schématique des phases de progression du mélanome cutané.

Sont représentés : - En rose-orangé, la couche Cornée (CC). - En violet les kératinocytes des couches Basale (CB), Épineuse (CE) et Granuleuse (CG). En marron clair, les mélanocytes sains dans la couche basale de l'épiderme au contact de la JDE. Les cellules de mélanomes sont de différentes couleurs car le niveau de pigmentation varie avec la progression tumorale. La JDE est représentée par le trait bleu épais qui devient pointillé pour représenter la dégradation de la JDE lors de l'invasion précoce. Les vaisseaux sanguins et lymphatiques sont symbolisés en rouge et en gris respectivement.

3.6.2 : Les autres modèles de la progression du mélanome

Le modèle classique de la progression du mélanome basé sur l'accumulation progressive de mutations qui permet l'invasion ne décrit pas la progression de tous les mélanomes. En effet, certains mélanomes peuvent être invasifs dès le début sans présenter de longue phase RGP. De plus, les tumeurs présentent plusieurs sous-populations de cellules tumorales dont certaines sont plus résistantes aux traitements. Aussi, certains auteurs proposent d'envisager la progression du mélanome à travers le spectre d'autres modèles de progression possible du mélanome en accord avec les données bibliographiques.

3.6.2.1 : Modèle des cellules initiatrices de mélanome : les MICs

Certains auteurs proposent qu'au sein de la tumeur se trouve une sous-population de cellules initiatrices de mélanome qui possèdent un potentiel de « cellule souche tumorale » (Houben et al., 2008; Smalley et Herlyn, 2009). Ces cellules sont capables de proliférer pour s'auto- renouveler mais également de donner différentes cellules filles qui forment la tumeur. Cela a été mis en évidence par une xénogreffe chez la souris d'une sous-population de cellules tumorales de patient. Cette sous-population est capable de redifférencier les différentes sous-populations cellulaires observées dans la tumeur du patient (**Figure 11**) (Schatton et al., 2008 ; pour revue, Houben et al.,2008). Ces cellules souches tumorales possèderaient un potentiel de chimiorésistance qui expliquerait la rechute des patients traités contre le mélanome.

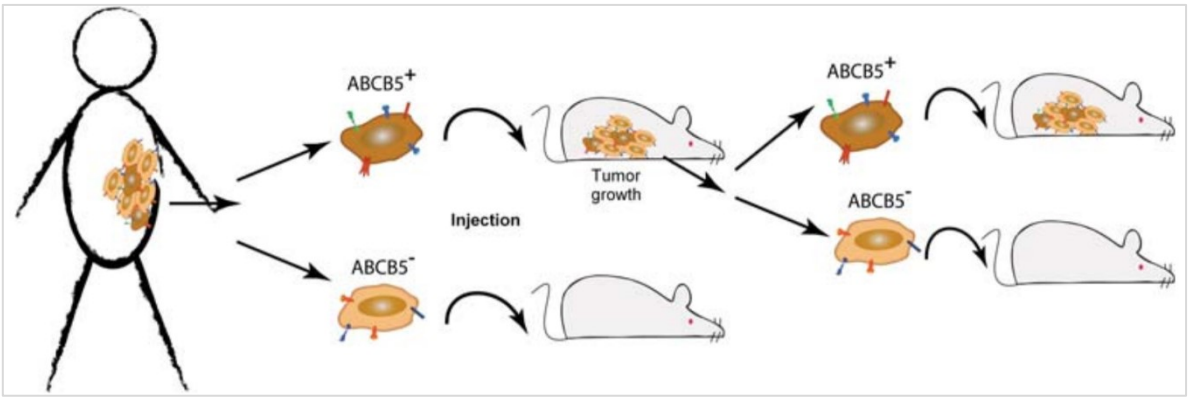


Figure 11 : Mise en évidence du potentiel de « cellule souche tumorale » par xénogreffe de sous-populations tumorales.

La xénogreffe en série chez la souris NOD/SCID de cellules humaines de mélanome de patients permet de mettre en évidence le potentiel tumorigénique de la sous-population de cellules tumorales ABCB5 positive qui est capable de s'auto-renouveler et de redifférencier des cellules ABCB5 négatives dépourvues de potentiel tumorigénique *(Source : Houben et al., 2008 ; selon les travaux de Schatton et al. en 2008 – DOI: 10.1111/j.1610-0387.2008.06786.x Autorisation RightsLink/* John Wiley and Sons *n° :* 4060300502554*).*

Les différentes études réalisées peinent à mettre en évidence un marqueur consensuel permettant l'identification des MICs, et l'utilisation de plusieurs marqueurs semble plus appropriée. Ainsi, de façon non exhaustive les MICs peuvent être identifiées via la forte expression de certains marqueurs tels que CD20, CD24, ALDH, CD271, ABCB5 ou JARID1B. Toutefois, de plus amples études sont nécessaires pour déterminer si ces marqueurs pris ensembles peuvent être considérés comme une signature des MICs lorsqu'ils sont fortement coexprimés. En effet, alors que certains auteurs montrent que CD271 et ABCB5 - deux marqueurs bien étudiés des MICs - semblent être coexprimés par les MICs (Frank et al., 2011; Luo et al., 2012), des travaux plus récents de l'équipe de Ballotti indiquent que dans plusieurs lignées cellulaires humaines de mélanome ces 2 marqueurs sont rarement coexprimés (Cheli et al., 2014).

Ces MICs sont également caractérisées par une faible expression de MITF et un faible taux de prolifération transitoire qui leur permet de s'auto-renouveler tout en favorisant la résistance aux thérapies (pour revue, Ballotti, 2015). Ces cellules au fort potentiel tumorigénique seraient donc à l'origine de l'hétérogénéité des tumeurs de mélanome, assurant un potentiel invasif et un potentiel de chimiorésistance qui pourrait expliquer la rechute des patients traités contre le mélanome.

3.6.2.2 : Le modèle de la réversion phénotypique des cellules

Un dernier modèle se base sur l'existence de « switchs » phénotypique des cellules tumorales, permettant aux cellules de passer d'un phénotype prolifératif à un phénotype invasif et inversement (Hoek et Goding, 2010). Par opposition aux modèles précédents qui supposent que les modifications phénotypiques survenues sont irréversibles - du fait de l'accumulation de mutations, ou de la différenciation de la cellule tumorale - ce modèle de switch phénotypique propose que dans certaines conditions une cellule invasive peut recommencer à proliférer et redifférencier différentes sous-populations tumorales (**Figure 12**).

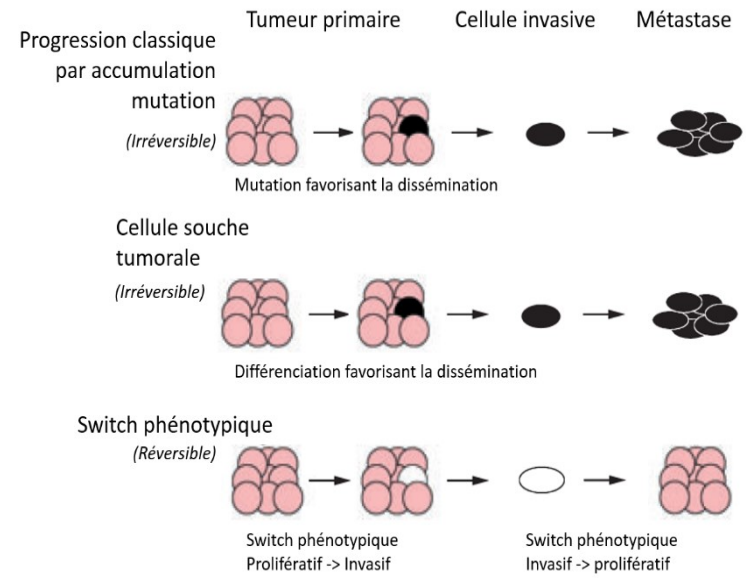


Figure 12 : Comparaison des modèles de progression tumorale du mélanome.

Dans la progression classique, la progression du mélanome est irréversible et est le fruit de l'accumulation de mutations successives. Le modèle de cellules souches tumorales (MICs) propose qu'une sous-population de cellules initiatrices de mélanome est à l'origine des autres sous populations de la tumeur, garantissant à la fois leur auto-renouvellement, et l'hétérogénéité de la tumeur par la différenciation irréversible de certaines des cellules filles. Le modèle de réversion ou « switch » phénotypique prévoit que les cellules peuvent adopter successivement des phénotypes prolifératifs et invasifs de façon réversible.

(Source : Hoek et Goding 2010 – DOI 10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x Autorisation RightsLink/ John Wiley and Sons *n° :* 4060300935315*).*

3.7 : Traitement du mélanome

Différents traitements sont possible pour prendre en charge le mélanome (pour revue, Millet et al., 2016).

3.7.1 : Chirurgie

Lorsque le mélanome reste localisé au niveau cutané, la principale thérapie consiste en la résection chirurgicale des tumeurs. Une première exérèse est réalisée lors de la suspicion d'un mélanome afin qu'un anatomo-pathologiste confirme le diagnostic et détermine quels sont les risques associés.

Par la suite une deuxième exérèse élargie est réalisée. Lors de cette opération, une marge de sécurité est déterminée par la résection d'une certaine épaisseur de tissu sain autour des tumeurs. L'épaisseur de tissu sain enlevé peut aller de 0,5 à 3 cm selon la taille de la tumeur. Si le derme est profondément envahi, il est fréquent de procéder au curage ganglionnaire de la zone de drainage du mélanome. Cependant ce curage peut être réalisé jusqu'à plusieurs années après l'exérèse élargie du mélanome.

Un suivi régulier du patient est réalisé après l'exérèse car il existe sur le long terme (>10ans) un risque de récidive locale, et même à distance, car le mélanome a une grande propension à métastaser dès qu'il devient invasif.

3.7.2 : Chimiothérapie : Dacarbazine / Fotémustine

Ces thérapies sont utilisées classiquement dans le traitement du mélanome, mais ces mesures ne sont que palliatives puisqu'elles ne permettent pas la guérison. La Dacarbazine est étudiée comme traitement contre le mélanome depuis les années 70, mais dans la mesure où son utilisation n'est pas suffisante pour guérir du mélanome, cette molécule fait encore aujourd'hui l'objet de recherches, en particulier en utilisation conjointe avec d'autres agents. Les métastases peuvent être traitées par un antinéoplasique : la Fotémustine. Cependant, les métastases développées par le mélanome sont souvent résistantes à ces traitements qui présentent les effets secondaires classiquement observés en chimiothérapie.

3.7.3 : Immunothérapies

Pour différents stades de mélanomes, une immunothérapie non spécifique basée sur l'IFNα (ROFERON® A, interféron alpha2a, INTRONA® interféron alpha2b) est administrée à haute dose aux patients. Ce traitement fait office d'adjuvant pour éviter le risque de récidives. Il est également possible de stimuler le système immunitaire via l'Interleukine 2 (IL2 PROLEUKIN®) qui favorise l'expansion clonale des lymphocytes T et le maintien de leur population et de leur activité (Rosenberg, 2014).

Il existe également des immunothérapies spécifiques (pour revue, Vennepureddy et al., 2016) . Le traitement le plus classiquement utilisé est l'Ipilimumab (YERVOY®), un anticorps monoclonal dirigé contre CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4). Son action vise à potentialiser l'activité anti-tumorale des Lymphocytes T cytotoxiques en promouvant l'activation du lymphocyte T suite à la présentation d'antigène. Cependant, 60% des patients développent des effets secondaires touchant entre autres la peau, le tube digestif et le foie.

Plus récemment étudié dans le cas du mélanome figurent le Nivolumab (OPVIDO®) et le Pembrolizumab (KEYTRUDA®) qui visent à inhiber la voie PD-1/PD-L1 (Programmed cell Death 1 & Programmed cell Death Ligand 1). PD-1 est un récepteur de la famille des immunoglobulines exprimé en surface de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T et les lymphocytes pro B qui permet d'empêcher leur activation abusive. Cette voie de signalisation est normalement impliquée dans la tolérance immunitaire. Mais les tumeurs, dont le mélanome, la détournent et s'immunisent contre l'action des Lymphocytes T. Pour ce faire, elles expriment le ligand PD-L1 en réponse à des cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF-γ (pour revue, Vennepureddy et al., 2016). Une étude récente montre que chez les patients dont les tumeurs résistent à un traitement à l'Ipilimumab, l'utilisation de Pembrolizumab permet d'inhiber et retarder significativement la progression tumorale par rapport aux traitements par différentes chimiothérapies (Ribas et al., 2015).

Ces deux traitements ont donc pour but de contrer la résistance des tumeurs à l'action du système immunitaire et sont plus efficaces à moyen et long terme.

3.7.4 : Les thérapies ciblées

La compréhension des mécanismes associés à la progression du mélanome, qui sera évoquée dans la *Partie II : Génétique du mélanome* de cette introduction bibliographique, permet d'élaborer de nouveaux traitements ciblés spécifiquement contre les cellules de mélanome.

Les inhibiteurs de BRAF et de MEK

Ces traitements ciblent les voies de signalisation impliquées dans le mélanome (pour revue, Vennepureddy et al., 2016). Ainsi, les anti-BRAF tels que le Dabrafenib (Tafinlar®, Glaxosmithkline) et le Vemurafenib (Zelboraf®, Roche), mais également les anti-MEK Selumetinib, Cobimetinib (Cottelic®, Roche) et Trametinib (Mekinist®, Novartis) visent à traiter les conséquences des mutations de la voie des MAPK, très fréquemment impliquées dans le développement du mélanome. Ces thérapies fonctionnent sur le principe de l'addiction à l'oncogène (Weinstein et Joe, 2008), qui stipule que la cellule transformée dépend d'un oncogène clé pour sa survie et sa prolifération malgré ses nombreuses altérations génétiques. Ainsi, le traitement de ce seul oncogène permet d'obtenir une réponse très rapide en début de thérapie.

Toutefois, ces thérapies connaissent leurs limites puisque seuls sont éligibles les patients atteints d'un mélanome présentant une mutation $BRAF^{V600E/K}$, et que l'efficacité dans le temps se perd car des résistances aux traitements apparaissent assez rapidement. De plus, les patients traités avec ces molécules tendent à subir des effets secondaires qui peuvent aller de la simple photosensibilisation à l'induction de tumeurs cutanées malignes (kératoacanthomes, carcinomes épidermoïdes, nouveaux mélanomes) en passant par des pathologies de dysrégulation de la prolifération kératinocytaire (papillomes, syndromes main-pied, éruptions de type kératose pilaire ou dyskératose acantholytique, kystes induits …) (pour revue, Vennepureddy et al., 2016).

3.7.5 : Les combinaisons de traitements.

Au regard du manque d'efficacité à long terme des traitements présentés précédemment lorsqu'ils sont utilisés séparément, les espoirs se tournent désormais vers des combinaisons de traitements. Ainsi, une étude clinique de phase 3 montre que le traitement avec une combinaison de Dabrafenib et de Trametinib (anti-BRAF et anti-MEK) permet d'améliorer significativement la survie des patients, et de ralentir la progression tumorale par rapport au traitement avec le seul Vemurafenib (anti- BRAF) (**Figure 13**) (Robert et al., 2015).

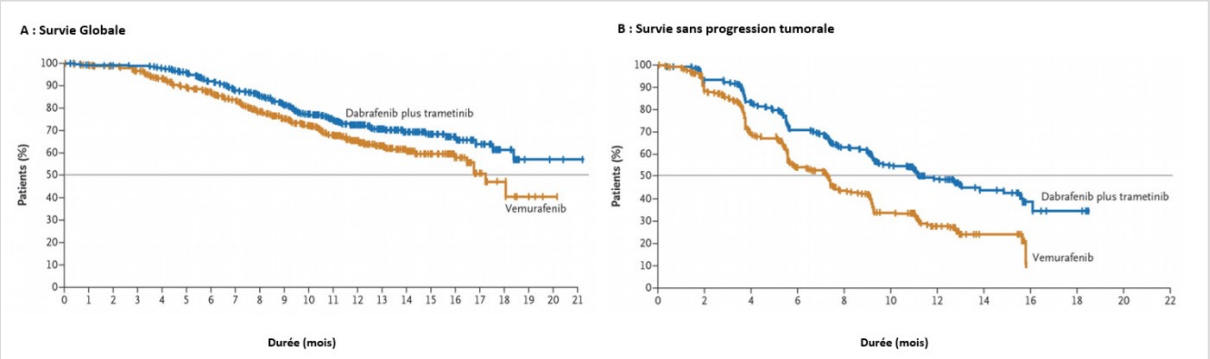


Figure 13 : Un traitement combinant Dabrafenib et Trametinib permet l'amélioration de la survie (A) et l'inhibition de la progression (B) par rapport au traitement par le Vemurafenib seul.

Courbes de Kaplan-Meier de survie globale (A) et de survie sans progression du mélanome (B) permettant de comparer les bénéfices de la combinaison thérapeutique du Dabrafénib et du Tramedinib. **A :** rapport de risque : 0,69 (Intervalle de confiance : 95%, de 0,53 à 0,89 ; P = 0,005. **B :** rapport de risque : 0,56 (Intervalle de confiance : 95%, 0,46 to 0,69; P<0.001). *(Source : Robert et al., 2015 - DOI:10.1056/NEJMoa1412690 – reproduced with permission from NEJM ©Massachusetts Medical Society).*

D'autres combinaisons de traitements pourraient être intéressantes. En effet, alors que le Vemurafenib permet une réponse rapide mais qui ne dure pas dans le temps (**Figure 14 B)**, l'immunothérapie permet une réponse plus stable dans temps mais chez une fraction des patients seulement (**Figure 14 A)**. Aussi, certains auteurs proposent d'associer le Vemurafenib et l'Ipilimumab pour tenter de créer une synergie thérapeutique qui permettrait d'obtenir une amélioration rapide et pérenne de l'état des patients tel que schématisé en **Figure 15** (Sharma et Allison, 2015). Une étude clinique sur des patients présentant des mélanomes de stades avancés semble indiquer que ce type de thérapie (Vemurafenib + Ipilimumab) permet dans certains cas une nette amélioration de l'état de santé des patients, bien que les effets secondaires doivent être surveillés de près car le traitement présente une forte toxicité hépatique (Hassel et al., 2016).

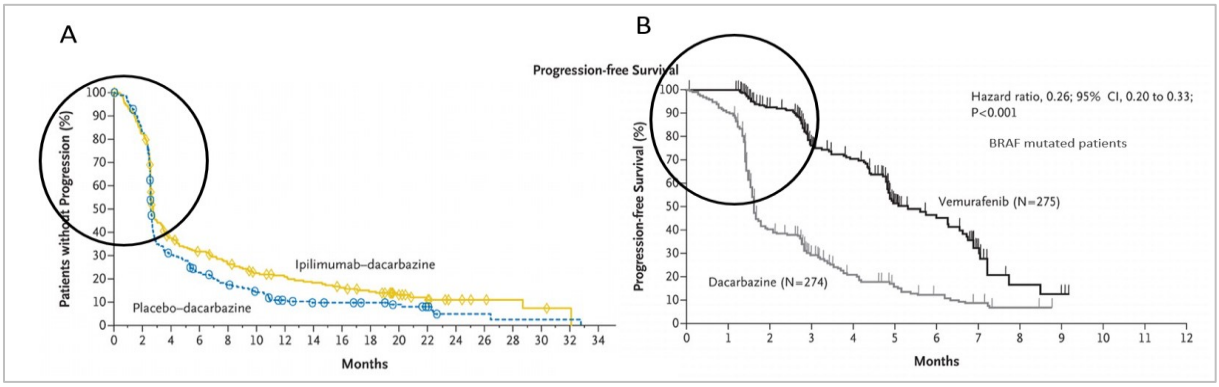


Figure 14 : Courbes de « Kaplan-Meier » de survie sans progression des patients atteints de mélanome qui sont traités par l'Ipilimumab + Dacarbazine (A) ou par le Vemurafenib (B).

(Sources : D'après Helwick 2011 : http://www.ascopost.com/issues/october-15-2011-supplement/adjuvant-treatment-still-standard-in-melanoma.aspx d'après les publications de (Chapman et al. DOI: 10.1056/NEJMoa1103782, 2011; Wolchok et al., 2011 *DOI: 10.1056/NEJMoa1104621 – reproduced with permission from NEJM. © Massachusetts Medical Society).*

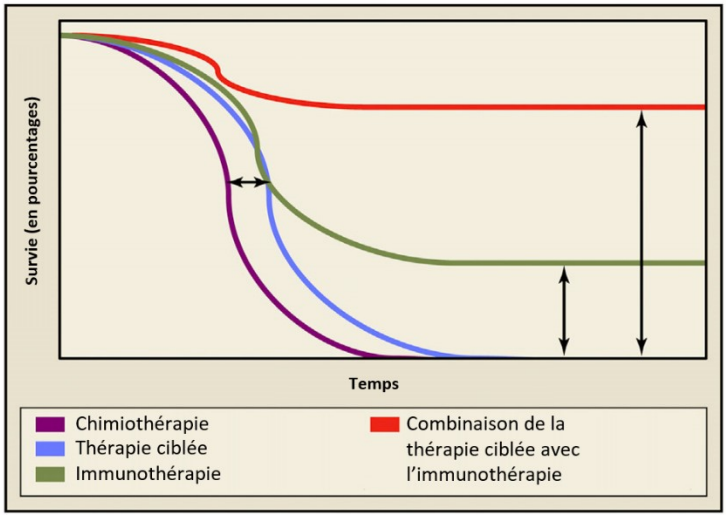


Figure 15 : Représentation schématique des courbes de survie « Kaplan-Meier » hypothétiques représentant l'intérêt théorique des combinaisons thérapeutiques.

La thérapie ciblé permet une amélioration rapide mais temporaire des patients éligibles (mutés $BRAF^{V600E}$), l'immunothérapie permet une amélioration plus durable des patients. Les nouveaux espoirs se portent sur la combinaison de ces thérapies qui devrait apporter une amélioration à la fois rapide et durable de la réponse aux traitements, permettant une amélioration du taux de survie des patients. *(Source : Reprinted from Cell, Volume 161, Issue 2, p205–214, 9 April 2015 , Sharma et Allison Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential Copyright 2015, with permission from Elsevier - DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.030 - autorisation RightsLink / Elsevier n° : 4060311041724).*

Les limitations que présentent les divers traitements à disposition des soignants, ainsi que les études qui démontrent l'efficacité des combinaisons de traitements (voir Hassel et al., 2016), soulignent l'importance que représente la compréhension des mécanismes qui soutiennent le développement du mélanome afin de pouvoir amener de nouveaux espoirs thérapeutiques. Ces mécanismes sont présentés dans la partie II ci-après. Il est toutefois intéressant d'évoquer les espoirs thérapeutiques qui s'en dégagent.

Parmi ces nouveaux espoirs thérapeutiques, une molécule actuellement en développement clinique, le SAR260301, a été identifiée par une étude récente pour son inhibition de la voie PI3K. Ce traitement contourne la perte d'activité de PTEN qui survient dans 10 à 30 % des mélanomes. L'étude rapporte qu'un traitement par SAR260301 concomitant à un traitement au Vemurafenib (anti-BRAF) ou au Selumetinib (anti-MEK) permettrait de potentialiser les effets de l'inhibition des MAPK, puisque cela inhibe la croissance de cellules de mélanome humain lors de xénogreffe chez la souris SCID (Bonnevaux et al., 2016). Une deuxième étude montre que l'activation de la β-caténine par le biais d'un inhibiteur de GSK3β, le LY2090314, permet d'induire l'apoptose dans les cellules de mélanome, y compris lors de résistance acquise aux traitements anti BRAF. Cela permet de retarder la croissance tumorale de cellules de mélanome lors de xénogreffes chez la souris nude (Atkinson et al., 2015). Cependant, l'utilisation de ces combinaisons de traitements n'est pas encore documentée chez les patients.

De nouvelles combinaisons de traitements, pourraient voir le jour dans les prochaines années. En effet, l'apparition de résistances aux traitements d'inhibition de la voie BRAF, s'accompagne de l'expression de PD-L1 dans un panel de lignées cellulaires de mélanome (Atefi et al., 2014). De plus, chez les patients traités avec des inhibiteurs de BRAF on observe une augmentation de l'expression des protéines anti apoptotiques de la famille BCL-2 ; et dans les cellules de mélanome l'inhibition concomitante de BRAF avec du PLX4720 (un précurseur du Vemurafenib) et de BCL2 avec du Navitoclax diminue la viabilité des cellules et réduit la croissance tumorale lors de xénogreffes chez la souris nude (Frederick et al., 2014). Ainsi, il apparait qu'à l'instar de ce qui est fait avec CTLA-4, de nouvelles stratégies

thérapeutiques pourrait voir le jour en associant aux traitements de la voie BRAF, des traitements ciblant PD-L1 et les protéines de la famille BCL2 (Atefi et al., 2014; Frederick et al., 2014).

Pour conclure, tel que nous l'avons évoqué, il est admis aujourd'hui qu'il existe au sein des lésions différentes sous-populations de cellules, dont des populations de cellules initiatrices de mélanome qui sont associées à une perte d'expression de MITF, et à une plus forte résistance aux traitements. Ces sous-populations présentent une hétérogénéité phénotypique, et une hétérogénéité d'expression et d'activation des voies de signalisation impliquées dans le mélanome (Kovacs et al., 2016).

Il est probable que les traitements utilisés ne ciblent que certaines sous-populations, épargnant les cellules souches tumorales. Cela pourrait expliquer les problèmes de résistances et de rechutes après les traitements. Une récente découverte apporte un espoir à ce sujet, avec un traitement qui combine un inhibiteur de BCL2, ABT-737, à un inhibiteur de MCL-1 (famille des protéines BCL2), SC-2001, permet de cibler les cellules initiatrices en diminuant leur capacité de tumorigenèse *in vivo* lors de xénogreffes, en induisant l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Bim et Noxa (Atkinson et al., 2015).

Partie II : Génétique du mélanome

Le mélanome cutané se développe à partir de la transformation maligne de mélanocytes. Mais avant que le mélanocyte ne devienne une cellule invasive de mélanome, plusieurs évènements génétiques doivent se produire. Lors du développement et de la progression canonique du mélanome, dans un premier temps la cellule transformée prolifère de façon anarchique et échappe à la sénescence durant la phase RGP. Puis lors de la phase VGP, la cellule acquiert la capacité de dégrader la JDE et d'envahir le derme (représentation schématique en **Figure 10**, page 39). Ces phénotypes prolifératifs et invasifs sont les conséquences d'altérations génétiques que nous allons à présent étudier.

1 : MITF

1.1 : Le gène MITF et ses isoformes

"Microphthalmia- associated Transcription Factor" plus communément appelé MITF, est un facteur de transcription de la famille des MIT (MIcrophthalmia Transcription factor) contenant un motif de dimérisation « basic helix-loop-helix Leucin-zipper », avec un domaine de transactivation et un domaine de liaison à l'ADN (Hemesath et al., 1994).

Le nom MITF vient du fait que les souris invalidées pour ce gène (allèle mutant $MITF^{mi}$), sont atteintes de microphtalmie, mais ces souris sont également atteintes d'un défaut de pigmentation imputable à l'absence de mélanocytes dans la peau. En effet, MITF est crucial pour l'établissement du lignage mélanocytaire, depuis les précurseurs de la crête neurale, jusqu'à la différenciation et à la régulation de l'activité et la survie des mélanocytes à l'âge adulte (Goding, 2000).

Le gène MITF code 9 isoformes sous le contrôle de 9 promoteurs différents qui permettent d'avoir des profils d'expression tissu-spécifiques de ces isoformes, dont les structures diffèrent dans leurs régions N-terminales codées par l'exon1. L'isoforme MITF- M est spécifique du lignage mélanocytaire (pour revue, Widlund et Fisher, 2003), et sa fonction au sein du mélanocyte est modulée grâce à son épissage alternatif qui permet de coder 4 isoformes MITF – M (M 2a-6a, M 2a-6b, M2b-6a, M 2b-6b) (Denat et Larue, 2007). Par souci de simplicité pour la suite, nous l'appellerons simplement MITF.

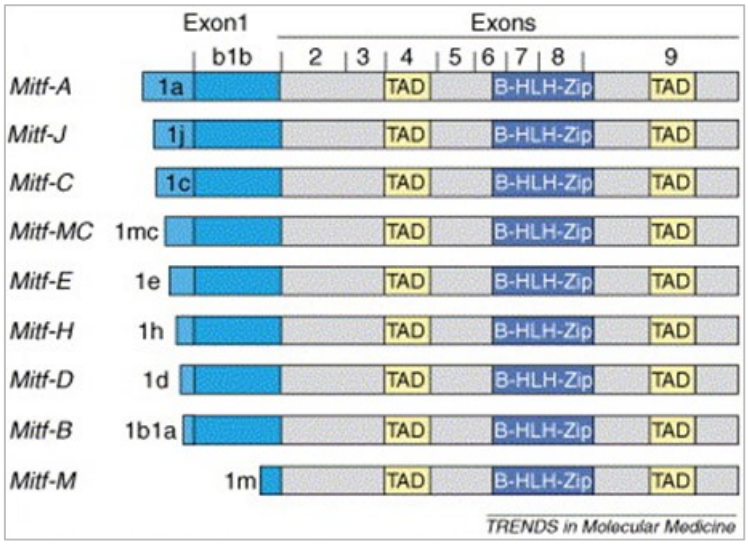


Figure 16 : Représentation schématique des neuf isoformes de MITF.

Les 9 promoteurs contrôlent 9 isoformes qui diffèrent par leurs extrémités 5' (exon 1) et par leurs profils d'expression. L'isoforme M est spécifique du lignage mélanocytaire. Toutes ces isoformes contiennent le motif de dimérisation « basic helix-loop-helix Leucin-zipper » (B-HLH-Zip), et le domaine de transactivation (TAD). *(Source* : Reprinted from Trends in molecular medicine, Volume 12, Issue 9, p406–414, September 2006 , *Levy et al.*, MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene, Copyright 2006, with permission from Elsevier - *DOI: 10.1016/j.molmed.2006.07.008 – autorisation RightsLink / Elsevier n° :* 4060311347124).

1.2 : Régulation de l'expression de MITF

Tel que nous l'avons évoqué dans la partie régulation de la fonction du mélanocyte, l'expression de MITF est régulée en grande partie par l'hormone mélanotrope α-MSH (α-Melanocyte Stimulating Hormone) sécrétée par les kératinocytes. α-MSH va se fixer sur le récepteur MC1R (MelanoCortin1

Receptor) exprimé par le mélanocyte. Cela stimule l'activation de la voie de l'AMPc (Adénosine Mono-Phosphate cyclique), et en particulier PKA (Protéine Kinase A) qui phosphoryle et active le facteur de transcription CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein), qui va alors induire l'expression de MITF (voir Levy et al., 2006). Par ailleurs, l'expression de MITF est également induite par d'autres voies de signalisation, et d'autres facteurs de transcription (pour revue, Hartman et Czyz, 2015; Osawa, 2008), dont la voie WNT/β-caténine et la voie MAPK BRAF que nous verrons par la suite.

1.3 : Régulation de l'activité de MITF

L'activité de la protéine MITF fait l'objet de régulations à travers des modifications post-transcriptionnelles telles que des phosphorylations et des sumoylations (pour revue, Hartman et Czyz, 2015). Ainsi, MITF présente plusieurs sites de phosphorylation par ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase, Ser73) $p90^{RSK}$ (Ser409), GSK3β (Ser409 et Ser298), et p38 (Ser307). L'état de phosphorylation de ces différents résidus, régule l'activité transcriptionnelle de MITF, mais également sa dégradation par le protéasome. MITF est également susceptible d'être sumoylé en position Lys182 et Lys316. Il a été montré que la sumoylation de MITF régule son activité transcriptionnelle par régulation de son affinité pour les promoteurs de certains gènes cibles impliqués notamment dans la croissance, la prolifération et l'inflammation (Bertolotto et al., 2011; Murakami et Arnheiter, 2005).

1.4 : Fonction de MITF dans le mélanocyte

MITF contrôle la pigmentation cutanée, à travers la modulation de l'activité mélanocytaire. Il régule la transcription de ses gènes cibles en reconnaissant dans leurs promoteurs une séquence « E-box » (CA [T/G] GTG) (Goding, 2000). En effet, MITF est nécessaire à l'expression des enzymes responsables de la mélanogenèse Tyrosinase, Tyrp1 et Tyrp2, et de Pmel17 (pour revue, Levy et al., 2006) et Rab27a (Chiaverini et al., 2008) qui sont impliquées dans la synthèse et le transport des mélanosomes.

MITF régule également la survie des mélanoblastes et des mélanocytes, notamment en induisant l'expression de gènes tels que HIF1α (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha), BCL2A1 (BCL2-Related Protein A1) et de BCL2 (B-Cell Lymphoma 2) qui est d'ailleurs indispensable pour le développement des cellules souches mélanocytaires. MITF favorise de plus la prolifération en induisant l'expression du facteur de transcription TBX2 (T-Box transcription factor 2) qui inhibe la transcription de $p19^{ARF}$ et $p21^{CIP1}$ (pour revue, Cheli et al., 2010) ; et qui est également recruté sur le promoteur de Ccnd1 et favorise ainsi l'expression de Cycline D1 impliquée dans le cycle cellulaire (Pan et al., 2015a). MITF favorise également la prolifération du mélanocyte en induisant l'expression de CDK2, et en inhibant son répresseur $p27^{KIP1}$ à travers l'induction d'expression de DIAPH1 (Diaphanous homolog 1). Ainsi, il a été montré que l'inhibition de MITF provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 via l'expression de $p27^{KIP1}$.

Cependant, MITF est également recruté sur les promoteurs des gènes codant de $P21^{CIP1}$ et de $p16^{INK4A}$ et peut ainsi induire un arrêt du cycle en phase G1/S (pour revue, Cheli et al., 2010).

Enfin, il a aussi été montré que MITF promeut l'invasion à travers l'induction directe de l'expression du gène MET et du gène SNAI2 (Snail2 aussi connu comme SLUG) qui jouent un rôle important lors de l'embryogenèse dans la migration des cellules de crête neurale dont font partie les précurseurs mélanocytaires. Cependant en induisant l'expression de DIAPH1, MITF inhibe également la migration en favorisant la polymérisation de l'actine (pour revue, Cheli et al., 2010).

1.5 : Rôle de MITF dans le mélanome

MITF est rarement muté dans le mélanome. Une substitution E318K qui affecte le site de sumoylation Lys 316 représente la mutation héréditaire la plus fréquente dans les cas de mélanomes familiaux et chez les patients atteints de multiples mélanomes primaires (pour revue, Paillerets et al., 2014). *In vitro*, cette mutation semble promouvoir l'affinité de MITF avec certains de ses gènes cibles impliqués dans la croissance, la prolifération et l'inflammation (Bertolotto et al., 2011). Chez les patients de Lettonie, il est toutefois surprenant de constater que cette mutation n'est jamais présente, même dans les cas de mélanomes familiaux (Ozola et Pjanova, 2015).

MITF est localisé au centre de la zone 3p13-3p14 du chromosome 3 qui est sujette à des amplifications. Ces amplifications sont retrouvées dans 10% des mélanomes cutanés primaires et dans plus de 20% des métastases, alors que dans les nævi aucune amplification n'est mise en évidence. La présence de cette amplification dans les lésions est associée à un taux de survie des patients à 5 ans diminué de moitié (Garraway et al., 2005).

De plus, ces auteurs montrent que MITF peut être un oncogène, car la surexpression de MITF et de $BRAF^{V600E}$ semble favoriser la transformation de mélanocytes *in vitro* en leur permettant de proliférer en l'absence de facteurs de croissance (Garraway et al., 2005). MITF est essentiel à la survie et à la prolifération des cellules de mélanome et une inhibition prolongée de son expression est responsable de l'induction de la sénescence des cellules par p53 en réponse à l'accumulation de dommages à l'ADN causés par des catastrophes mitotiques (Giuliano et al., 2010).

Cependant, lorsque l'expression de MITF est élevée, cela inhibe la prolifération induite par BRAF dans des mélanocytes et des cellules de mélanome (pour revue, Wellbrock et Arozarena, 2015). Il apparait aujourd'hui que le niveau d'expression de MITF dans le mélanome contrôle la balance entre différenciation/sénescence, survie et prolifération/transformation (Goding et Meyskens, 2006). En effet, les tumeurs présentent une hétérogénéité d'expression de MITF, avec des sous-populations négatives et positives. De plus, au sein des populations cellulaires positives exprimant MITF, il existe également une hétérogénéité en terme de niveaux d'expression de MITF (Ennen et al., 2015). Ainsi, une expression forte de MITF serait responsable de la sénescence et de la redifférenciation des cellules de mélanome en favorisant la production de mélanine, alors qu'une expression modérée de MITF stimulerait leur prolifération en réponse à une régulation fine par la voie BRAF (pour revue, Goding et Meyskens, 2006; Gray-Schopfer et al., 2007; Hoek et Goding, 2010). Enfin une perte d'expression de MITF serait associée à un phénotype invasif des cellules de mélanome (Ennen et al., 2015; pour revue, Wellbrock et Arozarena, 2015).

Ainsi, certains auteurs proposent que les variations de niveaux d'expression de MITF permettent aux cellules initiatrices de mélanome d'effectuer des « switchs » phénotypiques entre invasion et prolifération (Cheli et al., 2011; Hoek et al., 2008b). Cependant, les travaux d'Ennen et al. publiés en 2015 montrent que les lignée cellules de mélanome qui n'expriment pas MITF ne semblent pas capables de différencier une sous population qui réexprime MITF. Cela suggère que dans ces cellules, l'expression de MITF est « éteinte », probablement par le biais de l'hyperméthylation qui est observée dans les métastases de mélanomes de stades avancés comme dans les lignées cellulaires (Lauss et al., 2015).

2 : Les voies des MAPK

Les voies de signalisation des MAPK, dont le nom est issu de l'anglais Mitogen-Activated Protein Kinases, mettent en jeu des cascades de phosphorylations activatrices des différents acteurs moléculaires en réponse à un stimulus cellulaire. Les acteurs de ces voies sont des protéines kinases spécifiques des acides aminés sérine, thréonine et tyrosine. Leur activité est elle-même régulée via la phosphorylation de ces résidus au sein de leur séquence. L'activation de ces voies répond à l'activation de récepteurs tels que les RCPG (Récepteurs Couplés aux Protéines G) (Daub et al., 1996) et les RTK (Récepteurs à Tyrosine Kinase), mais également à des récepteurs aux protéines matricielles telles que les intégrines (Schlaepfer et al., 1994).

Il existe plusieurs grandes voies MAPK : ERK (Extracellular signal–Regulated Kinase) ; JNK (c-Jun N-terminal Kinase) ; et p38MAPK. Leurs rôles physiologiques sont de réguler des fonctions cellulaires importantes telles que la prolifération, la survie, l'apoptose et la différenciation, via la modulation de l'expression de gènes cibles en réponse à l'activation des récepteurs. Dans le présent manuscrit nous ne détaillerons que les acteurs de la voie NRAS - BRAF - MEK – ERK (respectivement : Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog, v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B, Mitogen-activated protein Kinase kinase, Extracellular signal-Regulated Kinase) qui sont activement étudiés pour l'élaboration de traitements contre le mélanome.

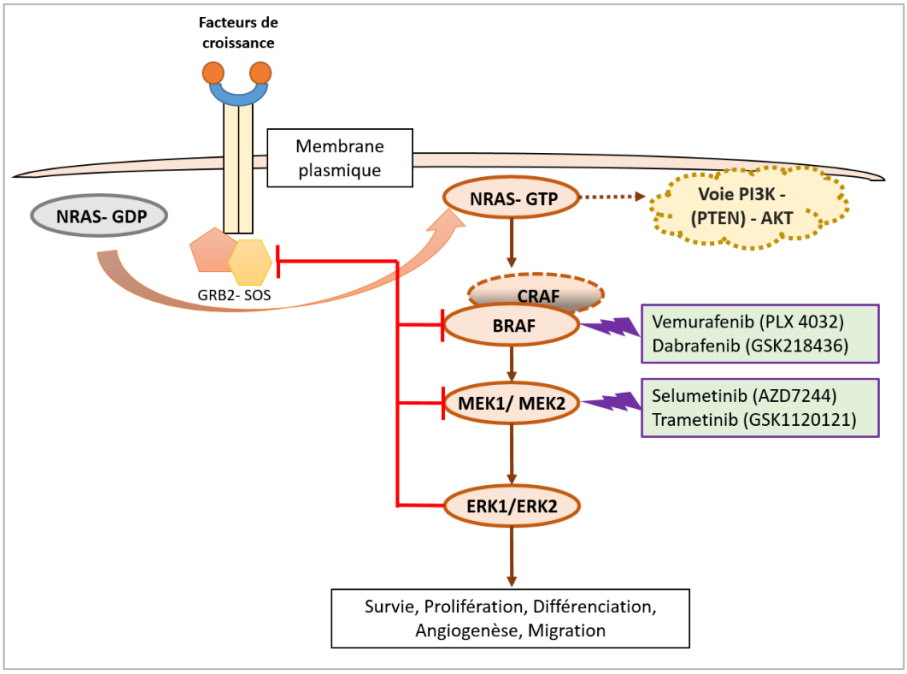


Figure 17 : Représentation schématique simplifiée de la voie ERK, des rétrocontrôles négatifs et des principaux traitements utilisés pour inhiber cette voie dans le traitement du mélanome

La fixation du ligand active le récepteur, ce dernier recrute à la membrane et active le complexe adaptateur (adapter complex en anglais) GRB2-SOS. GRB2 possède un domaine SH2 (SRC Homology domain) qui reconnait les tyrosines phosphorylées du récepteur activé. GRB2 peut alors recruter via son domaine SH3 SOS (Son Of Sevenless) une protéine GEF (GDP Exchange Factor) qui va remplacer le GDP par un GTP sur RAS, une petite protéine G. Bien qu'il existe également H- et K- RAS, dans le mélanome la plus étudiée est NRAS. NRAS-GTP phosphoryle les protéines RAF, BRAF et CRAF qui peuvent former des homodimères et des hétérodimères. BRAF et CRAF phosphorylent MEK1/2, qui activent ERK1/2. ERK favorise la phosphorylation de nombreux substrat et va ainsi pouvoir réguler la survie, la prolifération, la différenciation, la migration, l'angiogenèse etc. Plusieurs boucles de rétrocontrôle existent. Ici de façon non exhaustives sont représentées le rétrocontrôle de SOS et MEK par l'activation de ERK, et l'inhibition de l'activation de la voie par BRAF. Plusieurs inhibiteurs utilisés pour freiner la progression du mélanome sont représentés : 2 inhibiteurs de BRAF (Vemurafenib et Dabrafenib) et 2 inhibiteurs de MEK (Selumetinib et Trametinib). *(D'après Maik-Rachline & Seger,2016)*.

Comme les voies des MAPK sont impliquées dans la signalisation en aval des facteurs de croissance et que leurs activations favorisent la survie et la prolifération, il n'est pas étonnant que les dérégulations de ces voies soient impliquées dans la progression de divers cancers. Des mutations touchent fréquemment les acteurs de ces voies, en particulier sur des résidus sérine, thréonine et tyrosine dont la phosphorylation permet l'activation de ces protéines. En effet, les mutations de ces résidus conduisent à une activation constitutive pathologique de la voie de signalisation, et font partie des phénomènes oncogènes majeurs impliqués dans le développement des cancers.

2.1 : La voie NRAS/BRAF/MEK/ERK dans le mélanome

La voie NRAS/BRAF/MEK/ERK est la voie de signalisation la plus souvent impliquée dans le mélanome. Une mutation touchant NRAS et / ou BRAF est retrouvée dans environ 80% des cas de mélanomes et la fréquence de ces mutations augmente avec la progression du mélanome (Greene et al., 2009). Il est cependant intéressant de noter qu'il est rare d'observer dans une même tumeur une mutation RAF concomitante à une mutation RAS (Goel et al., 2006).

2.1.1 : NRAS dans le mélanome

NRAS fait partie de la famille des GTPases dont les membres sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires. Environ 20% des patients atteints de mélanome présentent une mutation sur le gène NRAS, $NRAS^{Q61K}$, qui code une protéine constitutivement active. Les autres protéines RAS, HRAS et KRAS sont également mutées dans les cancers, mais dans le mélanome, la rareté des mutations touchant ces protéines (1% et 2% respectivement) (pour revue, Lau et Haigis, 2009) souligne l'importance du contexte cellulaire quant aux fonctions précises de ces protéines G.

2.1.2 : BRAF dans le mélanome

En aval de RAS et en amont de MEK, RAF est une sérine/thréonine kinase qui existe en 3 isoformes codées par les gènes : ARAF, BRAF et CRAF. Ces protéines sont activées par des phosphorylations sur des résidus sérine et tyrosine, mais la structure moléculaire de BRAF fait qu'elle nécessite moins de phosphorylations pour être activée comparativement à ARAF et CRAF (pour revue, Wellbrock et al., 2004). Aussi, cela explique pourquoi BRAF est le plus souvent muté dans les cancers, et dans le mélanome en particulier puisqu'une seule mutation suffit à obtenir une protéine constitutivement active.

Les fonctions d'ARAF, BRAF et CRAF ne sont pas redondantes, ce qui signifie qu'une isoforme ne peut pas se substituer à une autre. BRAF a la capacité d'activer CRAF et ARAF, et il est intéressant de constater que les mutations qui touchent ARAF dans le cancer inhibent son activation. Enfin, ARAF joue le rôle d'une protéine d'échafaudage qui stabilise les dimères BRAF-CRAF, et de façon paradoxale, ARAF se trouve suractivé lors du traitement des cellules avec des inhibiteurs des RAF (SB590885) (Rebocho et Marais, 2013).

Dans le mélanome 50 à 60% des patients présentent une mutation de BRAF (Goel et al., 2006), qui est une substitution V600E dans 90% des cas (Wan et al., 2004). De façon intéressante, cette forme constitutivement active de BRAF est retrouvée assez fréquemment dans les nævi bénins, sans toutefois que cela soit associé à une progression tumorale. Ainsi, cela montre que le développement du mélanome ne peut se résumer à la seule mutation d'un acteur isolé puisque les cellules composant le nævi sont en sénescence en dépit de cette mutation.

Cependant, il a été récemment démontré dans le cancer colorectal que l'activation constitutive de $BRAF^{V600E}$ conduit à une inhibition de MLH1 par hypermethylation (Fang et al., 2014a) associée à un défaut d'induction de l'apoptose médiée par la caspase 3 (Hassen et al., 2016). MLH1 est une protéine impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN de type mésappariement. Bien que cela reste à confirmer dans le mélanome, cette perte d'expression médiée par l'activation de BRAF suggère que les contextes mutés $BRAF^{V600*}$ peuvent être à l'origine d'une relative instabilité génétique, tant du fait de la résistance à l'apoptose, que par un défaut de réparation des cassures de l'ADN induites par les UV (ce défaut est fréquemment observé dans les cellules de mélanome, Murray et al., 2015). Ainsi, dans les nævi dont les cellules sont en sénescence, la mutation de $BRAF^{V600E}$ pourrait être à l'origine d'autres évènements de transformation via l'accumulation de mutations induites par les UV.

2.1.3 : Effet de la suractivation de la voie NRAS/BRAF/MEK/ERK dans le mélanome

Dans le mélanome les altérations de la voie RAS/RAF/MEK/ERK sont particulièrement importantes, puisque 90% des mélanomes cutanés présentent une augmentation de l'activité de ERK, l'acteur en aval de cette voie. Cette suractivation favorise la survie et la prolifération des cellules, car l'entrée en phase S, et les niveaux d'expression de CyclinD1 et de $p27^{KIP1}$ sont dépendants du niveau d'activité de ERK (Bhatt et al., 2005).

Dans le mélanocyte cutané humain, l'activation de ERK en réponse à un facteur de croissance dépend du niveau d'adhérence médiée par les intégrines dans les cellules (Conner et al., 2003). Mais les mutations activatrices de NRAS et BRAF permettent la prolifération des cellules indépendamment de leur niveau d'adhérence, notamment grâce à la surexpression de Cycline D1 et à l'inhibition de l'expression de $p27^{KIP1}$ (Bhatt et al., 2005; Conner et al., 2003; Satyamoorthy et al., 2003).

Parmi les cibles de ERK se trouve le facteur de transcription MITF. Or, tel que nous l'avons vu précédemment, MITF favorise différents phénotypes selon son niveau d'expression (différenciation/sénescence, survie et prolifération/transformation). $BRAF^{V600E}$ favorise l'expression transcriptionnelle de MITF qui semble nécessaire à la prolifération induite par $BRAF^{V600E}$ dans les cellules de mélanome, notamment en régulant l'expression de CDK2, CDK4 et p21 (Wellbrock et al., 2008). De plus, ERK phosphoryle MITF, ce qui l'active mais favorise également sa dégradation (Wu et al., 2000). Ainsi, dans les cellules de mélanome le niveau de suractivation de ERK va être sélectionnée de façon à aboutir à une régulation fine de l'expression et de l'activité de MITF afin que cela favorise la prolifération et non la différenciation/sénescence (discuté dans Wellbrock et al., 2008).

L'activation de ERK en réponse à la mutation $BRAF^{V600E}$ dans le mélanome est également cruciale pour la survie des cellules de mélanome humain, car en induisant l'expression des protéines antiapoptotiques MCL1 et de BCL2 (Jiang et al., 2008), ERK inhibe l'apoptose médiée par le cytochrome C de la mitochondrie (Sheridan et al., 2008). Ainsi, un traitement avec un inhibiteur de MEK (U0126) diminue la phosphorylation de ERK et induit l'apoptose des cellules de mélanome humain en permettant l'activation des protéines proapoptotiques PUMA, Bak, Bax, Bad et Bim (Sheridan et al., 2008; Wang et al., 2007).

En accord avec ces observations, l'inhibition de MEK par le PD0325901 conduit à la diminution de la croissance des cellules de mélanome humain malin *in vitro* en favorisant l'expression de $p27^{KIP1}$ et en inhibant l'expression de Cycline D1, c-Myc, BCL-2 et Survivine. Le PD0325901 inhibe également la croissance tumorale *in vivo* lors de xénogreffes chez la souris nude (Ciuffreda et al., 2009). Dans cette étude, l'inhibition de MEK dans les cellules de mélanome humain M14 conduit également *in vitro* à une perte d'expression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et de CXCL8 (C-X-C motif chemokine Ligand 8 / Interleukine 8), deux facteurs impliqués dans l'angiogenèse. Cela suggère que la

suractivation de cette voie de signalisation dans le mélanome pourrait également favoriser la dissémination par l'induction de l'angiogenèse.

Cependant, bien que ces mutations de NRAS ou BRAF soient retrouvées dans la majorité des mélanomes, la suractivation de ERK n'est pas systématiquement la conséquence de ces mutations. En particulier, l'hyperméthylation du promoteur de RAP1GAP dans les tumeurs des patients favorise l'activation de ERK, et donc la prolifération, la survie et la migration, indépendamment du statut muté ou non muté de BRAF, et en l'absence de mutation NRAS (Zheng et al., 2009). En effet Rap1GAP est un inhibiteur de l'activation de la protéine G Rap1 (Rap1GTP) qui active ERK par phosphorylation. Ainsi, l'hyperméthylation du promoteur de Rap1GAP inhibe son expression et favorise l'activation de ERK par Rap1GTP.

De plus, les cellules de mélanomes sont également connues pour activer certaines voies de signalisation de façon autocrine, ce qui leur permet de devenir autonomes par rapport aux facteurs environnementaux (Lázár-Molnár et al., 2000; Li et al., 2001a). Ainsi, dans les mélanocytes primaires humains et plusieurs lignées de mélanomes de stades RGP, VGP et métastatiques, l'activation de ERK est favorisée par différents facteurs tels que le HGF, le bFGF et l'IL8 (Hepatocyte, basic Fibroblast Growth Factor, et InterLeukine8, respectivement) (Satyamoorthy et al., 2003), mais seules les cellules cancéreuses sécrètent ces facteurs pour induire une stimulation autocrine de la voie RAS/RAF (Rodeck et al., 1991). Ainsi, la sécrétion anormale de certains facteurs par les cellules de mélanome permettrait de suractiver cette voie de signalisation même en l'absence de mutations NRAS ou BRAF.

2.1.4 : L'activation de ERK et les modifications de la Matrice extracellulaire (MEC)

Jusqu'à présent, nous avons surtout étudié les dérégulations qui mènent à la suractivation de ERK, et les effets que cela produit notamment sur la prolifération et la survie des cellules. Mais cette suractivation joue également un rôle dans la migration, l'invasion et la dissémination des cellules en interagissant avec la MEC.

Une étude montre que dans les cellules de mélanome humain, l'inhibition de l'activation de ERK consécutive à l'inhibition de BRAF par siARN ou par le PLX4720, ainsi que l'inhibition de MEK par l'U0126, se traduit par une perte d'expression de TWIST1, un facteur de transcription impliqué dans l'EMT (Transition Epithélio Mésanchymateuse), et de la métalloprotéase MMP1 (Matrix MetalloProtease 1) (Weiss et al., 2012). Ces auteurs montrent dans plusieurs lignées cellulaires de mélanome, que l'expression ectopique de TWIST1 favorise l'expression de la MMP1, ce qui accroit l'invasion en 2D du Matrigel™ en chambre de Boyden, et l'invasion en 3D du collagène en sphéroïdes. Ainsi, cette étude montre que la suractivation de la voie BRAF dans le mélanome, en plus de favoriser la prolifération et la survie, favorise l'EMT et l'invasion.

Une autre étude montre *in vivo* par des xénogreffes chez la souris nude, que le traitement des cellules de mélanome humain avec du U0126 ou du PLX4032, un autre inhibiteur de BRAF connu sous le nom de Vemurafenib, inhibe l'expression de MMP1, mais conduit également à une diminution de sécrétion de la cytokine pro inflammatoire IL8 et à une augmentation de sécrétion de collagène I, sécrétion qui est encore augmentée en traitant en même temps les cellules avec du TGFβ (Jenkins et al., 2015).

Dans un modèle de mélanome murin il a été montré que l'ostéopontine induit une plus forte croissance tumorale et favorise la phosphorylation de MEK/ERK, ce qui va favoriser la sécrétion d'uPA, qui permet l'activation de la pro-MMP9 en métalloprotéase MMP9 qui dégrade notamment le collagène IV (Rangaswami et al., 2004). Dans ce modèle l'activation de ERK joue un rôle crucial dans la migration et l'invasion des cellules tumorales induite par l'ostéopontine *in vitro*, et *in vivo* l'ostéopontine mène à une plus forte expression de MMP9 et une plus forte croissance tumorale.

Dans l'ensemble, ces études montrent que les modulations de l'activité de ERK permettent la dégradation du collagène qui compose la MEC. Mais l'activité de ERK va également favoriser le dépôt d'autres composants matriciels qui peuvent en retour stimuler l'activation de certaines voies de signalisation dont fait partie la voie BRAF. C'est le cas en particulier de la Fibronectine et de la Tenascine C.

L'activité de ERK et la Fibronectine

Une étude montre que la fibronectine (FN) est surexprimée par les cellules de mélanome humain, *in situ* lors de la progression du mélanome, et qu'*in vitro* cette surexpression est induite par l'activation de ERK dans un contexte $BRAF^{V600E}$. Dans ces travaux, les auteurs montrent également que l'expression de FN confère un plus fort potentiel invasif aux cellules (Gaggioli et al., 2007). Une deuxième étude montre cette fois-ci que dans les cellules de mélanome humain, FN favorise la phosphorylation de ERK, dont dépendent l'expression de MMP9 et l'activation de MMP2 et de MT1-MMP (Banerji et al., 2008). Ainsi, ces deux travaux suggèrent qu'une boucle d'autoamplification peut être mise en place lors de l'invasion du mélanome puisque l'activation de ERK favorise, et est favorisée par l'expression de FN qui est responsable d'un plus fort potentiel invasif.

Une étude plus récente montre qu'au contraire, le traitement de certains patients $BRAF^{V600E}$ par le Vemurafenib induit une augmentation de l'expression de FN par les cellules tumorales. L'expression de FN chez ces patients est corrélée à un mauvais pronostic car cela semble promouvoir la résistance des cellules au traitement par le Vemurafenib, en stimulant la signalisation PI3K/AKT et l'expression de MCL1 (Myeloid Cell Leukemia 1), ce qui réduit la cytotoxicité due au traitement (Fedorenko et al., 2016).

Venant contrebalancer ces observations, il a été montré que des dépôts denses de FN inhibent la croissance tumorale du mélanome en réponse à l'expression du suppresseur de métastases NME1 (Nucleoside diphosphate kinase A). *In vitro*, cela inhibe la motilité cellulaire et l'invasion en favorisant la formation d'adhérences focales, et induit également un changement dans la morphologie des cellules qui semblent être plus étalées (Novak et al., 2015).

Dans l'ensemble ces études montrent que le contrôle précis du dépôt de FN par les cellules est important pour la progression du mélanome et peut permettre la survie des cellules et favoriser leur invasion, ou l'inhiber selon le contexte. Cela montre également que ce dépôt de FN est régulé par des interactions complexes, notamment avec la voie de signalisation BRAF.

L'activité de ERK et Tenascine C

Dans un modèle de mélanome murin, il a été montré que MEK/ERK module l'organisation de la Tenascine C (TNC) (Yang et al., 2004), un composant de la MEC qui joue un rôle dans l'EMT, et dont l'expression est très restreinte chez l'adulte. La TNC est exprimée en particulier sur les fronts de migration des cellules pour permettre la cicatrisation. Il a été démontré que TNC stimule l'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) grâce à des motifs « EGF-like » présentant une similarité avec l'EGF. TNC possède une faible affinité pour le récepteur EGFR, mais est néanmoins capable de l'activer sans provoquer son internalisation, ce qui favorise notamment la survie et l'invasion (pour revue, Shao et al., 2015). Dans le cas du mélanome, TNC est exprimée *in situ* chez les patients et semble constituer un bon biomarqueur puisque les niveaux de TNC dans le sang augmentent avec la progression du mélanome vers des stades avancés. Dans différentes lignées cellulaires de mélanome, TNC est exprimé et favorise l'invasion et la dissémination métastatique, ainsi que la survie des cellules disséminées. En particulier la stimulation de l'EGFR par les motifs EGF-like de TNC favorise l'invasion du Matrigel™ par des cellules qui adoptent une morphologie amiboïde (pour revue, Shao et al., 2015).

Dans leur étude de 2004, Yang et al. montrent que l'activation de ERK favorise le dépôt de TNC mais que cela requière l'activation des MMP. En effet, un traitement avec un inhibiteur général des MMP : GM6001, conduit à une diminution de 80% de l'assemblage de la TNC dans la MEC. Aussi, comme l'activation de ERK favorise à la fois l'expression de plusieurs MMP et le dépôt de TNC, dans l'ensemble, ERK favorise la modification de la MEC d'une façon qui permet la survie, la migration et l'invasion cellulaire du mélanome.

Comme ERK, qui est très souvent suractivé dans le mélanome, stimule TNC et que dans le même temps TNC stimule l'activation du récepteur EGFR en amont de plusieurs voies de signalisation, cela suggère qu'avec l'évolution du mélanome une boucle d'auto-amplification de l'activité de ERK peut se mettre en place via l'expression de TNC. Cela suggère également que ces phénomènes peuvent mener à l'activation pathologique d'autres voies de signalisation en aval des récepteurs aux facteurs de croissances.

Conclusion

En résumé, nous venons de voir que dans le mélanome, la voie NRAS/BRAF/MEK/ERK est souvent suractivée notamment par la présence dans 80% des cas de mélanome, d'une mutation activatrice de NRAS ou de BRAF. La suractivation de ERK va permettre la prolifération des cellules indépendamment de l'ancrage à la MEC ainsi que leur survie, notamment via l'expression de Cycline D1, MCL1 et BCL2 et l'inhibition de l'expression de $p27^{KIP1}$.

Lors de la progression du mélanome, l'activité de ERK induit également des modifications de la MEC qui vont pouvoir induire en retour une suractivation de la voie ERK, laissant supposer la mise en place de boucles d'autoamplification du signal. Cette modification de la MEC va permettre la survie, la migration et l'invasion, notamment par l'expression et l'activation de plusieurs protéases, de FN et de TNC, et par l'inhibition entre autre de l'expression du collagène I.

3 : La voie PI3K / PTEN / AKT

La voie de signalisation PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase)/ AKT (Protéine Kinase B) est exprimée de façon ubiquitaire et son activité est associée entre autres aux récepteurs de facteurs de croissance à tyrosine kinase et aux RCPG en amont, et en aval à la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (**Figure 18**). Elle met en œuvre une cascade d'activations enzymatiques par phosphorylations suite à l'activation du récepteur. Cette voie de signalisation communique à différents niveaux avec d'autres voies, notamment avec la voie RAS/RAF/MEK/ERK qui favorise son activité, entre autres au travers de l'activation de PI3K par RAS (pour revue, Steelman et al., 2011).

PI3K est capable de reconnaitre le récepteur activé, puis de phosphoryler le PIP2 en PIP3 (Phosphoinositol bis et tris Phosphate, respectivement), qui va alors recruter à la membrane la protéine AKT/PKB (Protein Kinase B) qui y sera activée par phosphorylation par l'intermédiaire de PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase-1). Une fois activée, AKT régule un ensemble de facteurs de transcription tels que FOXO1, FOXO4 et FOXO3A, qui contrôlent entre autres la prolifération et la survie cellulaire. AKT favorise également l'activation de mTOR qui inhibe p53 (donc l'apoptose et la sénescence) et qui promeut l'activité de synthèse protéique à travers 4EBP - Elf4E et p70S6K. L'activation de cette voie de signalisation est modérée par PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) qui à l'inverse inhibe l'activation d'AKT en induisant la déphosphorylation du PIP3.

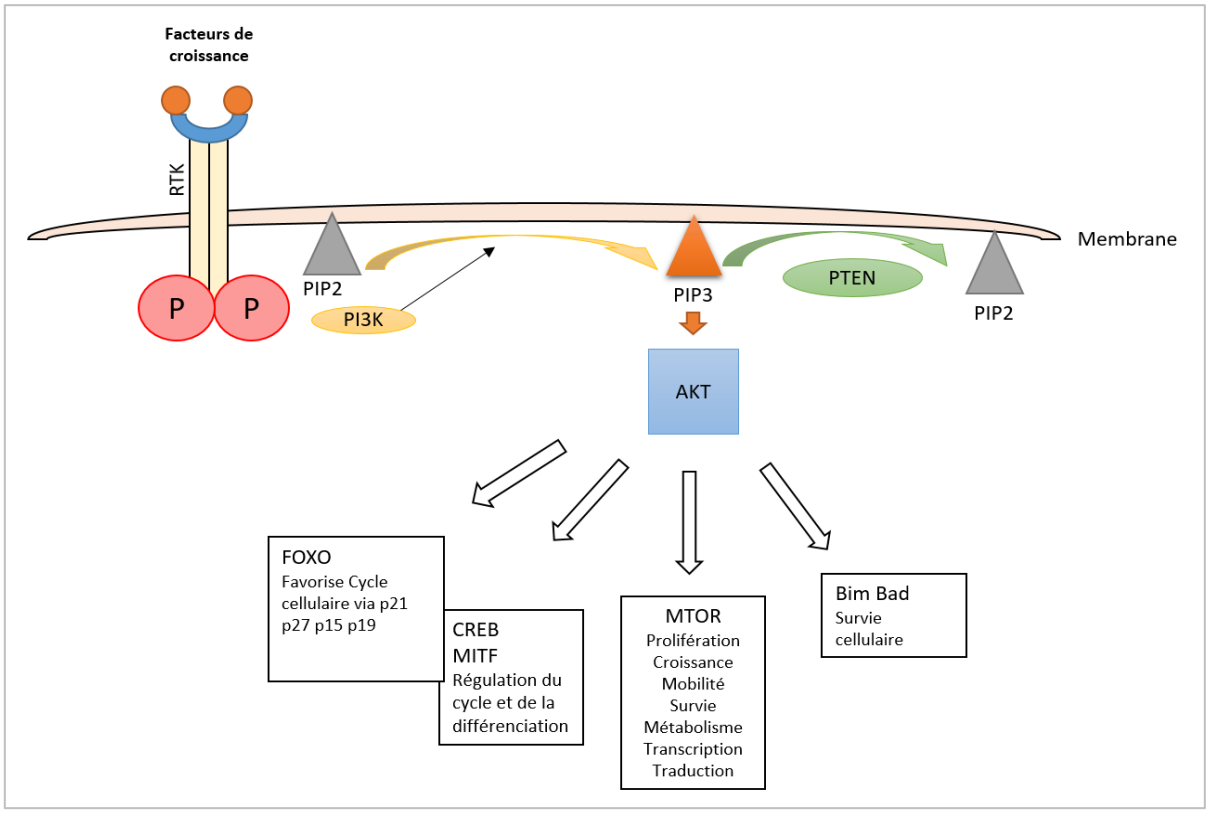


Figure 18 : Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K / PTEN / AKT.

La fixation du facteur de croissance sur le récepteur permet l'activation de la voie PI3K/PTEN/AKT qui commence par l'activation de PI3K qui phosphoryle le PIPI2 en PIP3. Le PIP3 permet l'activation d'AKT (PKB) qui régule différentes voies de signalisations importantes de la cellule. Cette activation est contrôlée par PTEN qui déphosphoryle le PIP3 en PIP2.

3.1 : PI3K

Les protéines PI3K sont des lipides-kinases avec une affinité pour les lipides membranaires à cycles inositol. La famille des PI3K se divise en trois classes selon leurs compositions, leurs spécificités en termes de régulation, et selon les signaux extracellulaires auxquels elles sont associées. Les PI3K des classes I et III sont des hétérodimères composés d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice, alors que les PI3K de la classe II ne requièrent pas de sous-unité régulatrice.

Les PI3K de la classe I sont les plus nombreuses et sont subdivisées en classe IA et IB :

- La classe IA regroupe des combinaisons d'isoformes des sous-unités suivantes : 5 isoformes régulatrices ; 3 isoformes catalytiques (p110α, p110β, et p110δ).
- La classe IB est constituée par l'association des isoformes régulatrices p101 ou p84 avec p110γ.

Les PI3K de classe II comptent 3 isoformes catalytiques (PI3K-C2α, PI3K-C2β, PI3K-C2γ).

La seule PI3K de classe III est composée des sous-unités catalytiques et régulatrices Vps34 et p150.

3.2 : PTEN

PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) est une phosphatase à double spécificité puisque c'est à la fois une protéine-phosphatase et une lipide-phosphatase. En effet, PTEN a une affinité pour les lipides membranaires à cycles inositol qui fait de PTEN un régulateur négatif majeur de la signalisation basée sur PI3K puisque PTEN déphosphoryle le PIP3 et empêche ainsi l'activation d'AKT. Tel que nous le verrons par la suite, PTEN est aujourd'hui considéré comme un suppresseur de tumeur important notamment via l'inhibition d'AKT.

3.3 : AKT

AKT également appelée PKB (Protéine Kinase B), est une sérine/thréonine kinase qui existe chez l'homme en 3 isoformes : PKBα, β et γ (AKT1, 2 et 3) dont les séquences protéiques présentent 80% d'homologies. Les protéines AKT ont un domaine PH (Pleckstrin Homology) en N-terminal qui permet le recrutement d'AKT à la membrane par le PIP3, ce qui favorise son activation par phosphorylation. Une fois activée, AKT diffuse dans le cytoplasme et active ses cibles par phosphorylation.

Parmi les cibles d'AKT on retrouve plusieurs protéines impliquées dans des voies de régulation du métabolisme. Entre autres, AKT induit l'activation du complexe mTORC1 (mammalian Target of Rapamycin Complex 1) qui favorise la synthèse protéique et la traduction. Notons que mTORC1 exerce un rétro- contrôle négatif sur AKT, alors que mTORC2 a au contraire un effet positif sur AKT en favorisant sa phosphorylation à la membrane (pour revue, Steelman et al., 2011).

De plus, AKT est capable d'inhiber GSK3β, ce qui favorise notamment la signalisation β-caténine (que nous verrons en Partie II.4) indépendamment de l'activation de la voie WNT. AKT favorise la prolifération et la survie en inhibant l'activation de protéines proapoptotiques telles que Bad (Liu et al., 2012a), et en augmentant l'activité d'acteurs antiapoptotiques tels que Mcl-1 via l'inhibition de GSK3β (Naughton et al., 2009). En inhibant les facteurs de transcription FOXO, AKT inhibe l'arrêt du cycle cellulaire en G1 médié par $p15^{INK4b}$, $p19^{INK4D}$ et $p27^{Kip1}$, (Dobson et al., 2011; Katayama et al., 2008). Enfin, la régulation du cycle cellulaire par la voie PI3K est également réalisée à travers la régulation directe de CREB dans le noyau par PTEN (Gu et al., 2011) et par AKT (Du et Montminy, 1998).

Dans le mélanocyte, AKT revêt une importance particulière car il régule CREB et β-caténine qui favorisent tous deux l'expression de MITF, le facteur de transcription spécifique du lignage mélanocytaire, ainsi que l'expression de certaines cibles transcriptionnelles de MITF tels que les gènes Tyr, Tyrp1, et Tyrp2 impliqués dans la mélanogenèse (voir **Figure 7** en page 29).

3.4 : La voie PI3K / PTEN / AKT dans le mélanome

Dans le mélanome, il est fréquent d'observer une hyperactivité de cette voie de signalisation, avec environ 41% des mélanomes qui présentent une mutation de l'un des acteurs de la voie. Le nombre de patients présentant des mutations dans PI3K ne dépasse pas les 5% (Shull et al., 2012). Dans le développement du mélanome, les principales altérations de cette voie sont des mutations inactivatrices de PTEN et activatrices d'AKT3. Ainsi, la progression tumorale s'accompagne d'une augmentation progressive du niveau de phosphorylation de AKT *in situ :* pas de phosphorylation dans les nævi bénins, phosphorylation modérée dans les nævi dysplasiques, phosphorylation forte et très forte dans les tumeurs primaires et les métastases, respectivement (pour revue, Madhunapantula et Robertson, 2009). Aussi, les mutations de PTEN et AKT3 font l'objet de nombreuses études quant à leur implication dans la physiopathologie du mélanome.

Les mutations de la voie PI3K/PTEN/AKT sont fréquemment associées à une mutation de $BRAF^{V600}$ (principalement $BRAF^{V600E}$) ou à une mutation NRAS dans 17% et 9% des cas respectivement, et permettent aux cellules de résister aux traitements d'inhibition de $BRAF^{V600E}$ (Shull et al., 2012).

Les altérations de PTEN dans la progression du mélanome

PTEN est aujourd'hui considéré comme un suppresseur de tumeur, et un inhibiteur puissant de la croissance du mélanome (pour revue, Madhunapantula et Robertson, 2009). En effet, PTEN et p53, un suppresseur de tumeur bien connu, forment un complexe dans le noyau, ce qui inhibe la dégradation de p53 et favorise son activité transcriptionnelle (Freeman et al., 2003). De plus, en inhibant l'activation d'AKT, la surexpression de PTEN favorise l'apoptose, et inhibe l'angiogenèse induite par les cellules humaines de mélanome. Enfin, cela inhibe leur migration grâce à une augmentation marquée de l'expression d'E-cadhérine à la surface des cellules (Stewart et al., 2002).

Plusieurs études ont identifié dans le mélanome une délétion dans le chromosome 10 de la région 10q23-24 qui contient le gène PTEN. Cependant, bien que 30% à 40% des lignées cellulaires portent une délétion homozygote de PTEN, seulement 5% à 15% des mélanomes non cultivés sont concernés (pour revue, Madhunapantula et Robertson, 2009). Notons que dans le cas particulier de *Xeroderma Pigmentosum,* il a été montré que le développement de mélanomes est favorisé par des mutations de PTEN (P95S, F154L, L325F) induites par les rayonnements UV (Wang et al., 2009b).

Bien que la perte homozygote de PTEN semble surtout être associée aux cellules de mélanome cultivées *in vitro*, les pertes d'hétérozygotie (LOH, « Loss Of Heterozygosity ») touchant PTEN sont fréquentes *in situ* chez les patients atteints de mélanomes précoces ou sporadiques de stades avancés. Ces LOH sont associées à des pronostics défavorables, puisque les tumeurs présentent alors un risque plus élevé de récurrence et de dissémination (Healy et al., 1998; Herbst et al., 1994; Isshiki et al., 1993).

De plus, il a été montré qu'en l'absence de mutation, l'expression de PTEN peut être inhibée de façon épigénétique (Zhou et al., 2000). Ainsi, l'activité transcriptionnelle du promoteur de PTEN est inhibée par méthylation chez plus de 60% des patients atteints de métastases (pour revue, Madhunapantula et Robertson, 2009). Cependant, il convient tout de même de signaler que deux études plus récentes ne sont pas parvenues à observer de méthylation du gène PTEN (Bonazzi et al., 2009; Liu et al., 2008).

Comme AKT favorise la prolifération, la survie et la migration, il est normal de constater que la perte d'activité de PTEN est un évènement qui favorise la progression du mélanome, puisque cela mène à une suractivation en particulier d'AKT3 tel que cela a été montré par Stahl et al. en 2004 sur des mélanocytes et des cellules de mélanome. De plus, la perte d'expression de PTEN dans plusieurs lignées est associée à l'expression des facteurs d'EMT SNAIL et TWIST qui favorisent le switch E-cadhérine vers N-cadhérine qui accompagne la progression du mélanome (Hao et al., 2012).

Lorsqu'elle est associée à une mutation $BRAF^{V600E}$, la perte de PTEN favorise le développement de mélanomes métastatiques (Dankort et al., 2009). De plus, il est intéressant de noter que la perte de PTEN dans le mélanome diminue la dépendance des cellules à l'activité de BRAF dans un contexte $BRAF^{V600E}$ (Xing et al., 2012), et semble être à l'origine de résistances aux traitements anti-BRAF (Deng et al., 2012; Paraiso et al., 2011).

Dans l'ensemble, ces travaux montrent que la perte d'activité de PTEN joue un rôle important dans le mélanome, et peut découler de différents événements génétiques et épigénétiques. De plus, comme les conditions de culture induisent une pression de sélection supplémentaire sur la perte homozygote de PTEN, cela suggère qu'un élément présent *in situ* dans la niche du mélanome favorise l'activation d'AKT malgré la présence de PTEN.

Les altérations d'AKT dans la progression du mélanome

Dans le mélanome, on retrouve une augmentation de l'expression et de l'activité d'AKT3 dans 60 à 70% des mélanomes sporadiques, ainsi qu'une amplification génique d'AKT3 dans environ 50% des mélanomes. Cette amplification est due entre autres à une augmentation du nombre de copies du long bras du chromosome 1 qui porte le gène. De plus, la perte de PTEN dans le mélanome mène préférentiellement à une activation d'AKT3 (pour revue, Madhunapantula et Robertson, 2009).

Lorsqu'il est activé, AKT3 va phosphoryler plusieurs acteurs dont GSK3β sur sa sérine S9, ce qui inhibe son activité et promeut entre autre la signalisation β-caténine qui est très impliquée dans la progression du mélanome. AKT3 promeut également le cycle cellulaire à travers l'expression des Cyclines D, ainsi que la survie, la transformation, l'invasion et la dissémination métastatique des cellules de mélanome à travers l'inhibition de la GTPase RhoB (pour revue, Madhunapantula et Robertson, 2009). Enfin, il a été montré dans un modèle de carcinome épidermoïde que l'activation d'AKT promeut l'EMT à travers NFkB qui induit l'expression de SNAIL, qui à son tour réprime l'expression d'E-cadhérine (Julien et al., 2007). Bien que cela reste à confirmer dans le mélanome, il est tentant d'imaginer un mécanisme similaire puisque les travaux de Stewart et al. en 2002, et Hao et al. en 2012 montrent que l'expression de PTEN au contraire réprime l'EMT médiée par SNAIL et TWIST et le switch E-cadhérine – N-cadhérine.

De façon intéressante, AKT phosphoryle également BRAF sur ses résidus S364 et S428, ce qui réduit son activité pour l'amener à des niveaux qui favorisent la prolifération des cellules de mélanome au lieu de l'inhiber (Cheung et al., 2008; Ikenoue et al., 2005). Bien que cela reste à prouver, cela s'explique probablement par le contrôle précis qu'exerce la voie BRAF/ERK sur l'expression et l'activation de MITF afin de promouvoir la prolifération et d'éviter la différenciation et l'entrée en sénescence des cellules, tel que nous avons évoqué précédemment dans la partie II.2 (La voie des MAPK) (discuté dans Wellbrock et al., 2008).

Conclusions : implication de la voie PI3K / PTEN / AKT dans le mélanome

L'activation de la voie PI3K / AKT dans le mélanome est associée à de mauvais pronostics puisque cette voie favorise la prolifération, la survie mais également l'EMT et l'invasion. De plus, cette voie est liée à la voie des MAPK dont les dérégulations font partie des phénomènes majeurs impliqués dans la physiopathologie du mélanome. En effet, ces voies sont liées par les protéines RAS, mais également par les récepteurs et les cibles qu'elles ont en commun, et par la régulation de BRAF par AKT. Enfin, la voie PI3K / AKT est également liée à la signalisation β-caténine via l'inhibition de GSK3β par AKT ; et à p53 dont l'activité est favorisée par PTEN.

4 : La β-caténine

4.1 : Structure de la β-caténine

Codée par le gène CTNNB1 (Catenin Beta 1), la β-caténine fut la première protéine caractérisée de la famille des protéines à motifs armadillo (ARM), dont font également partie la γ-caténine et la δ-caténine. En particulier, β-caténine et γ-caténine sont issues d'une duplication de gènes ancestrale retrouvée jusque chez les cordés qui confère à ces deux protéines des fonctions différentes malgré leur homologie structurelle (Zhao et al., 2011 ; Aktary et Pasdar, 2012). Ces protéines présentent dans leur structure un domaine caractéristique d'environ 40 résidus appelé motif ARM.

Chez l'Homme, la protéine β-caténine compte 781 acides aminés. La région N-terminale est particulièrement importante pour les fonctions membranaires de β-caténine, pour son interaction avec α-caténine et Legless/BcCL9, mais aussi pour sa régulation à travers un motif linéaire court dont la phosphorylation en Ser37 et Thr41 promeut la dégradation de β-caténine par la E3 Ubiquitine ligase (Staal et al., 2002). La région centrale qui s'étend du résidu 141 au résidu 664 est composée de 12 motifs ARM. Cette région constitue une zone rigide « d'échafaudage » (scaffold en anglais) avec laquelle interagissent la plupart des partenaires de la β-caténine (pour revue, Valenta et al., 2012).

Une particularité de la structure de β-caténine (pour revue, Gottardi et Peifer, 2008) vient du fait que les 2 premiers motifs sont fusionnés en 1 seule hélice α. Une deuxième particularité vient du domaine C-terminal. En effet, alors que les prédictions bio-informatiques prévoyaient 13 motifs ARM pour β-caténine (Peifer et Wieschaus, 1990), les études structurelles suggèrent que le 13ème motif prédit est en fait inclus avec la région *« N-terminale »* du domaine C-terminal de la séquence dans un motif appelé hélice C (résidus 667 à 683) (Huber et al., 1997; Xing et al., 2008). Cette hélice C présente une forte activité de transactivation des partenaires de β-caténine et semble nécessaire à la transcription en aval de la voie WNT canonique que nous verrons par la suite (Vleminckx et al., 1999; Xing et al., 2008), mais ne semble pas être nécessaire aux fonctions membranaires de la β-caténine.

La structure tridimensionnelle de β-caténine permet une régulation par les domaines N- et C-terminaux capables de se replier sur la région centrale et de masquer les sites d'interactions des motifs ARM, empêchant ainsi la fixation de certains partenaires. Entre autres, l'hélice C est capable de recouvrir les résidus hydrophobes du 12ème motif ARM (Xing et al., 2008 ; Gottardi et Peifer, 2008).

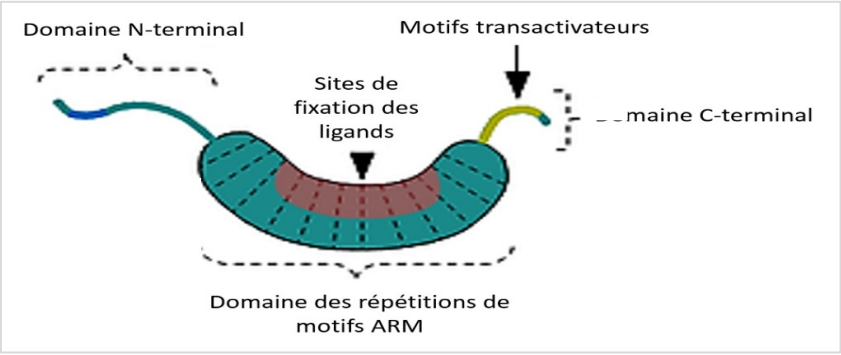


Figure 19 : Représentation schématique simplifiée de la structure protéique de β-caténine.

Le domaine central de répétition des motifs ARM qui permet l'interaction avec plusieurs partenaires dont les cadhérines et les facteurs de transcription TCF/LEF. Le domaine N-terminal est important pour l'interaction de β-caténine avec l'actine, le complexe de dégradation ainsi que le partenaire nucléaire BCL9. Le domaine C-terminal contient un domaine d'activation de la transcription. *(Source : https://en.wikipedia.org/wiki/Beta-catenin#/media/File:Beta-catenin-structure.png – Bubus12,juin 2013 ; CC BY 3.0 (Creative Commons Attribution 3.0 Unported)).*

4.2 : Localisations, régulations et fonctions de β-caténine

La β-caténine à 3 localisations cellulaires auxquelles correspondent différentes fonctions et différentes régulations possibles tel que cela est schématisé en **Figure 20**. En effet, β-caténine peut être sous-membranaire, cytoplasmique et même nucléaire malgré l'absence dans sa structure de séquence de localisation nucléaire, ou de séquence d'export nucléaire (NLS et NES pour Nuclear Localization/Export Sequence, respectivement). Il apparait aujourd'hui que l'importation de β-caténine dans le noyau pourrait dépendre de son interaction avec ses partenaires nucléaires Pygo et Legless, mais également par le biais de β-importine, et que que cela serait régulé par son extrémité C-terminale (Maturana et al., 2015).

β-caténine à la membrane

Lorsqu'elle est sous-membranaire, la β-caténine régule l'adhérence cellule-cellule, et la migration des mélanocytes (Keswell et al., 2015). En effet, elle interagit au travers de ses motifs ARM 1 à 3 et 10 à 12 avec le domaine C-terminal de l'E-cadhérine exprimée par le mélanocyte (Aberle et al., 1994; Huber et Weis, 2001; Hülsken et al., 1994). E-cadhérine établit des interactions homophiliques (Pokutta et Weis, 2007) avec les E-cadhérines exprimées par les kératinocytes. Ces interactions homophiliques régulent l'adhérence du mélanocyte aux kératinocytes, si bien que pour pouvoir migrer, le mélanocyte cesse d'exprimer l'E-cadhérine (Keswell et al., 2015). Les interactions d'E-cadhérine avec β-caténine sont modulées par les phosphorylations de β-caténine et d'E-cadhérine. La fixation d'E-cadhérine stabilise β-caténine à la membrane en inhibant par compétition la fixation de APC (Adenomatous Polyposis Coli) (Aberle et al., 1994; Huber et Weis, 2001; Hülsken et al., 1994) qui favorise la dégradation de β-caténine par le protéasome tel que nous le verrons par la suite.

De plus, le dimère E-cadhérine - β-caténine est stabilisé par la fixation de α-caténine sur une région située entre les résidus 120 et 151 de la β-caténine et avec les premiers motifs ARM de β-caténine (Aberle et al., 1994). Cette interaction de β-caténine avec α-caténine empêche l'internalisation du complexe E-cadhérine - β-caténine et permet à β-caténine de faire le lien entre l'E-cadhérine et le cytosquelette via α-caténine. Ces interactions régulent la disponibilité de β-caténine qui se trouve séquestrée à la membrane, et qui ne peut donc pas induire l'expression de ses gènes cibles (Du et al., 2014).

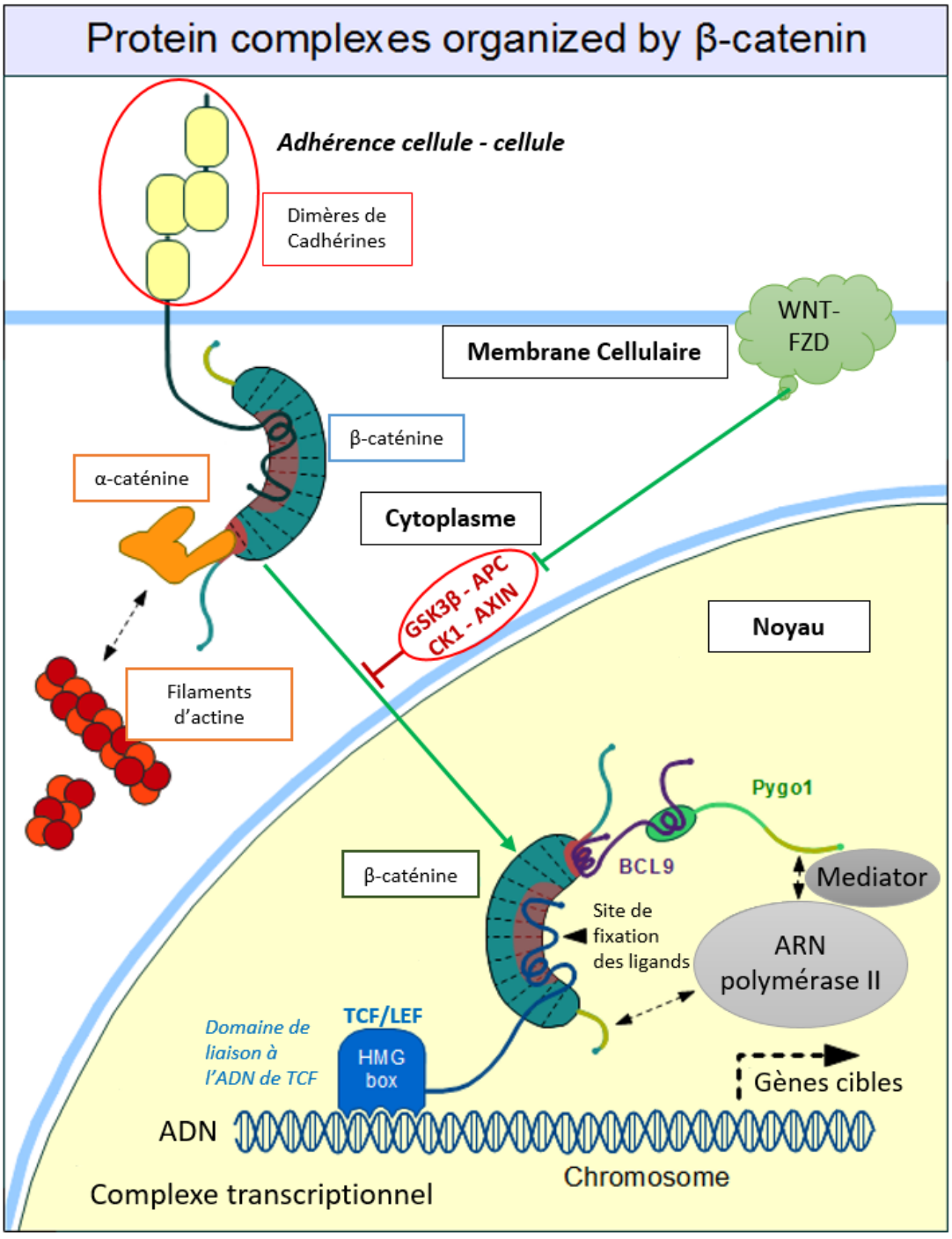


Figure 20 : Représentation schématique simplifiée des différentes interactions et localisations de β-caténine.

A la membrane, β-caténine participe à la régulation de l'adhérence en interagissant avec les cadhérines et le cytosquelette. Dans le cytoplasme, β-caténine est régulée par un dialogue entre la voie WNT et le complexe de régulation de sa dégradation composé de GSK3β, APC, CK1 et AXIN. Lorsqu'elle est nucléaire, β-caténine régule la transcription de gènes cibles reconnus par le domaine HMG (High Mobility Group) des facteurs TCF/LEF en permettant le recrutement du complexe médiateur et de la ARN polymérase II via ses partenaires Legless (BCL9) et Pygopus (Pygo1).
(Adapté à partir de : https://en.wikipedia.org/wiki/Beta-catenin#/media/File:Beta-catenin-ARM-domain-interactions.png – Bubus12, juillet 2013 ; CC BY 3.0).

β-caténine dans le cytoplasme :

Dans le cytoplasme, l'activation de β-caténine est induite lors de l'activation de la voie WNT (Wingless iNTegration site) qui dépend de la fixation du ligand WNT sur les récepteur Frizzled (FZD) et LRP5/6 (low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 or 6) (pour revue, MacDonald et He, 2012).

La famille des récepteurs Frizzled compte 10 membres qui sont caractérisés par un domaine extracellulaire N-terminal riche en cystéines capable d'interagir avec les ligands WNT, et 7 domaines transmembranaires structurellement similaires aux récepteurs couplés aux protéines G, dont l'activation dépend de l'interaction du couple FZD/ WNT (pour revue, MacDonald et He, 2012).

Les ligands de la famille WNT regroupent 19 glycoprotéines palmitoylées conservées chez les mammifères, et sont impliqués dans la voie WNT non-canonique et la voie WNT canonique. La voie WNT non-canonique est activée par les ligands WNT4, WNT5A, WNT5B, et WNT11 (pour revue, Weeraratna, 2005). La signalisation β-caténine est activée par la voie WNT canonique stimulée par les ligands WNT1, WNT3A, WNT7, WNT8, et WNT8B.

En effet, dans le cytoplasme, la β-caténine est séquestrée par un complexe protéique formé d'APC (Adenomatous Polyposis Coli), d'axine, de CK1 (Casein Kinase1) et de GSK3β (Glycogen Synthase Kinase 3 β). Ces deux dernières protéines phosphorylent la β-caténine, ce qui induit sa dégradation par le protéasome suite à son ubiquitinylation. Mais lorsque WNT se fixe au récepteur FZD, Dishevelled (Dvl) déstabilise ce complexe ce qui met fin à la séquestration et à la dégradation de la β-caténine (pour revue, MacDonald et He, 2012). La stabilisation de la β-caténine va lui permettre de migrer dans le noyau et d'y exercer son activité de facteur de transcription (**Figure 20**).

β-caténine dans le noyau

Bien qu'elle ne contienne pas de séquence de localisation nucléaire, la β-caténine est capable de migrer dans le noyau. Pour cela, la β-caténine interagit avec les protéines des pores nucléaires telles que NUP62, NUP98 et NUP153, au travers de ses motifs ARM 3-8 et ARM 10-12 ainsi que de son domaine C-terminal (Sharma et al., 2012; Yang et al., 2015).

Lorsqu'elle est localisée dans le noyau, la β-caténine a une fonction de cofacteur de transcription. Puisqu'elle ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN (Huber et al., 1997; Xing et al., 2008), elle induit la transcription de ses gènes cibles à travers ses partenaires TCF/LEF qui interagissent avec les motifs ARM 3 à 7 de la β-caténine.

Les facteurs TCF comptent 4 paralogues chez les vertébrés : TCF1, TCF3, TCF4 et LEF1 qui présentent de nombreux épissages alternatifs. Ils se fixent à l'ADN sur un motif de réponse à WNT (WNT-Responsive Element) CCTTTGAT(G/C) grâce à leur domaine HMG (High Mobility Group) (Arce et al., 2006; Archbold et al., 2012). En l'absence de β-caténine nucléaire, ces facteurs jouent le rôle de répresseurs transcriptionnels à travers leur interaction avec le corépresseur Groucho et/ou CtBP. Mais lorsque β-caténine migre dans le noyau elle inhibe la fixation de groucho/TLE sur TCF/LEF et permet l'induction de la transcription par ces facteurs (Cadigan and Waterman, 2012).

Pour promouvoir la transcription, la β-caténine va également interagir au niveau de son premier motif ARM avec son cofacteur Legless (BCL9) qui recrute Pygopus (Pygo1) qui recrute à son tour le complexe Mediator afin de réguler la transcription par la ARN polymérase II (**Figure 20**) (Cadigan et Waterman, 2012; Maturana et al., 2015; Valenta et al., 2012).

Cependant, cette induction transcriptionnelle peut être inhibée en particulier par ICAT (Inhibitor of β-Catenin And TCF4) qui interagit directement avec β-caténine, empêchant son interaction avec ses cofacteurs (Tago et al., 2000). La β-caténine nucléaire interagit également avec les facteurs de transcription FOXO, SOX, OCT, SMAD, HIF et ERα (Estrogen Receptor 1) et participe donc à la régulation de l'expression de leurs gènes cibles que nous n'étudierons pas ici.

Parmi les gènes cibles de β-caténine figure MITF, dont l'isoforme MITF-M est le facteur central de la régulation du lignage mélanocytaire, mais également TYRP2 et TYR, impliqués dans la mélanogenèse (Larue et Delmas, 2006; Yamaguchi et Hearing, 2009). On trouve également des gènes qui codent d'autres facteurs de transcription tels que TWIST et SNAIL (Casas et al., 2011) qui sont impliqués dans l'EMT, des gènes impliqués dans la survie cellulaire tels que la Survivine, la prolifération tels que c-Myc et Cycline D1 (Li et al., 2005), l'invasion et l'EMT tels que CD44, uPA, uPAR, MMP-7, et MT1-MMP (discuté dans Qi et al., 2005).

Régulations de β-caténines indépendantes de la voie WNT

Bien que l'activation de la β-caténine soit souvent associée à celle de la voie WNT dans la littérature, il existe également des voies non canoniques de régulation de la signalisation β-caténine (pour revue dans le mélanome, Aktary et al., 2016).

Régulation de l'activité β-caténine par les Récepteurs à Tyrosine Kinase (RTK)

La signalisation β-caténine « non-canonique » peut être induite par l'activation de certains récepteurs à Tyrosine Kinase (RTK) tels que l'EGFR, l'IGFR, le VEGFR et le FGFR (respectivement Epidermal, Insulin- like, Vascular Endothelial et Fibroblast Growth Factor Receptor(s)).

L'activation de l'EGFR est aujourd'hui bien connue pour favoriser la signalisation β-caténine. Ainsi, il a été montré dans des cellules de carcinome épidermoïde, que β-caténine interagit avec l'EGFR, et qu'un traitement à l'EGF promeut la phosphorylation de β-caténine en Y86, Y333 et Y654 (Hoschuetzky et al., 1994; Miravet et al., 2003). L'EGF favorise l'internalisation de l'E-cadhérine médiée par Cavéoline 1 (Lu et al., 2003), mais aussi la phosphorylation de α-caténine en S641 par Casein Kinase 2α ce qui diminue les interactions α-caténine - β-caténine, ce qui favorise la signalisation β-caténine (Ji et al., 2009).

L'IGFR est capable de former un complexe avec β-caténine et E-cadhérine tel que cela a été montré dans un modèle de carcinome mammaire (Guvakova, 1997). Ainsi, l'activation de l'IGFR conduit à la phosphorylation de β-caténine sur la tyrosine Y99, à la diminution de l'association β-caténine- E-cadhérine (Playford et al., 2000), et à l'augmentation de l'internalisation d'E-cadhérine. De plus, l'IGF1 exprimé par les fibroblastes stimule l'IGFR des cellules de mélanome, ce qui favorise l'activation de AKT qui induit l'inhibition de GSK3β par phosphorylation (Satyamoorthy et al., 2001).

Le VEGFR (Cohen et al., 1999) et le FGFR (Mavila et al., 2012) sont également capables de promouvoir la phosphorylation de β-caténine, ce qui inhibe les interactions avec ses partenaires membranaires et favorise la signalisation β-caténine, la survie et la prolifération des cellules.

Dans l'ensemble, ces effets induits par l'activation des RTK conduisent à une inhibition des interactions de β-caténine avec ses partenaires membranaires et à la stabilisation de la β-caténine cytoplasmique et nucléaire responsables d'une augmentation de la signalisation β-caténine.

Autres acteurs moléculaires régulant la signalisation β-caténine

La β-caténine et la γ-caténine présentent une homologie structurelle et sont en compétition pour l'interaction avec certains de leurs partenaires. Ainsi, à l'instar de β-caténine, γ-caténine est capable d'interagir avec les partenaires membranaires : les cadhérines et l'α-caténine (Nieset et al., 1997), les acteurs du complexe de régulation de la dégradation APC, CK1 et GSK3β, et les partenaires nucléaires : les facteurs de transcription TCF/LEF. Ainsi, la surexpression de γ-caténine, affecte le potentiel oncogénique de β-caténine en perturbant ses interactions avec ses partenaires membranaires et avec le complexe de dégradation (APC, CK1 et GSK3β), ce qui module la signalisation β-caténine (pour revue, Aktary et Pasdar, 2012).

PTEN et Cavéoline 1 (CAV1) agissent de façon antagoniste sur l'activité de β-caténine (Conde-Perez et al., 2015). Ainsi, dans des cellules de cancer de la prostate, l'expression de PTEN soutient l'activité de GSK3β en inhibant AKT, et la perte de son expression induit une augmentation du pool de β-caténine nucléaire et de son interaction avec ses partenaires TCF4 (Transcription Factor4) et LEF1 (Lymphoid Enhancer Binding Factor 1) (Persad et al., 2001). De plus, dans des modèles murins et humains de mélanome, la perte d'expression de PTEN est également associée à une augmentation des niveaux de β-caténine nucléaire et de l'interaction de β-caténine avec CAV1 dont l'expression favorise la localisation nucléaire de β-caténine, ainsi que son activité transcriptionnelle (Conde-Perez et al., 2015). Cependant, une étude plus ancienne rapporte que l'expression de CAV1 peut également dans certaines conditions inhiber la signalisation β-caténine (Lu et al., 2003).

En conclusion, l'activation de la voie WNT canonique résulte en l'inhibition de GSK3β par sa phosphorylation en S9, ce qui permet l'activation de la signalisation β-caténine. Aussi, certains auteurs font l'amalgame entre la signalisation WNT et la signalisation β-caténine. Cependant, tel que nous venons de l'illustrer, il convient de ne pas considérer la signalisation β-caténine et l'activité de GSK3β comme les reflets de l'activité de la seule voie WNT (pour revue, Aktary et al., 2016). La phosphorylation de GSK3β en S9 peut également être induite par l'activation de plusieurs RTK et par AKT. De plus, tel qu'illustré avec γ-caténine, la compétition de β-caténine pour ses partenaires moléculaires peut permettre de dissocier son activité transcriptionnelle de celle du complexe de régulation de sa dégradation (APC, CK1 et GSK3β).

4.3 : Implication de β-caténine dans le mélanome

La β-caténine est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la progression tumorale du mélanome. Cependant, les différents travaux publiés montrent dans leur ensemble que β-caténine joue un rôle contrasté dans le mélanome selon le contexte génétique et le modèle utilisé.

Les dérégulations de l'activité de β-caténine sont importantes dans la progression tumorale du mélanome. Des mutations de CTNNB1 associées à la progression tumorale du mélanome rendent la β-caténine résistante à la dégradation par la voie ubiquitine/protéasome, en modifiant les sites de phosphorylation de la protéine dans sa partie N-terminale (Ser33, Ser37, Thr41 et Ser45) tel que cela a été montré dans un premier temps pour un peu moins d'un tiers des lignées cellulaires humaines de mélanome testées (Rubinfeld et al., 1997).

Cependant, les données du « Cancer Genome Atlas » et certaines études montrent que 2% à 8% seulement des mélanomes présentent des mutations de (CTNNB1) (Pollock et Hayward, 2002; Reifenberger et al., 2002; Worm et al., 2004). Il apparait également aujourd'hui que les mutations des gènes impliqués dans la dégradation de β-caténine sont elles aussi rares dans le mélanome. Pour GSK3β une publication récente rapporte une mutation de ce gène chez un patient atteint de mélanome (Pérez-Alea et al., 2016). Dans le cas d'APC, seule une publication rapporte une mutation inhibitrice, ainsi qu'une hyperméthylation du promoteur 1A d'APC retrouvées dans 15% des 40 lignées cellulaires testées. Ces auteurs suggèrent qu'un effet dose dépendant de la diminution de APC permettrait d'augmenter la signalisation β-caténine de façon à promouvoir la prolifération sans entraver le potentiel invasif des cellules, sans toutefois le démontrer (Worm et al., 2004). En revanche, le gène qui code ICAT est touché par une perte d'hétérozygotie dans 20% des tumeurs primaires et dans 55% des métastases qui sont liées à des délétions du chromosome 1 (1p36) (Reifenberger et al., 2002).

Cependant, malgré les faibles taux de mutations observées sur ces gènes impliqués dans la voie β-caténine, 30% des biopsies de mélanomes présentent un pool de β-caténine nucléaire (Omholt et al., 2001). Ceci suggère que l'activation de β-caténine impliquée dans la progression du mélanome serait assurée *in vivo* par l'environnement des cellules tumorales, alors que l'absence de cet environnement en culture *in vitro* favoriserait la sélection des cellules qui présentent une mutation de β-caténine. De plus, tel que nous l'avons déjà évoqué, l'activation de la signalisation β-caténine peut être induite par AKT qui est souvent suractivé dans le mélanome.

4.3.1 : Rôles de β-caténine dans le mélanome chez l'homme et dans les modèles cellulaire de mélanomes humains :

De nombreuses études portant sur les lésions de patients et l'utilisation de modèles de cellules humaines de mélanome montre que l'expression et la signalisation de β-caténine sont associées à un bon pronostic (Arozarena et al., 2011; Bachmann et al., 2005; Gould Rothberg et al., 2009). Bien que la progression des mélanomes nodulaires (NM) ne semble pas liée à une variation de la localisation et de l'expression de β-caténine, dans les mélanomes superficiels extensifs (SSM) l'expression de β-caténine corrèle avec un meilleur taux de survie des patients et diminue avec l'augmentation de l'indice de Clark qui reflète la profondeur de la lésion primaire (Maelandsmo et al., 2003).

L'expression de β-caténine diminue lors de la progression du mélanome et de l'invasion dermique. En effet, 96% des Nævi expriment la β-caténine, mais cette expression est progressivement perdue lors progression tumorale du mélanome. En effet, β-caténine est exprimée dans 94% des mélanomes RGP, mais dans seulement 65% des mélanomes VGP et 38% et des métastases (Kageshita et al., 2001). Ainsi, une expression faible ou absente de β-caténine est associée à une plus grosse épaisseur de la tumeur

primaire et à une plus forte incidence de métastases dans les ganglions lymphatiques (Kageshita et al., 2001). De plus, une diminution de la β-caténine nucléaire est associée à un taux plus élevé de décès parmi les patients (Bachmann et al., 2005; Chien et al., 2009).

À l'inverse, des niveaux élevés de β-caténine nucléaire sont associés avec de meilleures chances de survie des patients liée à une diminution de la prolifération. L'activation de β-caténine par WNT3A est également liée à une augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation mélanocytaires par les cellules tumorales et une diminution de la croissance tumorale lors de xénogreffes, alors que l'inhibition de β-caténine par WNT5A produit l'effet inverse (Chien et al., 2009). Enfin, il a été montré chez les patients porteurs de la mutation $BRAF^{V600E}$ que la signalisation β-caténine est inhibée par la suractivation de $BRAF^{V600E}$, et que sa réactivation par l'inhibition de AXIN1 favorise l'apoptose des cellules traitées avec des inhibiteurs de BRAF (Biechele et al., 2012) et de MEK (Conrad et al., 2012). Aussi, cela suggère que la réactivation de la signalisation β-caténine pourrait être une thérapie intéressante pour pallier aux résistances aux traitements d'inhibition des MAPK.

En accord avec cela, l'expression de β-caténine dans les lignées humaines de mélanome est associée à une diminution du potentiel invasif lié à l'induction par β-caténine de MITF-M qui semble réprimer l'expression de MT1-MMP qui semble pourtant être induite par β-caténine. De plus, l'inhibition de GSK3β par siARN réduit le potentiel invasif en 3D sur collagène, alors qu'à l'inverse, l'inhibition de β-caténine et de MITF par siARN augmente ce potentiel invasif des cellules (Arozarena et al., 2011). De façon cohérente, l'expression de l'inhibiteur de la signalisation β-caténine, ICAT, est associée à de mauvais pronostics, et son expression ectopique dans des lignées humaines de mélanome favorise la mobilité des cellules de façon β-caténine dépendante, mais également l'invasion en Matrigel™, et la formation de métastases pulmonaires par ces cellules chez la souris nude (Domingues et al., 2014).

Toutefois, en contradiction avec ces précédentes observations chez les patients, certains de ces auteurs ont plus récemment montré sur une sélection de patients atteints de mélanome de stade IV présentant des métastases cérébrales, qu'un niveau élevé de β-caténine nucléaire observé **avant** le traitement des patients par un inhibiteur de BRAF semble au contraire corrélé avec un taux de survie plus faible de ces patients (Chien et al., 2014).

Ceci concorde avec les travaux de Sinnberg et al. publiés en 2011 qui montrent dans des mélanocytes et dans des cellules humaines de mélanomes primaires que β-caténine favorise l'invasion *in vitro,* et la croissance tumorale *in vivo* lors de xénogreffes dans un modèle de souris SCID. Ces travaux montrent également que l'inhibition de β-caténine dans des lignées de cellules métastatiques induit l'apoptose et réprime la prolifération, la chimiorésistance, la migration et même l'invasion en chambre de Boyden et dans un modèle de peau reconstruite. De façon intéressante dans les lignées non métastatiques et dans les mélanocytes, l'expression de β-caténine ne semble pas nécessaire à la survie des cellules (Sinnberg et al., 2011).

Ainsi, les différents auteurs rapportent des observations contradictoires quant au rôle de β-caténine dans le mélanome (Arozarena et al., 2011 et Domingues et al., 2014 VS Sinnberg et al., 2011). À ce titre, il est important de souligner que ces auteurs ont testé un grand nombre de lignées, et que les expériences présentées dans leurs travaux n'utilisent pas toujours les mêmes lignées, qui ne sont pas cultivées exactement dans les mêmes conditions. Cela suggère que les évènements génétiques et environnementaux liés aux différentes étapes de la progression du mélanome chez chaque patient modifient les interactions entre les différentes voies de signalisation qui sont nécessaires pour la régulation physiologique de la cellule, ainsi que le fonctionnement de la voie WNT/β-caténine. Pour illustrer cela, il est intéressant de souligner plusieurs éléments expérimentaux :

- Le rôle de β-caténine est influencé par l'état d'activation des autres voies de signalisation :

Il apparait aujourd'hui que les différences de contextes génétiques relatifs aux autres voies de signalisation ont un rôle important à jouer quant au rôle de β-caténine dans le mélanome. En particulier, l'inhibition de ERK1/2 synergise avec la signalisation β-caténine pour promouvoir l'apoptose des cellules de mélanome (Chien et al., 2014), ce qui concorde avec les observations de Biechele et al. et Conrad et al. publiées en 2012 *(op.cit.).* Cependant, un traitement au long terme des cellules par des inhibiteurs de BRAF (BRAFi) est associé au développement d'une résistance au traitement. Cela se traduit, en dépit du traitement BRAFi, par une réactivation de ERK1/2 qui est associée à une diminution de la réponse apoptotique induite par WNT3A et par la signalisation β-caténine (Chien et al., 2014). Cette étude montre donc que dans les cellules de mélanome la signalisation β-caténine permet de potentialiser le traitement BRAFi, mais sur le long terme ce traitement modifie la réponse à la signalisation WNT3A/β-caténine d'une façon qui empêche l'induction de l'apoptose que l'on observe lors du traitement sur le court terme.

- La localisation de β-caténine évolue avec la progression du mélanome :

In vitro, alors que β-caténine est membranaire dans le mélanocyte, elle est localisée dans le noyau des cellules de mélanomes à haut potentiel prolifératif et elle redevient membranaire dans les mélanomes invasifs (Arozarena et al., 2011). Ceci est en accord avec une étude antérieure qui avait observé *in situ* une localisation nucléaire de β-caténine dans seulement 10% des mélanomes VGP et 15% des métastases, contre plus de 40% pour les lésions bénignes *in situ* (Kageshita et al., 2001).

- La progression du mélanome s'accompagne de « switchs » entre les voies WNT canoniques et non canoniques, mais également entre l'expression des cofacteurs TCF4 et LEF1 :

Aujourd'hui, certains auteurs parlent d'un switch entre l'activation des voies WNT canonique et non canonique, qui serait impliqué dans les transitions entre les phénotypes prolifératifs et invasifs des cellules lors de différentes phases de la progression du mélanome (pour revue, Lucero et al., 2010; Webster et al., 2015a). Ainsi, le ligand de la voie WNT non-canonique WNT5A inhibe la signalisation canonique par compétition avec WNT3A ce qui induit la dégradation de β-caténine de façon APC dépendante. L'inhibition de la voie β-caténine qui en résulte serait associée à une transition vers un potentiel métastatique plus élevé des cellules de mélanome et un stade plus avancé des tumeurs. La signalisation non-canonique WNT5A s'accompagne de la perte de l'expression par les cellules de marqueurs de différenciation mélanocytaire tels que MITF, TYRP1 et TYRP2, et d'une diminution de la capacité des cellules de mélanome d'activer les lymphocytes T (pour revue, Webster et al., 2015a). De plus, les cellules de mélanomes qui développent une résistance aux thérapies expriment plus fortement WNT5A, ce qui semble induire un état de pseudo-sénescence médié par p21 qui permettrait aux cellules de survivre au traitement et de garder un potentiel métastatique (Webster et al., 2015b).

Lors de la progression du mélanome, ces « switchs » phénotypiques s'accompagne également de l'altération des profils d'expressions des facteurs TCF4/ LEF1. Ainsi, l'expression de LEF1 est retrouvée dans les cellules prolifératives différenciées qui expriment MITF, alors que l'expression de TCF4 est retrouvée dans les cellules invasives dédifférenciées n'exprimant pas MITF (Eichhoff et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs montrent que le phénotype prolifératif est plutôt associé à une localisation membranaire de β-caténine et à un état actif de GSK3β, alors que le phénotype invasif est associé à une augmentation des niveaux cytoplasmiques de β-caténine. Toutefois, ces différences ne semblent pas associées à une différence de localisation nucléaire ou d'activité transcriptionnelle de β-caténine (mesurée à l'aide d'un rapporteur TOP/FOP, (voir Korinek et al., 1997)) (Eichhoff et al., 2011).

- L'expression de β-caténine est hétérogène *in situ* dans le mélanome :

Une étude récente apporte des preuves de l'hétérogénéité d'expression de β-caténine associée à une hétérogénéité phénotypique des différentes cellules présentes au sein des lésions de patients (Kovacs et al., 2016). Ainsi, une même lésion présente plusieurs populations cellulaires avec des phénotypes différents associés à différents niveaux d'expression et de localisation de la β-caténine, mais également à une différence d'expression des cofacteurs TCF4/LEF1. LEF1 est retrouvé dans les cellules qui expriment fortement β-caténine alors que TCF4 est retrouvé dans les cellules qui expriment faiblement β-caténine et qui semblent être plus invasives et chimiorésistantes.

Cette hétérogénéité soulève 2 problèmes :

(1) Lors de la mise en culture de cellules de mélanomes issues de lésions de patients, au fur et à mesure des divisions (passages) des cultures cellulaires *in vitro* cette hétérogénéité va favoriser la sélection des populations cellulaires les plus prolifératives au détriment des autres populations. Cela va introduire des biais expérimentaux dans les travaux menés sur ces cultures par la suite, tant en terme de phénotypes observés qu'en terme d'expression de la β caténine.

(2) L'hétérogénéité des différentes populations d'une tumeur complique l'étude du rôle de la β-caténine en vue d'une potentielle utilisation à des fins diagnostics et surtout thérapeutiques (Kovacs et al., 2016). Ceci est d'autant plus important qu'il a été montré *in vivo* que l'hétérogénéité des cellules tumorales peut être maintenue lors de la dissémination, puisque les cellules de mélanome non-invasives sont capables de coopérer avec les cellules invasives afin de les accompagner lors de leur dissémination (Chapman et al., 2014).

4.3.2 : Rôle de β-caténine dans les modèles murins de mélanomes :

Dans des modèles murins, la stabilisation de β-caténine a été associée à de nombreuses reprises à la progression du mélanome. La stabilisation de β-caténine ne semble alors pas promouvoir la prolifération, mais permet la sortie de sénescence des mélanocytes et leur immortalisation en réprimant l'expression d'INK4A (Delmas et al., 2007; discuté dans Curley et Bosenberg, 2008).

Bien qu'à elle seule la signalisation β-caténine ne semble pas capable d'induire de développement tumoral chez la souris, l'expression d'une β-caténine stabilisée dans un contexte $NRAS^{Q61K}$ constitutivement actif permet le développement de mélanomes chez 85% des souris testées, contre moins de 30% de souris atteintes avec la seule mutation $NRAS^{Q61K}$. En effet, β-caténine permet de surmonter la sénescence induite par $p16^{INK4A}$ (Delmas et al., 2007). De plus, toujours dans un contexte $NRAS^{Q16K}$ chez la souris, la stabilisation de β-caténine augmente drastiquement le potentiel métastatique des mélanomes développés. En effet, on observe alors un pourcentage plus élevé de souris atteintes de métastases et un nombre de métastases plus élevé que chez les souris uniquement mutées $NRAS^{Q16K}$ (Gallagher et al., 2013). Notons que dans cette étude, la stabilisation de β-caténine inhibe la migration des cellules de mélanome et des mélanocytes, et que cela semble dépendre de l'expression de MITF-M.

Soutenant ces observations, dans ce contexte $NRAS^{Q16K}$ la perte d'expression de PTEN induit l'internalisation de E-cadhérine et augmente le niveau de β-caténine nucléaire et son association à la Cavéoline1 qui module son activité transcriptionnelle. Cela favorise la signalisation β-caténine, et le potentiel métastatique des cellules murines de mélanome, tout en inhibant leur sénescence (Conde-Perez et al., 2015).

Deux études supplémentaires montrent l'importance des interactions entre les voies BRAF/ERK, PI3K/PTEN/AKT et WNT/β-caténine lors de la progression du mélanome chez la souris. En effet, une première étude montre que l'expression de N-cadhérine favorise la l'activation de PI3K/AKT et l'expression de β-caténine, ce qui favorise la croissance du mélanome murin (Li et al., 2001b). La seconde étude qui est plus récente montre que l'activation de β-caténine favorise la formation de métastases par les mélanomes développés autour d'une mutation activatrice de $BRAF^{V600E}$ associée à une perte de $PTEN^{-/-}$ (Damsky et al., 2011). De plus, dans cette étude, l'activité de β-caténine est associée à une augmentation de la phosphorylation de AKT et une diminution de celle de ERK.

Conclusion

Ces résultats montrent que le rôle de β-caténine dans le mélanome est contrasté selon qu'il soit étudié chez la souris, ou chez l'homme selon les différents modèles cellulaires d'étude utilisés. Cela souligne l'importance du rôle que jouent les contextes génétiques et les modèle d'études dans la détermination de l'implication de β-caténine dans le mélanome.

Il apparait que l'impact de l'expression, la localisation et la signalisation β-caténine dépend du stade et du type de mélanome développé, mais également des évènements génétiques qui affectent d'autres voies de signalisation qui sont responsables du développement du mélanome. De plus, il apparait aujourd'hui que les lésions présentent plusieurs populations avec une hétérogénéité d'expression de β-caténine (Kovacs et al., 2016), et que les cellules tumorales semblent également capables d'opérer des switch dans cette voie WNT/β-caténine (Eichhoff et al., 2011; Webster et al., 2015b). Ainsi, l'expression et le rôle de β-caténine et de ses partenaires vont évoluer avec les différentes phases de progression du mélanome. Dans leur ensemble, ces travaux montrent qu'il convient dans le cadre du mélanome de considérer β-caténine ni comme un oncogène, ni comme un acteur anti-tumoral, mais plutôt comme un acteur aux multiples facettes tel que cela est discuté dans la revue publiée par Lucero et al. en 2010.

5 : Le suppresseur de tumeur p53

5.1 : Structure de p53

Codé par le gène TP53 localisé chez l'homme sur le chromosome 17 (17p13), p53 est le premier membre identifié de la famille des « gènes p53 » qui sont des facteurs de transcription bien connus pour leurs fonctions cruciales de suppresseurs de tumeurs et de « gardiens du génome ». Les membres de cette famille, p53, p63 et p73, partagent une homologie structurale et peuvent reconnaître les mêmes motifs nucléotidiques (**Figure 21**). Ils sont impliqués dans le développement, la différenciation, la réponse au stress cellulaire (pour revue, Marcel et al., 2011). p53 possède également d'autres fonctions (pour revue, Fuster et al., 2007), notamment la régulation de la nécrose médiée par la perméabilité de la mitochondrie à travers son interaction avec les protéines de la famille BCL (Vaseva et al., 2012). Cependant, nous n'étudierons ici que ses fonctions de régulateur transcriptionnel.

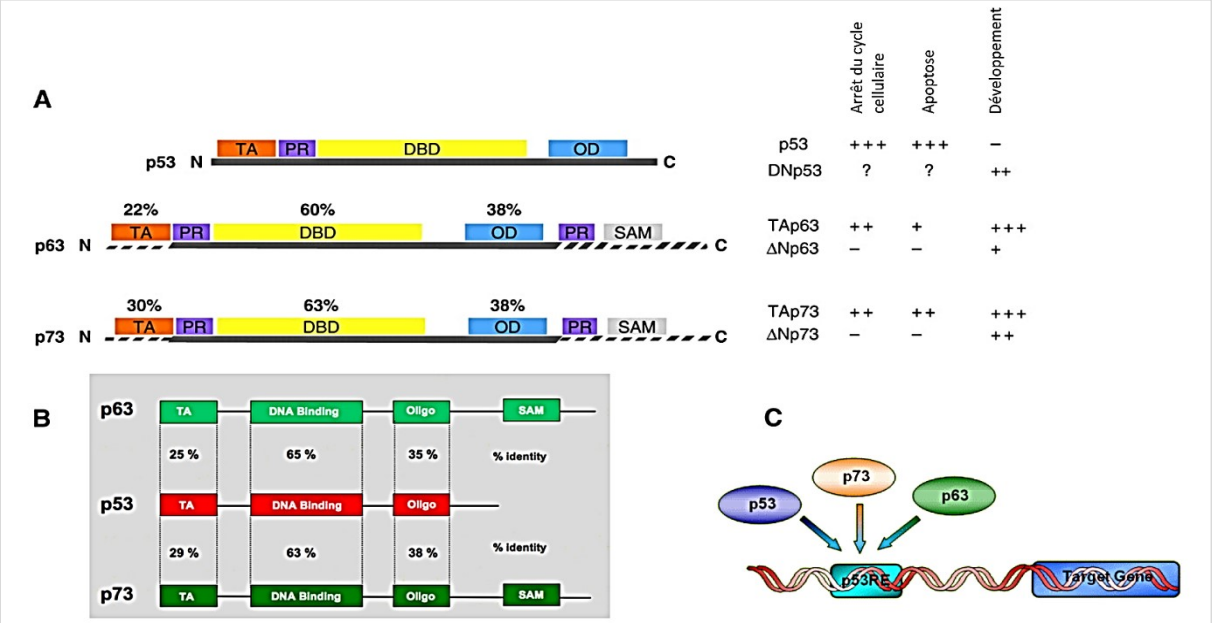


Figure 21 : Les facteurs de transcription de la famille de p53.

(A) : Structure des gènes codant p53, p63 et p73 (Gauche), et représentation qualitative de l'implication de ces facteurs dans l'arret du cycle cellulaire, l'apoptose et le développement embryonnaire (Droite). **TA** : domaine de TransActivation, **PR :** « Prolin Rich region », **DBD** « DNA Bindin Domain » ; domaine de liaison à l'ADN, **OD :** Domaine d'Oligomérisation **SAM** : Sterile α Motif (présent uniquement sur les isoformes α de p63 et p73) **(B) :** pourcentages d'homologies entre les différents domaines conservés entre p3, p63 et p73. **(C) :** p53, p63 et p73 reconnaissent un motif de séquence nucléotidique appelé p53RE pour p53 response element, en français : ERp53. *(Sources : p63 and p73, the Ancestors of p53 Dötsch et al. 2016* - doi: 10.1101/cshperspect.a004887 - *copyright to Cold Spring Harbor Laboratory Press; http://p53.free.fr/p53_info/p73_p63.html; http://p53famtag.ba.itb.cnr.it/ Copyright).*

p53 tient son nom de sa masse moléculaire apparente de 53 kDa lors de la séparation des protéines. C'est une phosphoprotéine de 393 acides aminés qui structurent plusieurs domaines : un domaine N-terminal de transactivation des facteurs de transcription (1-67), une région riche en proline (67-98), un domaine « core » (98-303), une région qui contient une séquence de localisation nucléaire (303-323), un domaine de tétramérisation de la protéine (323-363) et un domaine C-terminal (363-393) (pour revue, Joerger et Fersht, 2010). La reconnaissance de la chromatine par le « core » cible deux « demi-sites » séparés d'une dizaine de paires de bases et qui sont composés de séquences consensus appelée ERp53 (Élément de Réponse à p53) de type 5'-RRRC(A/T)(T/A)GYYY-3' (R=purine et Y=pyrimidine) (Wang et al., 2009a, 2010) (**Figure 21 C**).

Contrairement à d'autres facteurs de transcription, le domaine C-terminal de p53 est capable de se fixer à l'ADN de façon non spécifique et permet la reconnaissance des dommages à l'ADN tels que les mésappariements, les cassures doubles brins et l'ADN simple brin (Bakalkin et al., 1995; Lee et al., 1995). Ce domaine C-terminal influence également l'activité de p53 à travers ses modifications post traductionnelles et ses interactions avec d'autres protéines (Toledo et Wahl, 2006).

5.2 : Régulation de l'expression transcriptionnelle et traductionnelle de p53

Les niveaux d'ARNm de p53 varient avec le cycle cellulaire, ce qui permet de protéger l'ADN durant sa réplication. Ainsi, l'expression de l'ARNm p53 augmente avant l'induction de la phase S, sans toutefois que cela soit lié à une augmentation de son activité. Deux principaux acteurs sont proposés pour la régulation du promoteur de TP53 : C/EBPβ (CCAAT-Enhancer-Binding Proteins) active la transcription de p53 lors de l'entrée en Phase S, alors que RBP-Jκ (Recombining binding protein suppressor of hairless) est un inhibiteur de sa transcription (pour revue, Reisman et al., 2012).

Comme p53 inhibe la traduction canonique par « capping » lorsque la cellule est soumise à un stress, les ARNm de p53 contiennent deux séquences IRES (Internal Ribosome Entry Sites) qui permettent de maintenir sa traduction dans ces conditions de stress cellulaire (Ray et al., 2006). Ces séquences IRES offrent également un niveau de régulation supplémentaire quant à l'expression de p53 (Candeias et al., 2006; Yang et al., 2006).

Il est important de souligner que p53 code pour de nombreuses isoformes protéiques grâce à des processus d'épissages alternatifs, d'initiation par différents promoteurs, et des initiations alternatives de traductions. Les différents tissus ont leurs propres profils d'expression de ces isoformes qui ont toutes des particularités en termes de séquences cibles et de fonctions. Parmi ces isoformes, on retrouve notamment p53β, p53γ, Δ133p53α, Δ133p53β, Δ133p53γ, Δ160p53α, Δ160p53β, Δ160p53γ, Δ40p53α, Δ40p53β et Δ40p53γ. (pour revue, Marcel et al., 2011). Les isoformes courtes de p53 ne contiennent pas le domaine d'activation transcriptionnelle de la région N-terminale (isoformes ΔNp53). Aussi, ces isoformes peuvent se fixer à l'ADN sans favoriser la transcription de certains gènes cibles et agissent donc comme des répresseurs des formes longues de p53 (isoformes TA pour « TransActivating ») par compétition (Murray-Zmijewski et al., 2006).

Ainsi, l'expression protéique des isoformes de p53 est régulée très finement tant au niveau transcriptionnel que traductionnel, et l'expression des différentes isoformes permet de réguler finement la transcription des différents gènes cibles.

5.3 : Régulation de l'activité de p53

p53 est surnommé le « gardien du génome » car lors de la détection d'un stress génotoxique ou d'un dommage à l'ADN il est capable d'induire l'arrêt de la croissance et du cycle cellulaire, mais également la réparation de l'ADN, la sénescence, voir l'apoptose si les dégâts sont trop importants. Ces fonctions garantissent l'intégrité du génome en évitant l'accumulation de mutations dues aux stress cellulaires (pour revue, Lane et Levine, 2010). De façon générale, p53 va réprimer la transcription et la traduction pour permettre la réparation de l'ADN. Mais tel que nous venons de l'évoquer, p53 peut également induire la transcription de certains gènes clés impliqués dans l'arrêt du cycle ou dans l'apoptose.

L'activité de p53 est principalement régulée au travers d'un dialogue entre MDM2 (Murine Double Minute 2) qui adresse p53 au protéasome pour sa dégradation (Toledo et Wahl, 2006), et une protéine

codée par CDKN2A : $p14^{ARF.}$ Cette protéine inhibe l'interaction de MDM2 avec p53. Mais l'activité de p53 est également régulée à travers ses modifications post transcriptionnelles (résumées par Kruse et Gu, 2008 ; pour revue, Olsson et al., 2007), telles que sa phosphorylation, déphosphorylation par une sérine/thréonine phoshatase-1 (Li et al., 2006b), son acétylation par le couple de coactivateurs transcriptionnels p300/C/EBPβ (Pedeux et al., 2005), et par des changements de conformation induits par la prolyl isomérase Pin1 (Olsson et al., 2007).

Le choix de la promotion par p53 entre la sénescence et l'apoptose est médié en partie par les interactions avec ses partenaires HZF (Hematopoietic Zinc Finger), hCAS (human Cellular Apoptosis Susceptibility protein), ASPP1 et ASPP2 (Apoptosis Stimulating of p53 Protein 1et 2) et iASPP (Inhibitor of Apoptosis-Stimulating Protein of p53) (pour revue, Aylon et Oren, 2007) (**Figure 22**).

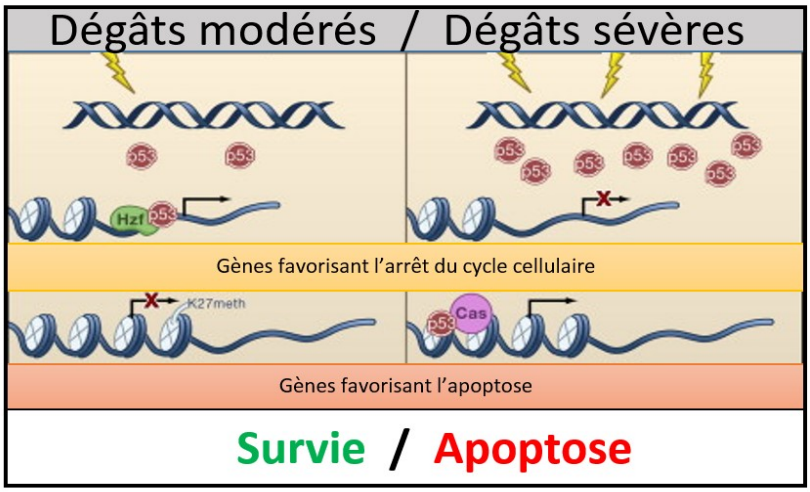


Figure 22 : Représentation schématique des différentes voies activées par p53.

Lors de dégâts modérés p53 stimule l'expression de gènes de l'arret du cycle cellulaire via son partenaire HZF alors que lors de dégâts sévères, l'activation prolongée de p53 conduit à l'inhibition de HZF et à son interaction avec Cas qui favorise l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose. *(Adapté de : Living with p53, dying of p53, Aylon et Oren, 2007 - DOI:10.1016/j.cell.2007.08.005* – Reprinted from Cell, Volume 130, Issue 4, p597–600, 24 August 2007 Copyright 2007, with permission from Elsevier - *autorisation RightsLink / Elsevier n°:* 4060320792894) .

HZF est une protéine à doigt de zinc dont l'association avec p53 favorise la sénescence via l'expression de gènes impliqués dans l'inhibition du cycle tels que p21 et 14-3-3sigma, tout en inhibant l'expression de gènes pro apoptotiques tels que BAX (BCL-2–Associated X protein), PERP (p53 apoptosis Effector Related to PMP-22), PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) et Noxa (dommage en latin) (Aylon et Oren, 2007). Ainsi, une invalidation de HZF est associé à une induction d'apoptose dans des conditions de stress modéré qui en temps normal n'induirait qu'un arrêt du cycle cellulaire. Cependant, bien que l'expression de HZF soit induite par p53, une activation prolongée de p53 provoque la dégradation de HZF par ubiquitinylation. Cette régulation fine de HZF semble cruciale car en cas de surexpression forcée de HZF, il a été observé une mort cellulaire après tétraploïdisation (Sugimoto et al., 2006).

L'interaction de p53 avec hCAS, induit l'apoptose notamment à travers l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que PIG3 (p53 Inducible Gene 3) (Aylon et Oren, 2007). ASPP1 et ASPP2 s'associent également à p53 pour promouvoir l'expression de gènes pro apoptotiques tels que Bax et PIG3, de façon préférentielle par rapport aux gènes d'arrêt du cycle tels que $p21^{WAF1}$. Cependant, par compétition pour la fixation sur p53 avec ASPP1 et ASPP2, iASPP est capable d'inhiber spécifiquement cette apoptose sans affecter l'expression des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle (pour revue, Sullivan et Lu, 2007).

Il est intéressant de noter que l'affinité de p53 semble plus importante pour les promoteurs des gènes d'arrêt du cycle cellulaire que pour les promoteurs des gènes pro apoptotiques. L'affinité de p53 est également plus importante pour les promoteurs des gènes induits que ceux des gènes réprimés. L'affinité de p53 pour ces sites dépend également d'autres paramètres tels que la conformation de l'ADN au niveau du locus considéré, ou encore des modifications post transcriptionnelles de p53 telles qu'une phosphorylation sur sa sérine 46 qui promeut spécifiquement l'induction des gènes pro apoptotiques (pour revue, Aylon et Oren, 2007).

Enfin, selon les gènes considérés, il existe des différences d'activation transcriptionnelles par p53 qui dépendent du niveau d'expression de p53, mais cela dépend également des séquences nucléotidiques précises des ERp53 de chaque promoteur. Ainsi, au sein des ERp53, un « core » de seulement deux nucléotides serait en grande partie responsable de l'activation ou de la répression transcriptionnelle (Wang et al., 2009a, 2010).

5.4 : Implication de p53 dans le mélanome

Du fait de ses fonctions au sein de la cellule, p53 est un suppresseur de tumeurs majeur, il n'est donc pas surprenant que des mutations de p53 soient impliquées dans 60% des cancers (Vousden et Prives, 2009). La fréquence des mutations est beaucoup plus élevée au niveau du « core protéique » responsable de l'interaction avec l'ADN, ce qui produit des formes mutées de p53 qui exercent un effet dominant négatif (Petitjean et al., 2007). Cependant, le gène TP53 est muté dans seulement 5 à 15% des mélanomes (Chin, 2003), ce qui explique que l'étude de ce gène dans le mélanome ait longtemps été délaissée en comparaison avec l'intérêt qu'il a suscité dans l'étude des autres cancers.

Le gène TP53 est rarement muté dans le mélanome, mais des travaux récents montrent qu'il est souvent transcriptionnellement inactif (Houben et al., 2011). De plus, l'altération de p53 a un rôle important à jouer dans le développement du mélanome de plusieurs modèles animaux (Bardeesy et al., 2001; Goel et al., 2009; Schartl et al., 2010; Terzian et al., 2010). Il semble donc important de ne pas laisser de côté l'étude des altérations de p53 dans la physiopathologie du mélanome.

Altérations de p53 dans les mélanomes humains

La surexpression d'un inhibiteur de p53, MDM4 (Gembarska et al., 2012), est retrouvée dans 65% des mélanomes. Un autre inhibiteur de p53, MDM2, est également surexprimé dans le mélanome (Dar et al., 2013), et l'inhibition de son interaction avec p53 par la Nutlin-3 montre que les cellules de mélanome développent une certaine dépendance à la perte de fonction de p53 médiée par MDM2 qui stoppe leur sénescence et permet leur croissance (Verhaegen et al., 2012).

L'importance des dérégulations de p53 pour le développement du mélanome est soutenue par le fait que sa réactivation par le SAH-p53-8, qui inhibe la fixation de MDM4 sur p53, permet de resensibiliser les cellules aux traitements cytotoxiques et d'inhibition de BRAF (Gembarska et al., 2012). De plus, le traitement des cellules humaines de mélanome par le 4-DACL (4-Deoxyaustrocortilutein), inhibe la prolifération et induit l'apoptose de manière dose dépendante, via l'expression et l'activation de p53 et p21 en parallèle d'une inhibition de NF-kB (Genov et al., 2016).

Dans les nævi, il a été proposé que l'expression et l'activité de p53 préviendraient l'apparition du mélanome en induisant la sénescence des mélanocytes plutôt que leur apoptose (Terzian et al., 2010). Cela permettrait ainsi d'assurer la pigmentation de la peau, tout en évitant une dérive tumorale des cellules altérées, et permettrait d'expliquer que la pression de sélection de mutations de p53 soit moins élevée lors de la dérive tumorale.

Mais lors de la progression du mélanome, un défaut d'activation de p53 par CHEK2 (Checkpoint Kinase 2) permet aux cellules d'échapper à la sénescence normalement induite par p53 et $p21^{ARF}$ (Mackenzie Ross et al., 2013). Les cellules peuvent également échapper à la sénescence via des altérations d'autres gènes tels que CDKN2A, qui est muté dans 40% des mélanomes (Curtin et al., 2005). On peut en particulier citer la perte de $p16^{INK4A}$ qui est associé avec une surprolifération des mélanocytes, et une sur-réplication de l'ADN, ce qui favorise une instabilité génomique en dépit de l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN (Fung et al., 2013). Enfin, bien que cela reste à confirmer dans le mélanome, il est probable qu'une régulation post transcriptionnelle soit responsable de l'inhibition de l'expression protéique de $p14^{ARF}$, aboutissant à une très faible expression protéique malgré une expression forte de l'ARNm, tel que cela a été démontré dans le rétinoblastome humain (Guo et al., 2008).

CDKN2A code des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle comme le suppresseur de tumeur $p14^{ARF}$ qui inhibe l'inactivation de p53 par MDM2. Ainsi, les mutations de CDKN2A dans les cellules germinales sont associées aux prédispositions familiales à développer des mélanomes, et sont corrélées avec un mauvais pronostic (Helgadottir et al., 2016). En particulier dans certains cas de prédispositions familiales, des mutations rares de CDKN2A touchent spécifiquement l'exon 1β et affectent l'épissage alternatif de son transcrit qui code pour $p14^{ARF}$ (Binni et al., 2010; Harland et al., 2005).

Altérations de p53 dans les modèles animaux de mélanome

L'importance de l'altération du fonctionnement de p53 pour le développement du mélanome est soutenue par les données expérimentales de plusieurs modèles animaux :

Dans les modèles murins il a été montré que p53 permet de prévenir la transformation des lésions bénignes en mélanomes malins et métastatiques (Terzian et al., 2010). De plus, l'expression de p53 et de ses cibles Noxa et PUMA, est nécessaire pour qu'il y ait induction de l'apoptose en réponse aux cassures de l'ADN induite par le Climacostol. Cette molécule produite par le protozoaire cilié *Climacostomum virens* est actuellement étudiée pour induire l'apoptose préférentiellement dans les cellules tumorales, et ralentir la croissance tumorale du mélanome *in vivo* chez la souris (Perrotta et al., 2016). Enfin, la mutation de p53 permet une plus forte croissance des mélanomes développées dans un contexte $H\text{-}RAS^{V12G}$ (Bardeesy et al., 2001), et dans un modèle de mélanome murin $BRAF^{V600E}$ la mutation de p53 est associée à un taux de survie beaucoup plus faible des souris (Goel et al., 2009).

Chez le poisson zèbre, la mutation $NRAS^{Q16K}$ provoque uniquement une hyperpigmentation bénigne, mais son association à la mutation de p53 permet le développement de mélanome (Dovey et al., 2009). Cette étude est d'autant plus intéressante qu'elle montre que dans ce modèle, la mutation $p53^{-/-}$ induit une progression tumorale bien plus rapide que la mutation hétérozygote $p53^{+/-}$.

Enfin, dans un modèle de Médaka qui développe des mélanomes en réponse à une surexpression de XMRK (EGFR chez le Médaka), une invalidation homozygote de p53 induit le développement de mélanomes nodulaires plus invasifs et de plus gros volumes (Schartl et al., 2010).

Rôle de p53 dans l'invasion du mélanome cutané

Bien que l'enchainement précis des mécanismes moléculaires nécessite encore d'être étudié, certains travaux montrent que p53 joue un rôle dans l'inhibition de l'invasion du mélanome.

Il a été montré que la réexpression d'une forme sauvage de p53 dans une lignée mutée pour le gène TP53 est capable d'inhiber la sécrétion de MMP2 et l'invasion des cellules de mélanome *in vitro* (Toschi et al., 2000). A l'inverse, il a été montré que l'expression d'une forme dominante négative de p53 augmente fortement l'invasion des cellules de mélanome A375P *in vitro* (Gadea et al., 2007).

Une étude montre qu'un traitement de cellules de mélanome par la metformine inhibe l'invasion de façon p53 dépendante. Cela est associé à l'inhibition de l'activité de MMP2 et MMP9, et à l'inhibition de l'expression de gènes impliqués dans l'EMT tels que SLUG et SNAIL. Cela se traduit *in vitro* par une diminution de l'expression de la N-cadhérine et de la fibronectine (FN), et *in vivo* par une inhibition de la croissance tumorale lors de xénogreffes chez la souris nude (Cerezo et al., 2013).

Enfin, chez la souris l'isoforme Δ122p53, qui est similaire à l'isoforme humaine Δ133p53 surexprimée dans les mélanomes (Avery-Kiejda et al., 2008), favorise l'invasion des cellules murines de mélanome via l'expression de chémokines telles que IL-6 et CCL2 (Roth et al., 2016).

Partie III : Les tétraspanines

La notion de famille des tétraspanines est apparue suite à l'identification de CD9 sous le nom de ALB6 (Acute Lymphoblastic leukemia antigen p24) (Boucheix et al., 1983, 1985; Kersey et al., 1981), puis aux clonages dans les années qui suivirent de TSPAN8 (CO-029) (Szala et al., 1990), CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 (Horejsí et Vlcek, 1991) et CD151 (Fitter et al., 1995; Hasegawa et al., 1996). On dénombre aujourd'hui 33 Tétraspanines chez l'homme et une nomenclature a été définie avec le nom de TSPAN suivi d'un numéro de 1 à 33. Cependant, pour nombre de ces protéines, leur nom de tétraspanine ne figure que rarement dans la littérature courante. C'est en particulier le cas des clusters de différenciation (CD) dont la nomenclature est plus ancienne et plus couramment utilisée pour l'identification de populations cellulaires.

On retrouve les tétraspanines chez les animaux, mais également chez les plantes (Wang et al., 2012), les champignons, et les protistes (Garcia-España et al., 2008). La conservation de cette famille de protéines au cours de l'évolution souligne l'importance des fonctions qu'elles occupent. Il est intéressant de noter cependant que la plupart des tétraspanines humaines sont apparues au cours de l'évolution des vertébrés jusqu'aux mammifères. Certains auteurs proposent de subdiviser les tétraspanines en 4 sous-familles, mais cette proposition n'a pas encore été suivie dans la pratique (Garcia-España et al., 2008).

Enfin, il est important de noter que chaque type cellulaire exprime au moins une tétraspanine, bien que les profils d'expressions soient très inégaux d'une tétraspanine à une autre.

1 : La structure des tétraspanines

Le nom tétraspanine vient du grec « tetra », « quatre »; et de de l'anglais « to span », « traverser » (ndlr : la membrane). La structure des tétraspanines (pour revue, Stipp et al., 2003) est composée de quatre domaines transmembranaires hydrophobes, symbolisés par quatre hélices α sur la **Figure 23**. Ces hélices α sont réunies par une très courte boucle intracellulaire et deux boucles extracellulaires de tailles inégales. Grâce à sa région hyper variable, la grande boucle extracellulaire (EC2) est essentielle pour définir la spécificité fonctionnelle propre à chaque tétraspanine. Cette grande boucle possède également un motif CCG conservé qui établit des ponts disulfures, et qui permet de différencier les tétraspanines des autres familles de protéines à quatre domaines transmembranaires dépourvues de ce motif (Seigneuret et al., 2001). Bien que moins étudiée, la petite boucle extracellulaire (EC1) a aussi son importance, notamment pour l'expression de la tétraspanine à la membrane (Masciopinto et al., 2001). Du côté intracellulaire, les courtes extrémités amino- et carboxy-terminales, ainsi que la petite boucle intracellulaire, présentent des cystéines juxta-membranaires qui peuvent être palmitoylées.

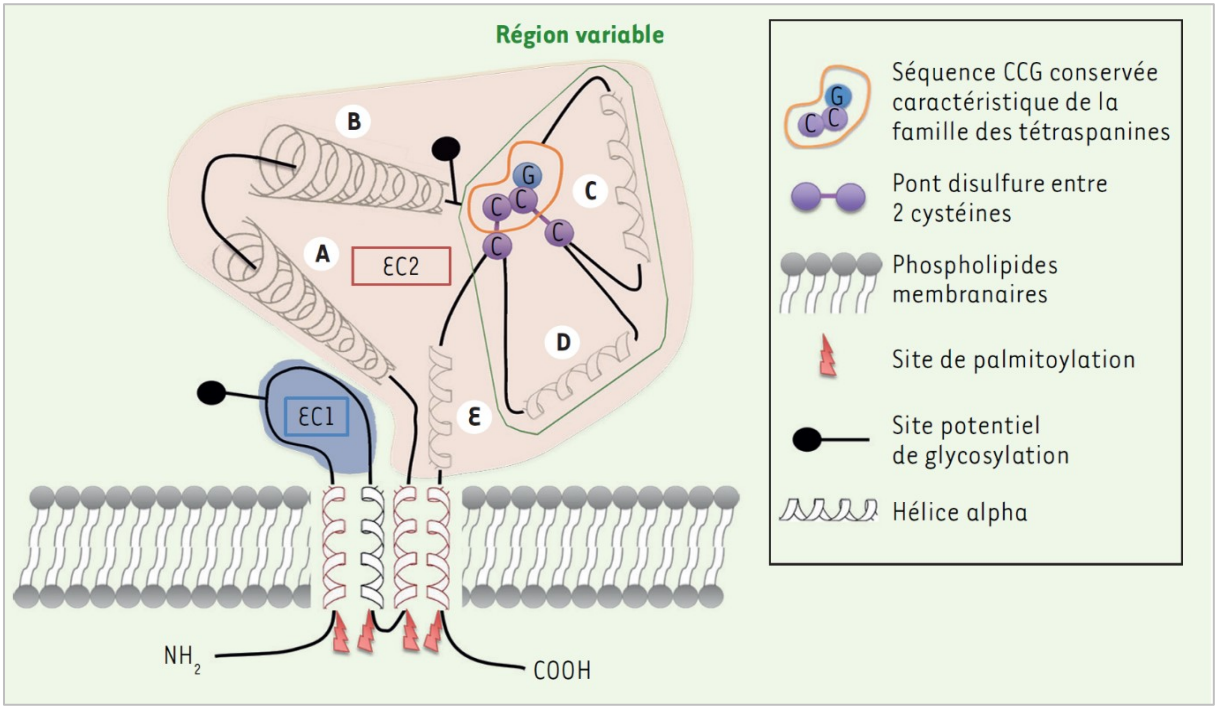


Figure 23 : Représentation schématique de la structure moléculaire commune aux protéines de la famille des tétraspanines.
(Source : Masse, Agaësse, Berthier-Vergnes, 2016 ; article de revue disponible dans son intégralité en Annexe 2 dans la version complète de ce manuscrit. DOI: https://doi.org/10.1051/medsci/20163203011).

Les tétraspanines font l'objet de modifications post-traductionnelles qui sont importantes pour leur bon fonctionnement, mais qui permettent également une régulation plus fine de leurs fonctions.

Le degré de palmitoylation conditionne les capacités de diffusions latérales des tétraspanines au sein du plasmalemme, et a également des conséquences importantes sur la stabilité et la composition des « réseaux tétraspanines », qui sont des plateformes moléculaires que nous étudierons par la suite (pour revue, Levy et Shoham, 2005). Par ailleurs, la mutation de certains sites de palmitoylation est capable de conférer un effet dominant négatif (Xu et al., 2009). Les tétraspanines sont également régulées par des glycosylations opérées au niveau des boucles extracellulaires, qui vont conditionner l'expression des tétraspanines à la membrane (Scholz et al., 2009), et les interactions avec leurs partenaires (les autres tétraspanines, les intégrines…), dont certains tel que CD9P-1 sont également fortement glycosylés (André et al., 2007).

2 : La localisation et la distribution des Tétraspanines

Les tétraspanines sont des protéines transmembranaires majoritairement exprimées à la surface des cellules où elles structurent des réseaux tétraspanines que nous aborderons par la suite. Cependant, certaines sont également exprimées dans les membranes des organites cellulaires ou à la surface d'exosomes (pour revue, Andreu et Yáñez-Mó, 2014). En effet, CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 et CD82 ont été identifiées dans les corps multi-vésiculaires et les vésicules multi-lamellaires.

Cette observation semble logique puisque les tétraspanines peuvent jouer un rôle dans le processus d'internalisation lors de l'endocytose. En particulier certaines tétraspanines dont CD151, CD82, CD63 et TSPAN8 présentent un motif YXX- ϕ (Y = tyrosine, x = résidu variable, ϕ = résidu hydrophobe volumineux) qui permet l'endocytose par puits de clathrine via son interaction avec les complexes d'adaptines (AP pour adaptor protein en anglais) (Stipp et al., 2003). CD63 a également d'autres rôles intracellulaires importants : en effet, CD63 est présente au niveau des lysosomes puisqu'elle y est adressée grâce à son motif GYEVM en C-terminal (Rous et al., 2002) et dans le cas particulier des mélanocytes, CD63 participe à la morphogenèse des mélanosomes (van Niel et al., 2011).

Les tétraspanines sont parmi les protéines les plus représentées à la surface des exosomes. La quasi-totalité des cellules sécrète des exosomes dont la composition dépend du type cellulaire. On y retrouve notamment les tétraspanines CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 et CD82 et TSPAN8 (pour revue, Andreu et Yáñez-Mó, 2014). Ces petites vésicules sont excrétées et permettent une forme de communication intercellulaire par le transfert de diverses molécules de la cellule émettrice vers la cellule réceptrice (protéines, lipides, ARN), et peuvent notamment participer à la présentation d'antigènes (Rana et Zöller, 2011; Théry et al., 2002).

Les cellules tumorales ne dérogent pas à cette règle et sécrètent également des exosomes dont un des rôles semble être de favoriser l'angiogenèse sur le site du développement tumoral. Les profils d'expressions des tétraspanines dans les exosomes tumoraux jouent un rôle crucial dans la promotion de la migration des cellules endothéliales, leur bourgeonnement ainsi que leur ramification (Gesierich et al., 2006; Rana et Zöller, 2011).

3 : Les réseaux tétraspanines (« Tetraspanin webs »)

Les tétraspanines structurent et régissent des microdomaines membranaires connus dans la littérature sous le nom de « tetraspanin web » ou « Tetraspanin Enriched Microdomains » (TEM) (Boucheix et Rubinstein, 2001). Ces réseaux sont des complexes multimoléculaires qui constituent des plateformes de signalisation régulant l'adhérence, l'endocytose, l'exocytose et d'autres processus biologiques fondamentaux, tels que la réponse immunitaire et l'angiogenèse. Au sein de ces réseaux, les tétraspanines établissent des interactions protéine-protéine pour réguler leurs partenaires (pour revue, Levy et Shoham, 2005).

Les tétraspanines établissent des interactions primaires avec leurs partenaires spécifiques qui sont directes et fortes puisqu'elles résistent à des détergents forts tels que le NP-40 et le Triton-X100 (Yauch et Hemler, 2000; Yauch et al., 1998 ; Charrin et al., 2003). Ces interactions primaires peuvent être nécessaires à l'expression du partenaire de la tétraspanine à la membrane (Shoham et al., 2003). Les tétraspanines établissent également des interactions secondaires qui sont conservées lors des co-immunoprécipitations avec des détergents doux tels que le Brij96 et le Brij97 X100 en présence de cations bivalents, mais pas en présence d'EDTA (Yauch et Hemler, 2000; Yauch et al., 1998, Szöllósi et al., 1996; Charrin et al., 2003). Ces interactions permettent de former des complexes multimoléculaires secondaires en associant plusieurs complexes primaires.

Les tétraspanines ont de nombreux partenaires (André et al., 2006; Le Naour et al., 2006a; Stipp et al., 2001) (pour revue, Hemler, 2005; Le Naour et al., 2006b) qu'ils régulent selon les contextes cellulaires. On y retrouve de nombreux acteurs de l'adhérence cellulaire tels que des protéines de la famille CAM (Cell Adhesion Protein), CD44 (Kuhn et al., 2007), et des intégrines (Serru et al., 1999) qui sont des récepteurs aux laminines de la lame basale. Les réseaux tétraspanine s'associent également à des facteurs de croissance tels que l'EGFR (Odintsova et al., 2000), à des protéines de signalisation telles que les kinases PKC et PIK4 (Yauch et Hemler, 2000), des protéines à domaines immunoglobulines (Le Naour et al., 2004) comme les protéines de la famille EWI (glutamine-tryptophan-isoleucine) (Charrin et al., 2003), CD9P-1 (CD9 Partner 1) (André et al., 2007), CD19, MHC de classe II. Les tétraspanines interagissent également avec des protéases de la famille ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase Domain) et MMP (Matrix MetalloProtease) (pour revue, Yáñez-Mó et al., 2011).

Les tétraspanines interagissent également avec des partenaires non protéiques parmi lesquels figurent les glycosphingolipides comme les gangliosides monosialiques GM2 et GM3 qui jouent un rôle dans l'organisation de la membrane et dans sa fluidité, et qui sont également importants dans l'établissement des interactions des tétraspanines avec les récepteurs aux facteurs de croissance à la membrane. À titre d'exemple, leur expression diminue l'association de CD82 avec CD151 et augmente dans le même temps son association avec l'EGFR (Odintsova et al., 2006) et c-Met (Todeschini et al., 2007).

Enfin, les réseaux tétraspanines sont distincts des radeaux lipidiques (Lipid Rafts) tant au regard de leurs caractéristiques biochimiques et biophysiques, qu'au regard de leurs rôles biologiques. En effet, contrairement aux radeaux lipidiques, du fait de leur nature les réseaux tétraspanines sont peu sensibles à la déplétion en cholestérol et ne réagissent pas de la même façon aux variations de températures (pour revue, Hemler, 2005; Le Naour et al., 2006b).

4 : Les tétraspanines et le cancer

Dans le cancer, certaines tétraspanines agissent comme promoteurs et d'autres comme suppresseurs de métastase. Nous nous focaliserons ici sur les tétraspanines les plus étudiées dans le cancer.

4.1 : CD9

L'implication de CD9, également appelée MRP-1 pour Motility Related Protein-1, est un aspect très étudié dans les cancers, comme en témoignent les nombreux travaux publiés à ce sujet.

De façon générale, son expression est corrélée à un bon pronostic chez les patients atteints de cancers du poumon (Higashiyama et al., 1995), du sein (Miyake et al., 1996), du côlon (Mori et al., 1998), de l'ovaire (Houle et al., 2002). La diminution de l'expression de CD9 semble favoriser l'augmentation de la motilité et du potentiel métastatique de cellules de plusieurs types de cancers (Ikeyama et al., 1993). Plus récemment, il a été montré *in vitro* que l'inhibition de l'expression de CD9 favorise la motilité de cellules de cancer du sein (Powner et al., 2011), ainsi que l'invasion de cellules de cancer de l'endomètre (Park et al., 2000). Une étude réalisée sur le cancer du poumon suggère que la régulation de la motilité par CD9 est dépendante de l'intégrine β1 (Funakoshi et al., 2003), mais CD9 peut également inhiber la signalisation de l'EGFR au travers de complexes CD9-EGFR et CD9-intégrine β1 qui sont colocalisées au niveau de la membrane des cellules de carcinome hépatocellulaire et de cancer de l'ovaire (Murayama et al., 2008). De, plus une étude récente montre que l'inhibition de CD9 par ARNi favorise l'expression de l'EGFR en surface des cellules, ce qui favorise la croissance tumorale et le développement de métastases dans le cancer du pancréas (Tang et al., 2015a). Dans un modèle murin de cancer de la prostate, CD9 ne semble pas impliqué dans l'initiation tumorale, mais son invalidation augmente significativement le développement de métastases hépatiques (Copeland et al., 2013).

Cependant, certains travaux rapportent une corrélation de l'expression de CD9 avec un mauvais pronostic dans le cancer gastrique (Hori et al., 2004; Soyuer et al., 2010). Soutenant ces observations, une étude récente montre que le traitement par un anticorps anti-CD9 permet d'inhiber la progression tumorale des cellules humaines de cancer gastrique xenogreffées chez la souris, via des mécanismes anti prolifératifs, pro apoptotiques, et anti angiogéniques (Murayama et al., 2015). En outre, dans la leucémie aigue lymphoblastique B, l'expression de CD9 a été associée avec un haut potentiel de génération de cellules souches tumorales (Nishida et al., 2009) qui favorisent l'apparition de résistances aux drogues. De façon intéressante, cela est inhibé par un traitement avec un anticorps dirigé contre CD9 (Yamazaki et al., 2011). Toutefois, dans ces deux études, les auteurs n'apportent pas d'explication mécanistique de ces observations.

Enfin, dans certains types de cancers où l'expression de CD9 est un facteur de bon pronostic, la progression tumorale peut amener CD9 à devenir un facteur de mauvais pronostic. Ainsi, CD9 est associé à la chimiorésistance dans le cancer du poumon de type SCLC (Small Cell Lung Cancer) (Kohmo et al., 2010), dans lesquels CD9 induit pourtant l'apoptose via l'induction de l'expression de calrétinine (He et al., 2013). De même, pour les cellules circulantes de cancer du sein, l'expression de CD9 est associée *in vivo* chez la souris à un ostéo- tropisme et son inhibition par un traitement avec un anticorps anti CD9 permet de retarder l'établissement de métastases et la destruction des tissus osseux (Kischel et al., 2012).

4.2 : CD82

La fonction de CD82 est aujourd'hui bien documentée dans de nombreux cancers. CD82 fait partie des suppresseurs de métastases et régule la migration, l'invasion et la motilité cellulaire, ainsi que la tumorigenèse par induction de l'apoptose et de l'autophagie (pour revue, Tsai et Weissman, 2011). Par ailleurs l'expression de CD82 par les cellules endothéliales inhibe l'angiogenèse via la régulation des interactions des Gangliosides, du clustering des radeaux lipidiques, et de l'endocytose de microdomaines membranaires liés à CD44 (Wei et al., 2014).

CD82 induit l'apoptose probablement par différents mécanismes impliquant le microenvironnement de la cellule, l'autophagie, le stress du réticulum endoplasmique, et par l'intermédiaire d'une activation de FOXO et de l'inhibition de la signalisation par AKT (pour revue, Tsai et Weissman, 2011).

Par ailleurs, CD82 inhibe la signalisation induite par plusieurs récepteurs à tyrosine kinase tels que l'EGFR et c-MET/HGFR. Ainsi, CD82 inhibe l'activation intégrine-dépendante de l'HGFR dans les cellules de cancer de la prostate. Dans des cellules mammaires épithéliales et tumorales, Odintsova et al. montrent que la dimérisation de l'EGFR induite par la fixation de l'EGF est inhibée par CD82 qui induit également l'internalisation de l'EGFR lorsqu'il est activé (pour revue, Tsai et Weissman, 2011), tout en inhibant son ubiquitinylation qui est induite lors de la fixation de l'EGF (Odintsova et al., 2013).

CD82 favorise l'adhérence cellule-cellule en stabilisant les complexes E-cadhérine/β-caténine, ce qui inhibe la dissémination à partir de la tumeur primaire (Abe et al., 2008). CD82 va également diminuer l'adhérence à la laminine et la migration dépendante de l'intégrine α6 en augmentant son internalisation (He et al., 2005). L'effet de CD82 sur la motilité est par ailleurs potentialisé par l'expression d'EWI-2 (Zhang et al., 2003), bien que le mécanisme précis reste à élucider.

CD82 freine l'invasion des cellules en régulant leurs capacités de dégradation de la matrice. Ainsi, dans des cellules épithéliales mammaires normales non-invasives l'expression de CD82 induit une diminution d'un facteur 50 de l'activité d'uPAR (urokinase Plasminogen Activator surface Receptor) en favorisant son association avec l'intégrine α5β1, ce qui a pour effet d'empêcher l'interaction avec son ligand (Bass et al., 2005). CD82 inhibe également l'invasion dépendante de MMP9 via une régulation positive de TIMP1 dans le cancer du poumon (Jee et al., 2006). De plus, l'expression de CD82 par les cellules endothéliales freine l'angiogenèse en modifiant le clustering des radeaux lipidiques ainsi que le trafic de CD44/H-CAM (Homing-associated Cell Adhesion Molecule) *in vitro,* ce qui semble inhiber l'invasion de cellules cancer du sein *in situ* (Wei et al., 2014).

4.3 : CD151

La plupart des données cliniques et expérimentales associent l'expression de CD151 à un mauvais pronostic dans les cancers du poumon, du côlon, du foie, de l'œsophage, du pancréas, de l'endomètre, du sein, de la prostate et dans les glioblastomes (pour revue, Kumari et al., 2015 ; Sadej et al., 2014).

Les interactions de CD151 avec les intégrines favorisent la migration et l'invasion de plusieurs cancers. Ainsi, il est démontré que CD151 module la migration et l'adhérence dépendante de ses partenaires intégrines α3β1, α6β4, récepteurs de la laminine-332 (Zevian et al., 2011) et α6β1 récepteur de la laminine-1 (Lammerding et al., 2003). CD151 favorise également la migration en régulant le trafic intracellulaire des intégrines α3β1, α5β1, α6β1 (Liu et al., 2007). Dans un modèle de carcinome épidermoïde, il a été montré que CD151 peut recruter PKCα et ainsi réguler l'intégrine β4 par le jeu d'une phosphorylation en Ser1424. Cette phosphorylation est importante car elle induit le désassemblage des hémidesmosomes et participe à la perte de la polarité épithéliale, ce qui favorise un potentiel invasif (Li et al., 2013). Une étude montre également que l'interaction de CD151 avec α6β1 dans les cellules plaquettaires favorise l'angiogenèse (Huang et al., 2016), mais l'impact de cela sur la dissémination métastatique des cellules tumorales reste à démontrer. Enfin, CD151 induit la dissémination métastatique de cellules de carcinome épidermoïde (HEp3) en inhibant l'ancrage des cellules à la matrice et en favorisant l'intravasation (Zijlstra et al., 2008).

Une surexpression de CD151 est associée à un mauvais pronostic dans les cancers du sein (Kwon et al., 2012, Sadej et al., 2009). Les souris invalidées pour CD151 ont permis de montrer que CD151 joue un rôle important lors de l'initiation et la progression tumorale du cancer du sein, mais ne semble pas influencer le développement des métastases (Roselli et al., 2014). Pourtant, il a été montré dans ce cancer que CD151 favorise la tumorigénicité en réponse à l'interaction des cellules tumorales avec les cellules de l'endothélium *in vitro* (Sadej et al., 2009).

De façon intéressante, une publication sur les cancers du sein montre que l'expression de CD151 a deux impacts contraires selon qu'il s'agisse d'un carcinome canalaire invasif (IDC pour Invasive Ductal Carcinoma), ou bien d'un carcinome lobulaire invasif (ILC pour Invasive Lobular Carcinoma). En effet, l'expression de CD151 est associée à un mauvais pronostic dans les IDC, mais son absence dans les ILC est associée à un faible taux de survie des patients (Romanska et al., 2015).

De plus, l'expression de CD151 peut être également associée à des pronostics positifs dans certains cancers. En effet, une diminution d'expression de CD151 est associée à des stades avancés du cancer de la vessie (Minner et al., 2012). Dans un modèle de carcinome épidermoïde l'expression de CD151 favorise la cohésion entre les cellules de la tumeur par la régulation de l'intégrine α3β1, ce qui inhibe la migration collective tridimensionnelle (Zevian et al., 2015).

Dans le cancer de l'ovaire, l'expression de CD151 est diminuée dans 90% des métastases *in situ*, alors que son expression et son association avec l'intégrine α3β1 semble inhiber la prolifération et la croissance tumorale par répression des marqueurs de l'EMT et de la voie WNT/β-caténine (Baldwin et al., 2014). Cependant, un traitement par siARN ou par un anticorps dirigé contre CD151 permet d'inhiber la migration et l'invasion des cellules de cancer épithélial de l'ovaire (Mosig et al., 2012), ce qui souligne l'importance du contexte cellulaire précis dans la détermination du rôle pro- ou anti-tumoral de CD151.

En conclusion, ces données montrent que l'expression et la fonction de CD151 peut être corrélée positivement ou négativement au potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales, soulignant le rôle complexe de CD151 (pour revue, Sadej et al., 2014), qui dépend entre autres du type de cancer et des partenaires moléculaires présents.

4.4 : TSPAN12

TSPAN12 est connue depuis 2009 comme un acteur important de l'angiogenèse non tumorale, en particulier lors du développement vasculaire rétinien (Junge et al., 2009), mais également comme un promoteur d'invasion tumorale. En effet, une étude réalisée sur des cellules de tumeur mammaires MCF-7 et de fibrosarcome HT1080 montre que l'interaction de TSPAN12 avec CD81 et CD9 favorise les fonctions protéolytiques de MT1-MMP. Aussi, l'altération de l'interaction de ces trois protéines perturbe l'activation de MMP-2, la protéolyse et la croissance tumorale (Lafleur et al., 2009).

Une deuxième étude de 2009 réalisée sur des cellules MCF-7, HT1080 et SH-SY5Y (neuroblastome) montre que TSPAN12 interagit avec la protéase membranaire ADAM10 (A Membrane-Associated Metalloproteinase) dont elle favorise la maturation (Xu et al., 2009). Ainsi, l'inhibition de TSPAN12 dans des cellules de tumeur mammaire humaine induit l'apoptose et inhibe la croissance tumorale, mais dans le même temps cela promeut la formation de métastases ainsi que les interactions des cellules tumorales avec les cellules endothéliales.

En conclusion, il est intéressant d'observer que bien qu'elle induise la protéolyse lorsqu'elle est associée à la protéase ADAM10, TSPAN12 a dans le même temps un effet protecteur quant à la dissémination métastatique, ce qui pourrait probablement être expliqué par ses fonctions physiologiques lors de l'angiogenèse (Junge et al., 2009), bien que cela reste à étudier.

4.5 : TSPAN8

Dans les tissus sains, la tétraspanine 8 a une expression très restreinte. Elle est exprimée en particulier dans les épithéliums du colon et de l'estomac. L'implication de l'expression de TSPAN8 est de plus en plus documentée dans les progressions tumorales des carcinomes depuis sa première apparition dans la littérature scientifique sous le nom de CO-029 lorsqu'elle fut associée aux carcinomes du côlon (Sela et al., 1989). À ce jour, tous les résultats publiés indiquent que l'expression de cette protéine est associée à un mauvais pronostic dans les cancers. Ainsi, différentes études montrent que TSPAN8 favorise l'angiogenèse et le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales.

La surexpression de TSPAN8 a été associée à un mauvais pronostic dans les cancers du système digestif tels que le carcinome de l'œsophage (Botelho et al., 2010; Zhou et al., 2008), le carcinome hépatocellulaire (Kanetaka et al., 2001, 2003; Tanaka et al., 2002), le cancer pancréatique (Fujiwara et al., 2014; Gesierich et al., 2005), le cancer de l'ovaire (Fekete et al., 2012), et le cancer gastrique (Anami et al., 2016; Mottaghi-Dastjerdi et al., 2015). L'expression de TSPAN8 est également associée à l'agressivité de lignées cellulaires de glioblastome (Pan et al., 2015b) et de cancer de la prostate (Bhansali et al., 2016), deux types de cancers dans lesquels TSPAN8 est surexprimée. Une étude rapporte également une amplification génique de TSPAN8 sur un modèle d'étude du liposarcome (Persson et al., 2008).

Différentes études ont permis d'établir que la présence de TSPAN8 au sein d'exosomes favorise l'angiogenèse (Gesierich et al., 2006, Nazarenko et al., 2010). TSPAN8 est également promoteur de métastases (Kanetaka et al., 2003) via la promotion de la mobilité cellulaire (Greco et al., 2010), de la migration et de l'invasion, ainsi que de la croissance tumorale par inhibition de l'apoptose (Kuhn et al., 2007).

Expression de TSPAN8 dans les cancers du système digestif

Les nombreux travaux de l'équipe de M. Zöller sur un modèle d'adénocarcinome pancréatique de rat ont mis à jour certains partenaires de TSPAN8 (D6.1A chez le rat). On retrouve dans les lignées métastatiques utilisées dans ces études (voir Claas et al., 1996) l'expression de TSPAN8 et ses partenaires : les tétraspanines CD9 et CD81, EpCAM, les intégrines α3, α6β1 et α6β4 et certaines isoformes de CD44v (Claas et al., 1998; Günthert et al., 1991; Herlevsen et al., 2003; Schmidt et al., 2004). Ainsi, la co-expression de TSPAN8 avec l'intégrine α6β4 confère des capacités de dissémination et de formation de métastases hépatiques d'adénocarcinomes du pancréas (Herlevsen et al., 2003). À ce titre, ces auteurs ont montré que TSPAN8, α6β4 et CD44V6 constituent une signature moléculaire des cellules circulantes initiatrices de tumeur du pancréas (Wang et al., 2013).

L'expression de TSPAN8 dans ce modèle semble également liée avec une plus forte ulcération des lésions métastatiques, puisqu'un anticorps anti-*D6.1A* permet de réduire les saignements (Claas et al., 1998). Toujours en utilisant ce modèle, Zöller *et al.* ont pu étudier la composition d'exosomes contenant TSPAN8 et démontrer son interaction avec CD151, CD81, CD9, et la sous-unité de α4 : CD49d (Nazarenko et al., 2010). Ils ont également montré que les TEM de ces exosomes sont internalisés plus rapidement par les cellules endothéliales lorsqu'ils contiennent TSPAN8, et que TSPAN8 favorise l'angiogenèse à travers l'augmentation de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales (Nazarenko et al., 2010). Enfin, à l'aide d'un modèle d'étude de cellules humaines d'adénocarcinome pancréatique (Nishimori et al., 2001), ils ont pu montrer que TSPAN8 est associée à CD151 et α6β4, et que cette association semble renforcée par l'activation de PKC (Gesierich et al., 2005).

L'étude du cancer colorectal a permis de montrer que TSPAN8 semble également promouvoir la motilité cellulaire au travers de son interaction avec E-cadhérine. Bien que ce phénotype invasif soit inhibé par l'expression de p120-caténine, la présence de cette dernière à la membrane semble nécessaire à l'inhibition de la migration par un anticorps dirigé contre TSPAN8 (Greco et al., 2010). La progression du cancer colorectal semble également favorisé par un complexe composé de TSPAN8, Claudin-7, EpCAM, et l'isoforme CD44v6, qui semble capable de conférer aux cellules une résistance à l'apoptose induite par un traitement au cisplatine (Kuhn et al., 2007).

Concernant les autres cancers du système digestif, TSPAN8 favorise la dissémination métastatique du carcinome de l'œsophage dans un modèle murin et du foie lors de xénogreffes de cellules humaines via l'induction de l'expression de ADAM12 (Zhou et al., 2008 ; Fang et al., 2016). Dans le cancer gastrique humain, TSPAN8 promeut la croissance et la migration des cellules tumorales via l'activation de la voie ERK (Wei et al., 2015). Il semblerait de plus que l'expression de TSPAN8 dans ce cancer soit nécessaire à la stimulation de la prolifération et de l'invasion par l'EGF (Zhu et al., 2015). Enfin, une dernière étude récente corrobore ces observations en montrant que TSPAN8 est surexprimée dans 34% des cancers gastriques et que cela semble être corrélé avec une angiogenèse tumorale plus forte chez les patients. Les auteurs montrent également *in vivo* que cette surexpression est impliquée dans la progression et l'invasion des cellules du cancer gastrique, et plus intéressant encore, que ces effets sont inductibles à l'aide d'exosomes contenant TSPAN8 (Anami et al., 2016).

Expression de TSPAN8 dans le gliome

Dans le gliome, TSPAN8 favorise la migration des cellules à travers la formation d'un complexe avec l'intégrine α3 et rictor, une protéine du complexe mTORC2 dont l'activation semble dépendre de l'association de rictor avec TSPAN8 (Pan et al., 2015c). Une seconde étude montre de TSPAN8 interagit avec FAK (Focal Adhesion Kinase) et induit son activation, et que son niveau d'expression augmente avec le grade des tumeurs et semble activer la migration, la prolifération, ainsi que la résistance au temozolomide, une drogue utilisée en chimiothérapie (Pan et al., 2015b).

Implication de TSPAN8 et de ses partenaires dans le cancer

Pour favoriser ces phénotypes agressif, TSPAN8 dépend de l'intégrité des complexes protéiques dans lesquels elle est impliquée : le complexe TSPAN8/Rictor/intégrine α3 qui favorise la migration de cellules de gliome (Pan et al., 2015c) ; et le complexe TSPAN8/EpCAM/claudin-7/CD44v6 qui est exprimé dans le cancer colorectal et favorise le développement de métastases (Kuhn et al., 2007). En effet, l'inhibition de l'expression des membres de ces complexes inhibe l'effet de TSPAN8, ce qui souligne une fois de plus l'importance des partenaires présents pour définir l'action précise d'une tétraspanine.

De plus, TSPAN8 module l'expression de certains de ses partenaires. En particulier dans le cancer colorectal, TSPAN8 semble promouvoir l'expression de CD44 et MelCAM, tout en inhibant l'expression des intégrines α3 et α5 (Guo et al., 2012). Dans le cancer de la prostate, la stimulation du récepteur aux androgènes semble capable d'inhiber l'expression de TSPAN8 au niveau du transcrit. Cependant, les auteurs rapportent dans le même temps une stabilisation mutuelle du récepteur et de la protéine TSPAN8, ce qui permet l'augmentation des niveaux d'expression protéique de TSPAN8. Les auteurs rapportent de plus la localisation d'une fraction du pool de TSPAN8 au niveau nucléaire qui est accrue sous l'influence de l'activation du récepteur aux androgènes avec lequel TSPAN8 interagit. Enfin, TSPAN8 semble également promouvoir l'invasion et la migration des cellules du cancer de la prostate (Bhansali et al., 2016).

Perspectives cliniques de l'expression de TSPAN8 dans le cancer

Des études récentes suggèrent que TSPAN8 pourrait être utilisée comme biomarqueur de pronostic et de suivi de la progression tumorale (Rodia et al., 2016) et comme cible thérapeutique pour traiter les cancers de l'ovaire (Park et al., 2016) et du côlon (Kim et al., 2015). En effet, l'expression de l'ARNm de TSPAN8 est très significativement augmentée dans le sang des patients atteints de cancer colorectal par rapport aux sujets sains, et peut être détectée dans le sang par qPCR (Rodia et al., 2016). De plus, cibler TSPAN8 avec un anticorps dirigé contre la large boucle extracellulaire permet d'augmenter l'internalisation de TSPAN8, ce qui inhibe son expression en surface, et inhibe l'invasion du cancer colorectal métastatique *in vitro* en chambre de Boyden (Kim et al., 2015). Cela inhibe également l'invasion *in vitro* ainsi que l'incidence de métastases de cellules de cancer de l'ovaire *in vivo* chez la souris (Park et al., 2016). Une autre étude montre chez la souris nude que lors de xénogreffes de lignées cellulaires humaines de cancer du côlon, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre TSPAN8 permet d'inhiber la croissance tumorale, mais ne semble pas avoir d'effet significatif sur l'angiogenèse (Ailane et al., 2014), contrairement à ce qui avait été montré dans un modèle de mélanome de rat avec un anticorps dirigé contre D6.1A (nom de TSPAN8 chez le rat) (Gesierich et al., 2006).

4.6 : Implication des interactions tétraspanine-tétraspanine dans le cancer

Pour une même tétraspanine, il est important de constater la complexité des observations rapportées, qui sont parfois contradictoires. Cela souligne l'importance du contexte pour la détermination de la fonction précise d'une tétraspanine. En effet, le contexte cellulaire, mais également le stade de progression tumorale et le choix du modèle d'étude sont autant de facteurs qui vont déterminer quels seront les partenaires disponibles, quelles seront les voies de signalisations activées, et quels effets aura l'expression d'une tétraspanine.

Différents travaux soulignent l'importance du réseau tétraspanine pour les fonctions de ces protéines. C'est en particulier le cas de l'association de CD9 et CD82 étudiée pour son implication dans le cancer depuis 1997 (Huang et al., 1997). En effet, les défauts d'expression et d'interaction de ces tétraspanines sont associés à la progression tumorale dans le cancer ovarien (Houle et al., 2002), ainsi que dans le cancer du sein (Huang et al., 1998). En accord avec cela, en criblant plusieurs types de tissus sains et cancéreux (Huang et al., 1997), il a été rapporté que l'expression de CD9 et/ou CD82 est très fréquemment retrouvée dans différents tissus sains, alors que la diminution de leur expression dans les tissus cancéreux est encore une fois associée à un mauvais pronostic. Soutenant ces observations, il a été montré *in vivo* que l'expression ectopique conjointe de ces deux tétraspanines réduit significativement le potentiel métastatique de cellules de carcinome pulmonaire de Lewis (LLC pour Lewis Lung Carcinoma) (Takeda et al., 2007).

Une étude sur le cancer du côlon suggère que cette association de CD9 avec CD82 est dépendante de la présence de l'intégrine α3, et qu'en l'absence de ce complexe protéique, les pronostics sont nettement moins favorables (Hashida et al., 2002). Dans le cancer colorectal, l'interaction de la glycoprotéine 90K avec le complexe CD9/CD82 semble avoir un effet protecteur en inhibant la signalisation β-caténine par dégradation protéasomale, non pas par la voie classique d'ubiquitination par GSK-3β (Glycogen Synthase Kinase 3β), mais par un procédé similaire : l'ISGylation (Zhang et Zhang, 2011) opérée par lSG15 (interferon-stimulated gene-15) (Lee et al., 2010).

Enfin, bien que l'expression conjointe de TSPAN8 et CD151 au sein d'exosomes semble jouer un rôle crucial dans le dialogue entre ces cellules initiatrices de cancer du pancréas et leur environnement (Yue et al., 2015b) ; et que CD151 et TSPAN8 contribuent tous deux la dissémination métastatique dans un même modèle de tumeur pancréatique chez le rat ; il apparait que les modes d'action de ces deux tétraspanines diffèrent (Yue et al., 2013).

En effet, dans ces cellules, l'effet de TSPAN8 est plus marqué sur la migration des cellules et dépend de paxillin, de la phosphorylation de l'intégrine β4, de l'activation de RAS et de FAK et du recrutement de src. Alors que l'effet de CD151 est quant à lui plus étroitement lié avec les protéases que pour TSPAN8. Ainsi, alors que CD151 est nécessaire à l'invasion tant sur Matrigel™ que sur collagène, TSPAN8 ne semble pas promouvoir l'invasion sur collagène, mais uniquement sur Matrigel™. À l'inverse, l'expression de TSPAN8 est plus importante que celle de CD151 pour conférer à la cellule des capacités de migration sur laminine-332 (Yue et al., 2013).

5 : Les tétraspanines dans le mélanome cutané

Dans le cas particulier de la progression tumorale du mélanome cutané, les rôles de certaines tétraspanines ont été étudiés. Dans cette partie, nous n'essayerons pas d'être exhaustifs, mais d'illustrer l'intérêt et l'importance de cette famille de protéines dans la physiopathologie du mélanome (pour revue, Masse et al., 2016, disponible en Annexe 2).

5.1 : CD63 dans le mélanome

CD63 a été la première tétraspanine identifiée dans les cellules de mélanome sous le nom de NGA (Neuroglandular Antigen) et ME491 (Demetrick et al., 1992; Sikora et al., 1987) et a depuis été étudiée principalement dans ce type de cancer. CD63 est exprimée depuis les cellules de la crête neurale jusqu'au mélanocyte mature dans lequel elle est retrouvée au niveau des mélanosomes (Demetrick et al., 1992). Il été observé qu'une perte de son expression est associée à un potentiel invasif accru des cellules de mélanome (Kondoh et al., 1993), car CD63 inhibe dans ces cellules la motilité, la dégradation de la matrice et l'invasion (Jang et Lee, 2003). L'expression ectopique de cette tétraspanine dans des cellules humaines de mélanome négatives pour CD63 réduit la croissance tumorale et le potentiel métastatique de ces cellules lors d'une injection intradermique chez la souris nude (Radford et al., 1995, 1997). Malgré cette observation *in vivo,* les auteurs avaient rapporté que l'expression de CD63 n'avait pas d'impact sur la croissance *in vitro*, soulignant l'importance de l'environnement de la cellule. L'expression de CD63 réduit également la motilité des cellules de mélanome, tout en augmentant leur adhérence à divers supports (Radford et al., 1995, 1997).

De plus, CD63 inhibe la transition épithélio- mésenchymateuse du mélanome via une diminution d'expression de N-cadhérine et une augmentation d'expression d'E-cadhérine (Lupia et al., 2014). Cependant, une étude de 2013 sur un modèle murin rapporte que CD63, l'intégrine β1 et TIMP1 forment un complexe capable d'induire une résistance à l'anoikis via l'activation de la signalisation par PI3-K lors de la progression du mélanome (Toricelli et al., 2013). Timp1 étant décrit par ailleurs pour sa capacité à induire la résistance dans le mélanome (Ricca et al., 2009), cela souligne l'importance des partenaires d'une tétraspanine pour le bon exercice de ses fonctions.

5.2 : CD9 dans le mélanome

CD9 dans le mélanome est associé à un pronostic favorable. Ainsi, le taux d'expression de CD9 est inversement corrélé au potentiel métastatique et à la taille du mélanome laissant supposer un rôle anti tumoral et anti métastatique (Ikeyama et al., 1993). En accord avec cela, une diminution d'expression de CD9 due à l'ostéopontine est associée à une augmentation de l'invasion. Cependant CD9 serait positivement impliquée dans l'intravasation (Longo et al., 2001), mais aussi dans la promotion de métastases via l'expression et l'activation de la métalloprotéase MMP-2. Cette induction d'expression de MMP-2 est réalisée à travers les voies de signalisations de p38 MAPK, JNK et c-Jun (Hong et al., 2005).

5.3 : CD82 dans le mélanome

En accord avec son rôle de suppresseur de tumeurs dans nombre de cancers, l'expression de CD82 diminue avec la progression du mélanome (Tang et al., 2014). CD82 diminue le potentiel invasif et métastatique des cellules de mélanome *in vivo* (Takaoka et al., 1998), ainsi que l'expression de la MMP2 et le nombre de fibres de stress induites par ROCK (Rho-associated protein Kinase). CD82 favorise également l'expression d'ING4 (INnhibitor of Growth 4) en inhibant l'expression de p65. Cette expression d'ING4 est également associée à une inhibition de l'expression d'IL6 et du VEGF et de l'angiogenèse *in vitro* (Tang et al., 2014, 2015b).

CD82 est de plus capable d'induire la sénescence et d'inhiber la migration transendothéliale des cellules de mélanome, freinant ainsi leur dissémination (Khanna et al., 2014). L'interaction de CD82 dans des cellules de mélanome murin B16BL6 avec la protéine DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines) exprimée à la surface des érythrocytes et des cellules endothéliales inhibe la formation de métastases pulmonaires et participe à l'induction de la sénescence lors du contact des cellules tumorales avec les cellules sanguines (Bandyopadhyay et al., 2006). Cette interaction cellule-cellule est capable de maintenir la dormance des cellules souches hématopoïétiques de par leur contact avec des macrophages exprimant DARC (Hur et al., 2016), mais il reste à déterminer si un mécanisme similaire pourrait induire la dormance de cellules souches tumorales dans le cadre de l'acquisition de résistances aux thérapies anti cancéreuses chez les patients atteints de mélanome.

En effet, non seulement l'expression de CD82 est associée à une diminution de phosphorylation d'AKT en Ser473 (Tang et al., 2015b), mais en plus la sénescence est induite lors de la fixation de CD82 à DARC (Duffy Antigen Receptor/Chemokine) via l'expression de p21. Enfin, l'inhibition de la sécrétion d'IL8 permet de ralentir le désassemblage des cadhérines vasculaires – endothéliales, étape nécessaire à la migration transendothéliale.

En l'absence de CD82 un épissage alternatif de CD44 par U2AF produit une isoforme CD44v8-10, qui est responsable d'une plus grande adhérence des cellules circulantes aux parois vasculaires et permet le roulement qui précède la migration transendothéliale (Zhang et al., 2016). Soulignant la pertinence de ces observations pour les patients, les stades plus avancés de mélanomes sont corrélés avec une forte diminution d'expression de CD82 par rapport aux nævi dysplasiques (Tang et al., 2014). Il apparait que cette diminution serait plus souvent dû à une perte d'hétérozygotie (LOH pour Loss Of Heterozygosity), et à une perturbation de la balance allélique, plutôt qu'à une différence de méthylation (Kim et al., 2009). Étant donné l'ensemble des travaux présentés ci-dessus, il est probable que CD82 devienne à l'avenir un marqueur de choix dans le diagnostic et le suivi des mélanomes.

5.4 : CD151 dans le mélanome

CD151 semble également jouer un rôle dans la régulation de la motilité et de la migration transendothéliale des cellules de mélanome, bien que ce rôle semble plus modéré (Longo et al., 2001). Ainsi, par surexpression de CD151 dans des cellules de mélanome, il a été montré que les interactions homophiliques de CD151 induisent une augmentation de la motilité des cellules ainsi que l'expression de MMP-9 via l'activation de la signalisation c-jun dépendante (Hong et al., 2006), mais également via l'association avec l'intégrine β1 qui va alors activer les petites GTPases Ras Rac1 et CDC42 (Hong et al., 2012). Ces observations sont corroborées par des études qui observent une diminution de l'incidence de métastases lorsque CD151 est invalidé (Takeda et al., 2011), et que CD 151 est impliquée dans la réponse chémotactique des cellules de mélanomes vers un milieu conditionné par des cellules endothéliales lymphatiques contenant de la laminine-421 (Saito et al., 2009).

5.5 : Interactions de CD9 et CD81 dans le mélanome

Étant donné le fonctionnement en réseau des tétraspanines, leurs interactions sont également importantes dans le développement du mélanome. L'implication des interactions de tétraspanines entre elles dans le mélanome sont observées dès 1996 avec une association de CD63, CD9 et CD81 ainsi que l'intégrine β1 sur deux différentes lignées humaines (Radford et al., 1996).

Une étude récente montre que l'association de CD9 et CD81 joue un rôle intéressant dans la régulation de la signalisation TGF-β dans le cadre de la progression du mélanome. En effet, ces 2 tétraspanines serviraient de support à l'association des récepteurs TβR1 et TβR2, augmentant ainsi drastiquement la signalisation de cette voie. Ces auteurs suggèrent que la cinétique de désactivation/activation de cette voie observée lors de la progression tumorale du mélanome serait le reflet de la séquestration de CD9 et CD81 par la protéine EWI-2 qui inhibe la progression tumorale lorsque elle est exprimée (Wang et al., 2015).

5.6 : TSPAN8 dans le mélanome

Le rôle de TSPAN8 dans le mélanome a été démontré et étudié pour la première fois par notre équipe :

Lors de travaux antérieurs, il avait été montré que les cellules de mélanome qui expriment la lectine Paenut Aglutinin (PNA, un résidu glycosylé spécifique) sont capables de dégrader la jonction dermo-épidermique (JDE), et sont associées chez les patients à un plus fort risque de dissémination métastatique et à un mauvais pronostic (Berthier-Vergnes et al., 1993; Cochran et al., 1999). Ainsi, un modèle qui mime la transition RGP/VGP a pu être développé en utilisant deux clones de cellules de mélanome : les cellules invasives PNA-positives (T1C3) et les cellules non-invasives PNA-négatives (IC8), sélectionnées à partir de la lignée de mélanome M4BE (Bailly et Doré, 1991; Zebda et al., 1994). En effet, *in vivo* lors de xénogreffes chez le raton immunodéprimé, seules les T1C3 sont capables d'envahir le derme et de former des métastases pulmonaires (Doré et al., 1994; Zebda et al., 1994), et *in vitro* sur un modèle de peaux humaines reconstruites, les IC8 prolifèrent dans l'épiderme alors que les T1C3 sont capables de dégrader la JDE et d'envahir le derme (Bechetoille et al., 2000).

Plus récemment, en utilisant ce modèle l'équipe a montré que TSPAN8 n'est pas exprimé, ni au niveau de la protéine, ni au niveau de l'ARNm, ni dans le clone non-invasif IC8 qui n'exprime pas PNA, ni *in situ* dans la peau saine et dans les lésions bénignes. À l'inverse, dans le clone invasif T1C3 qui exprime PNA, mais également *in situ* dans les tumeurs primaires et les métastases ganglionnaires de mélanomes, la protéine TSPAN8 est fortement exprimée. Cette différence d'expression de TSPAN8 avait également été observée dans d'autres lignées de mélanome invasives et non-invasives (Berthier-Vergnes et al., 2011).

Dans cette même publication, il avait également été montré que l'inhibition de l'expression de TSPAN8 par siARN n'a pas d'impact *in vitro* sur la prolifération, la survie et la migration, alors que cela inhibe fortement l'invasion lors d'expériences de sphéroïdes en Matrigel™ (Berthier-Vergnes et al., 2011). Par la suite l'équipe a montré *in vitro* que l'expression ectopique de TSPAN8 dans les IC8 non-invasifs était suffisante pour inhiber l'adhérence des cellules au collagène IV et pour favoriser l'invasion du Matrigel™ en chambre de Boyden. A l'inverse, l'inhibition de l'expression de cette protéine dans les T1C3 invasifs permet de faire chuter les capacités invasives de ces cellules en chambre de Boyden, tout en induisant une augmentation de leur adhérence.

De plus, dans un modèle de peau humaine reconstruite, l'expression ectopique de TSPAN8 permet aux IC8 d'envahir le derme après dégradation de la JDE, alors que l'inhibition de TSPAN8 par shARN en T1C3 inhibe les capacités invasives de ces cellules.

Enfin, les travaux antérieurs ont montré que l'expression de TSPAN8 favorise ce comportement invasif en réduisant les interactions des cellules avec les protéines matricielles, et l'implication de certaines voies de signalisation a pu être démontrée, avec notamment l'implication de l'intégrine β1, ILK et AKT (El Kharbili et al. en préparation).

Ainsi, les travaux antérieurs de l'équipe suggèrent que l'expression de TSPAN8 est suffisante, voir nécessaire, pour induire un phénotype invasif par les cellules de mélanome.

6 : Régulation transcriptionnelle des tétraspanines

Les études portant sur les tétraspanines visent principalement à identifier leurs partenaires et leur fonctionnement, voir l'implication phénotypique de leur expression, mais très peu de travaux se sont intéressés à leur régulation transcriptionnelle.

Des travaux récents portants sur les micro-ARN ont identifié miR-573 et miR-194 comme inhibiteurs de l'expression de TSPAN1 (Lu et al., 2015) et CD81 (Mekky et al., 2015) respectivement, alors que CD151 semble être régulée par miR-124 dans le cancer du sein, par miR-22 et miR152 dans le cancer gastrique et par miR-506 chez le porc (Han et al., 2013; Wang et al., 2014; Wu et al., 2014; Zhai et al., 2014). Pour le gène codant CD9, des sites de régulation ont été identifiés dans sa région flanquante 5' sur laquelle se fixe le facteur de transcription SP1 (Le Naour et al., 1996). Enfin, une étude récente montre que TSPAN12 est régulée négativement par p53 (Otomo et al., 2014). Cependant, les expériences présentées dans ces travaux ne permettent pas de savoir si cette régulation de TSPAN12 est directe.

Régulation de l'expression de CD82

Concernant la régulation transcriptionnelle du suppresseur de métastase CD82, les travaux semblent plus avancés. En effet, deux études ont identifié dans son promoteur, une région enhancer, une zone de régulation négative ainsi qu'un promoteur minimal (Gao et al., 2003; Marreiros et al., 2005). Dans la région enhancer, un élément de régulation directe par p53 a été identifié (Mashimo et al., 1998), et deux études décrivent une régulation de CD82 par p53, JunB et AP2 (Marreiros et al., 2003, 2005). Cependant, l'étude de la régulation de CD82 par p53 nécessite d'être encore approfondie. En effet, bien que CD82 soit un suppresseur de métastases, p53 n'induit pas d'augmentation de son expression lors de dommages à l'ADN dans des lignées cellulaires de différents types de cancers (Duriez et al., 2000). La surexpression de p53 dans des cellules de cancer de la prostate ne semble pas non plus être responsable d'une baisse de l'expression de CD82, même si leurs niveaux d'expressions sont souvent inversement corrélés (Jackson et al., 2003), d'autant que la transfection d'un vecteur codant pour p53 sauvage dans les cellules tumorales mutées pour p53 n'a pas d'effet significatif sur l'expression de CD82 (Jackson et al., 2002).

L'expression de CD82 est également régulée par des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1β, IL-4, IL-6, IFN-γ et le TNF-α (Lebel-Binay et al., 1995). De plus, la fixation de la sous-unité p50 de NFkB sur le promoteur de CD82 peut induire sa transcription, et cela semble être régulé par une balance entre la répression par β-caténine/reptin et l'activation par Tip60 (Kim et al., 2005). La transcription de CD82 induite par NFkB p50 est inhibée par ATF-3 (cyclic AMP-dependent Transcription Factor), mais cette inhibition est levée par NDRG1 (N-Myc Downstream Regulated 1) lors de la réponse au stress hypoxique. CD82 est également transcrite de façon directe par la fixation de HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha) sur son promoteur lors du stress hypoxique (Kim et al., 2010).

Enfin, l'expression de CD82 est régulée négativement de façon épigénétique par SATB1 (Special AT-rich sequence-Binding protein 1) qui recrute des enzymes de remodelage de la chromatine sur différents gènes, et augmente ainsi la croissance et le potentiel métastatique des cellules de cancer du sein (Han et al., 2008).

Régulation de l'expression de TSPAN8

Dans le cas particulier de TSPAN8, seule une étude semble indiquer que l'inhibition de RXFP1 par siARN induit une diminution de l'expression de l'ARNm TSPAN8 dans un modèle de cancer de la prostate (Feng et al., 2010). Une autre étude portant sur différentes métastases de carcinomes hépatocellulaires a montré une variation d'expression d'ARNm TSPAN8 et les auteurs font l'hypothèse d'une régulation positive de l'expression de l'ARNm par le lncRNA (long ARN non codant) de TSPAN8, sans toutefois en apporter la preuve scientifique (Fang et al., 2014b). Enfin, une étude de fin 2015 portant sur le cancer de l'œsophage montre que l'expression de l'ARNm TSPAN8 est diminuée suite au traitement des cellules avec un principe actif extrait de l'herbe médicinale *Andrographis paniculata* (Yue et al., 2015a).

Ainsi, les mécanismes de la régulation transcriptionnelle de TSPAN8 restent méconnus. De plus, dans le cas du mélanome, aucune étude ne s'est intéressée à la régulation transcriptionnelle des tétraspanines. Nous sommes à notre connaissance la seule équipe à avoir démontré l'impact de la régulation de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 sur les phénotypes d'adhérence et d'invasion *in vitro* dans le mélanome tel que nous allons le voir dans les chapitres ci-après (Agaësse et al. 2016, et données non publiées pour le moment).

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Le mélanome cutané, dont l'incidence est en nette augmentation depuis plusieurs décennies, est facilement et efficacement traité par exérèse dans les stades précoces non-invasifs de la maladie. Aussi, les diagnostics tardifs de lésions de mélanomes sont très majoritairement responsables de la forte mortalité de ce cancer. En effet, du fait de son fort potentiel métastatique et de sa résistance aux thérapies actuelles, le mélanome est le plus meurtrier des cancers de la peau. Or, contrairement à d'autres cancers tels que le cancer du sein, du colon, de la thyroïde et de la prostate, à l'heure actuelle il n'existe pas de biomarqueur fiable pour diagnostiquer et suivre la progression du mélanome. Seule une évaluation des critères histopathologiques est possible (épaisseur, ulcération, atteinte des ganglions…).

Les nouvelles thérapies développées ne permettent qu'une amélioration transitoire de la santé des patients. Ainsi, une majorité de patients est atteinte de mélanomes exprimant une protéine BRAF muté, et des inhibiteurs tels que le Vemurafenib permettent une amélioration spectaculaire et rapide de l'état des patients. Cependant, le mélanome développe rapidement des résistances à ces traitements et les patients rechutent. Aussi, la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques reste primordiale pour pouvoir lutter efficacement contre ce cancer.

Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression du mélanome est cruciale pour l'identification de nouveaux marqueurs fiables de pronostic et pour le suivi de la charge tumorale des patients, mais également pour le développement de cibles thérapeutiques efficaces contre les formes disséminées de mélanome.

Une des premières étapes nécessaire à la dissémination métastatique est l'invasion précoce du mélanome. Elle découle d'un enchaînement complexe d'évènements qui amènent progressivement la cellule tumorale à perdre ses propriétés d'adhérence aux constituants de la jonction dermo-épidermique (JDE), et à les dégrader pour ensuite envahir le derme sous-jacent. Il nous semble donc important d'identifier les signatures moléculaires des cellules invasives capables de franchir la JDE.

Lors des travaux précédents de l'équipe, l'étape de franchissement de la JDE a été reproduite *in vitro* par intégration des cellules de mélanome sur un modèle de peaux humaines reconstruites. Deux clones de cellules de mélanome ont ainsi pu être étudiés : des cellules invasives (T1C3) et des cellules non-invasives (IC8), sélectionnées à partir de la lignée de mélanome M4BE (Berthier-Vergnes et al., 2011).

La suite des travaux a démontré que la tétraspanine 8 (TSPAN8) n'est exprimée que dans les T1C3 et est nécessaire à leur potentiel invasif, alors que son expression ectopique dans les IC8 confère un potentiel invasif à ces cellules. De plus, l'équipe a montré dans un modèle de peau humaine reconstruite que l'expression de TSPAN8 dans notre modèle de cellules humaines de mélanome est responsable de la dégradation de la JDE et de l'invasion du derme sous-jacent. Enfin, sur des coupes de tumeurs de patients en immunohistochimie, l'expression de TSPAN8 n'est pas retrouvée ni dans la peau saine ni dans les lésions bénignes, mais uniquement dans les lésions de mélanomes.

Bien que l'expression de TSPAN8 ait été corrélée avec le développement de métastases de plusieurs types de carcinomes, rien n'était encore connu concernant sa régulation transcriptionnelle.

L'objectif de mon travail de thèse s'inscrit dans ce contexte : puisque, la régulation de l'expression de TSPAN8 n'était pas documentée, et que son expression transcriptionnelle et protéique apparait avec le potentiel invasif des cellules de mélanome, **nous avons souhaité identifier les régulateurs de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 qui régulent l'invasion du mélanome cutané**.

Pour comprendre pourquoi et par quels mécanismes l'expression de TSPAN8 est induite lors de la progression du mélanome, nous avons réalisé un criblage haut débit de 150 gènes impliqués dans les processus métastatiques. Ce criblage réalisé en collaboration avec l'équipe de Xavier Gidrol du CEA de Grenoble met en œuvre une technique innovante basée sur l'interférence à l'ARN et sur une construction rapportrice GFP reflétant l'activité transcriptionnelle du promoteur de TSPAN8 dans nos cellules invasives de mélanome T1C3.

Nous avons ainsi pu identifier pour la première fois des régulateurs transcriptionnels de TSPAN8. Après avoir validé certains des gènes identifiés par le criblage en démontrant qu'ils régulent l'expression transcriptionnelle endogène de TSPAN8 dans nos cellules de mélanome, nous avons choisi parmi ces gènes d'étudier l'impact fonctionnel de l'expression de LCMR1 (un membre du complexe Mediator impliqué dans la régulation des processus de transcription de l'ARN polymérase II). Puisque nos cellules de mélanome sont mutées $BRAF^{V600E}$, nous avons évalué l'impact du traitement par le Vemurafenib sur l'expression de TSPAN8. Nous avons également choisi d'étudier l'impact de p53 et β-caténine sur la régulation de l'invasion dépendante de TSPAN8 après avoir identifié des sites de régulations prédictifs par ces deux acteurs dans la séquence du promoteur fonctionnel de TSPAN8 grâce à une approche *in silico.*

Après avoir montré l'impact de ces différents acteurs sur l'expression de TSPAN8, nous nous sommes intéressés à l'impact de ces régulations sur les phénotypes d'adhérence et d'invasion qui dépendent dans notre modèle de l'expression de TSPAN8.

TRAVAUX

Les travaux présentés ci-après font suite à une précédente publication de l'équipe dans laquelle il avait été mis en évidence le rôle pro invasif de TSAPN8 dans le mélanome cutané. Les résultats obtenus au cours de ces travaux réalisés dans le cadre de ma thèse sont divisés en 3 parties :

1. La première partie fait l'objet d'un article publié dans le journal Oncogene. Elle détaille les résultats obtenus avec le criblage des régulateurs transcriptionnels de la TSPAN8 et les résultats de l'étude du rôle fonctionnel de LCMR1, un régulateur positif de l'expression de TSPAN8 identifié par le crible, dans l'invasion du mélanome cutané.

2. La deuxième partie fait l'objet d'un manuscrit soumis pour publication dans le journal Oncogenesis qui montre que le suppresseur de tumeur p53 est un régulateur négatif direct de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8, et de l'invasion dépendante de TSPAN8 par les cellules de mélanome cutané *in vitro*.

3. La dernière partie ne fait pas encore l'objet de publication. Les résultats présentés dans cette partie montrent que β-caténine est un régulateur positif direct de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 et de l'invasion dépendante de TSPAN8 par les cellules de mélanome cutané *in vitro*.

Partie I : Un criblage haut débit par interférence à l'ARN identifie LCMR1 comme un régulateur de l'invasion dépendante de TSPAN8 par le mélanome cutané

Comme l'expression protéique et transcriptionnelle de TSPAN8 est absente de la peau saine et des tumeurs bénignes, et qu'elle apparait avec la progression du mélanome vers des stades invasifs, dans les travaux qui suivent, nous avons souhaité étudier les mécanismes génétiques qui mènent à l'apparition de l'expression de cette protéine, et nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la régulation transcriptionnelle de TSPAN8.

Ainsi, nous avons choisi de réaliser un criblage haut débit des régulateurs de l'activité transcriptionnelle du promoteur de TSPAN8. Comme seules les isoformes 2 et 3 de TSPAN8 sont exprimées dans les cellules de notre modèle, nous avons prédit la séquence promotrice contrôlant l'expression de ces 2 isoformes *in silico* avec le logiciel Genomatix. La séquence prédite consiste en 877 paires de bases en amont du TSS (Transcription Start Site), et nous avons validé cette expression avec des tests rapporteurs en plaçant la séquence codant la luciférase sous le contrôle de la séquence promotrice prédite pour TSPAN8.

Le criblage, réalisé en collaboration avec l'équipe *Biomicrotechnologie et Génomique Fonctionnelle* de Xavier Gidrol du CEA de Grenoble, met à l'œuvre une technologie basée sur l'interférence à l'ARN. 150 gènes impliqués dans les processus métastatiques ont été inhibés, chacun par deux siARN différents. L'impact de ces inhibitions a été évalué à l'aide d'une construction reportrice qui est constituée d'une séquence codant la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle de la séquence promotrice fonctionnelle du gène TSPAN8. Ainsi, les variations de fluorescence des cellules nous ont permis d'identifier les premiers régulateurs transcriptionnels putatifs de TSPAN8 : si l'inhibition d'un gène induit une perte de fluorescence, il s'agit probablement d'un régulateur positif de la transcription de TSPAN8, et inversement.

Pour les plus significatifs de ces régulateurs putatifs, nous avons tenté de valider les résultats du crible en étudiant l'impact de leur inhibition sur l'expression endogène de TSPAN8. Nous avons ainsi pu montrer qu'IQGAP1 (Ras GTPase-Activating-Like Protein) et PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) sont des inhibiteurs de l'expression transcriptionnelle endogène de TSPAN8, alors que BCAR1 (Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 1), ACTN1 (Actinin α1) et LCMR1 (Lung Cancer Metastasis-Related protein 1) sont les trois plus forts inducteurs de cette expression.

Pour la suite de l'étude, nous avons choisi d'approfondir l'étude de LCMR1 présenté par le criblage comme un régulateur positif de TSPAN8. LCMR1, aussi appelé MED19 est un membre du complexe Mediator, qui fait le lien entre les facteurs de transcription et la ARN polymérase II. Ce complexe multiprotéique agit donc comme un coactivateur impliqué dans la régulation de la transcription par l'ARN polymérase II (Björklund et Gustafsson, 2005). L'expression de LCMR1 a récemment été identifiée comme facteur de mauvais pronostic dans le cancer du poumon (Chen et al., 2011; Sun et al., 2011; Xu et al., 2012), et sa surexpression est associée à plus de 10 types de cancers différents dont les carcinomes colorectal (Ji-Fu et al., 2012), gastrique (Ding et al., 2012), du foie (Zou et al., 2011), de l'ovaire (Liu et al., 2012b), du sein (Li et al., 2011a), du pancréas (Li et al., 2011b) et l'ostéosarcome (Wang et al., 2011; Yu et al., 2014).

Cette publication rapporte pour la première fois la surexpression et l'implication de LCMR1 dans la progression du mélanome cutané, ainsi que l'identification d'une cible fonctionnelle de LCMR1 : TSPAN8.

En effet, nous avons pu montrer que (1) *in vitro* LCMR1 est un régulateur positif de l'expression de TSPAN8, (2) LCMR1 régule l'adhérence et l'invasion dépendante de TSPAN8 *in vitro,* (3) *in vivo* TSPAN8 favorise la croissance tumorale, (4) *in situ* l'expression de ces deux protéines corrèle chez les patients, et (5) leur expression est inhibée lors du traitement par le Vemurafenib, un inhibiteur de l'activité de $BRAF^{V600E}$.

(1) Les expériences d'inhibition par siARN et de surexpression ectopique à l'aide d'un vecteur ont permis de montrer que l'expression de LCMR1 favorise celle de TSPAN8 au niveau transcriptionnelle et protéique.

(2) Les expériences en Xcelligence ont permis de montrer que l'inhibition de LCMR1 fait augmenter l'adhérence des cellules tout comme l'inhibition de TSPAN8, mais qu'elle n'a pas d'impact sur la prolifération de nos cellules de mélanome, contrairement au rôle démontré de LCMR1 dans les autres cancers.
Les expériences d'invasion sur Matrigel™ réalisées sur des cellules de mélanome ensemencées en chambre de Boyden, ont montré *in vitro* que l'expression de LCMR1 favorise l'invasion des cellules de la lignée non-invasive M1DO et de la lignée invasive T1C3. De plus, en T1C3, les expériences d'épistasie entre LCMR1 et TSPAN8 ont montré que l'expression de LCMR1 favorise l'invasion à travers l'induction de l'expression de TSPAN8.

(3) Les xénogreffes réalisées sur la souris ont montré que l'expression de TSPAN8 favorise la tumorigénicité des cellules de mélanome dans la lignée invasive T1C3 mais également dans la lignée non-invasive IC8.

(4) Nous sommes les premiers à montrer *in situ* une colocalisation et une forte expression protéique de LCMR1 et de TSPAN8 dans les mélanomes primaires par comparaison avec la faible expression des nævi bénins sur des coupes de tissus tumoraux de patients inclus en paraffine. Nous avons également observé une corrélation des niveaux d'expression des transcrits de LCMR1 et de TSPAN8 dans les métastases de patients de mélanome cutanés.

(5) Enfin, nous avons montré *in vitro,* qu'un traitement au PLX4032 (Vemurafenib, un inhibiteur de BRAF muté) inhibe l'expression de TSPAN8 et LCMR1. De plus, l'inhibition par siARN de chacun de ces gènes conduit à la diminution du nombre de cellules vivantes en culture uniquement lorsque les cellules sont traitées avec du PLX4032, ce qui suggère que l'expression de ces protéines confère aux cellules une résistance au traitement anti-BRAF.

Conclusion

Nos résultats ont permis d'identifier pour la première fois des régulateurs transcriptionnels de TSPAN8 : PTEN, IQGAP1, LCMR1, TPT1, BCAR1 et ACTN1. À ce jour, TSPAN8 est la première cible fonctionnelle de LCMR1 à avoir été identifiée. LCMR1 est un membre du complexe Mediator, dont nous rapportons pour la première fois l'expression et l'implication dans la progression du mélanome. En effet, nos résultats montrent que LCMR1 est un acteur dont l'expression dans le mélanome favorise l'invasion dépendante de TSPAN8 *in vitro*. La pertinence de ces observations est appuyée par le fait qu'*in vivo*, l'expression de TSPAN8 dans les cellules de mélanome favorise la tumorigénicité lors de xénogreffes chez la souris. Nous montrons également qu'in *situ* chez les patients, l'expression protéique de LCMR1 et de TSPAN8 est absente de la peau saine et des lésions bénignes, mais que les expressions de ces protéines sont corrélées et colocalisées dans les coupes de lésions de mélanomes. De plus, dans les métastases de ganglions lymphatiques, on observe une corrélation des niveaux d'expression des transcrits codant ces protéines. Enfin, nous montrons que l'inhibition de BRAF conduit à une perte d'expression de LCMR1 et de TSPAN8, mais également que l'expression de ces deux gènes semble conférer aux cellules une résistance aux traitements d'inhibition de BRAF.

Nos résultats montrent que TSPAN8 peut être envisagée comme une nouvelle cible thérapeutique prometteuse potentielle dans le traitement du mélanome, puisque l'inhibition de son expression réduit la tumorigénicité lors de xénogreffe chez la souris. Ceci est appuyé par les récents travaux qui montrent que l'utilisation d'un anticorps anti-TSPAN8 réduit la motilité cellulaire, et inhibe la croissance de xénogreffes de carcinome de côlon et réduit de manière significative l'incidence métastases de cancer de l'ovaire *in vivo* (Kim et al., 2015 ; Park et al., 2016).

Pour des raisons de droits d'auteurs et de copyrights, cet article n'est disponible que dans la version complète de ce manuscrit qui est disponible auprès de a B.U. de l'université Lyon1 via leur intranet.

Cet article est également disponible sur le site de notre éditeur :
http://www.nature.com/onc/journal/v36/n4/full/onc2016219a.html

Lien pubmed : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27375018

Référence :

A large-scale RNAi screen identifies LCMR1 as a critical regulator of Tspan8-mediated melanoma invasion
G Agaësse, L Barbollat-Boutrand, E Sulpice, R Bhajun, M E l Kharbili, O Berthier-Vergnes, F Degoul, A de la Fouchardière, E Berger, T Voeltzel, J Lamartine, X Gidrol and I Masse
Oncogene 36, 446-457 (26 January 2017)
DOI : 10.1038/onc.2016.219

Partie II : p53 inhibe l'invasion induite par TSPAN8 dans les cellules de mélanome

Le criblage présenté précédemment nous a permis d'identifier le suppresseur de tumeur p53 comme un régulateur négatif putatif de TSPAN8. Cependant, comme l'impact de l'inhibition de p53 sur la fluorescence des cellules n'était pas parmi les plus forts, p53 n'a pas été présenté dans la précédente publication. Les travaux qui suivent présentent l'étude de l'impact de p53 sur l'expression de TSPAN8 et sur le phénotype invasif de nos cellules de mélanome.

P53 est connu en tant que « gardien du génome » car il prévient l'apparition du cancer, en permettant la réparation de l'ADN en réponse à un épisode de stress cellulaire, et en induisant l'apoptose des cellules trop sévèrement touchées par ce stress. En raison de ses fonctions, p53 est activement étudié dans le cadre de la recherche de traitements contre les cancers. En revanche, son étude dans le mélanome a longtemps été délaissée car ses mutations sont rares dans ce type de cancer. Cependant, p53 fait l'objet d'un regain d'intérêt depuis quelques années quant à son implication dans le mélanome. En effet, des travaux récents rapportent que p53 est souvent inactivé d'un point de vue transcriptionnel dans ce cancer, ce qui se traduit par une pression de sélection moins forte sur la mutation de p53 pour le développement des mélanomes. De plus, l'altération de p53 est requise pour l'établissement de plusieurs modèles animaux de mélanome, ce qui suggère que ce suppresseur de tumeur joue un rôle important contre le développement du mélanome.

Comme p53 est un suppresseur de tumeur majeur et TSPAN8 est une tétraspanine pro-métastatique, nous avons fait l'hypothèse que p53 pourrait avoir un rôle à jouer dans le mélanome sur l'invasion dépendante de TSPAN8. Ainsi, dans l'étude qui suit, nous nous sommes intéressés à la régulation transcriptionnelle de TSPAN8 par p53, et à l'impact de cette régulation sur les phénotypes d'invasion cellulaire qui sont impliqués dans la progression tumorale, notamment lors de l'étape cruciale de l'invasion précoce du mélanome cutané.

Résumé des résultats

Nous avons tout d'abord prédit grâce à une analyse *in silico* la présence de deux demi-sites de régulation transcriptionnelle négative par p53 dans la séquence du promoteur fonctionnel de TSPAN8. Nous avons donc souhaité étudier la régulation de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 par p53.

Dans plusieurs lignées, des expériences d'inhibition de p53 par siARN ont conforté cette hypothèse d'une régulation négative de TSPAN8 par p53. En effet, l'inhibition de p53 par siARN favorise l'expression transcriptionnelle de TSPAN8, et cela se traduit par une augmentation d'expression protéique de TSPAN8, telles que le montrent nos expériences de qPCR (Réaction de Polymérisation en Chaine quantitative) et de western-blots.

Les résultats obtenus par des expériences de ChIP (Immuno-Précipitation de Chromatine) montrent que p53 est recruté sur les sites présents dans le promoteur de TSPAN8. De plus, cette fixation est responsable de l'inhibition transcriptionnelle de TSPAN8 par p53, puisque la mutation de ces sites de régulation dans la séquence du promoteur induit une augmentation de la luminescence produite par un rapporteur luciférase, ce qui reflète la perte de l'activité de régulation transcriptionnelle négative par p53 sur ce promoteur.

Enfin, les expériences d'invasion et d'épistasie ont montré que cette inhibition de TSPAN8 par p53 est suffisamment robuste pour que cela se traduise phénotypiquement par une inhibition de l'invasion des cellules de mélanome. En effet, l'inhibition de p53 par siARN permet aux cellules d'être plus invasives sur Matrigel™ en chambre de Boyden, mais cette augmentation de l'invasion est annulée par l'inhibition concomitante de TSPAN8 par shARN.

Conclusion

Dans l'ensemble, les expériences présentées dans ces travaux soumis à publication montrent que p53 est un régulateur négatif direct de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8. Ces travaux montrent également qu'à travers cette régulation négative de TSPAN8, p53 est capable de réguler négativement l'invasion des cellules de mélanome cutané. Aussi, la perte d'activité de p53 observée fréquemment dans le mélanome pourrait avoir un rôle à jouer lors de l'invasion précoce du mélanome cutané, notamment à travers cette dérégulation de TSPAN8. La réactivation de p53 pourrait donc être une piste intéressante de développement de thérapies contre le mélanome, pas uniquement au regard de son rôle de suppresseur de tumeur, mais également à travers l'inhibition que p53 opère sur l'invasion dépendante de TSPAN8.

Cet article a été accepté pour publication dans Oncogenesis au cours de l'année 2017. Des expériences supplémentaires ont été réalisées pour répondre aux demandes des reviewers.

P53 TARGETS TSPAN8 TO PREVENT INVASION IN MELANOMA CELLS

Gweltaz Agaësse[1], Laetitia Barbollat-Boutrand[1], Manale El Kharbili[1,2], Odile Berthier-Vergnes[1] and Ingrid Masse[1]

[1] Université de Lyon, F-69003 Lyon, France; Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France; CNRS, UMR5534, Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires, Villeurbanne, F-69622, France

[2] Current address: Department of Dermatology, University of Colorado Anschutz Medical Campus, 12800 E. 19th Avenue, P18-8132, Aurora, CO 80045.

Address correspondence to: Dr Ingrid Masse. Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires. CNRS UMR5534 – Université Lyon I, 43 Bd du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France. Tel: +33 4 72 43 29 50. Fax: +33 4 72 43 26 85. E-mail: ingrid.masse@univ-lyon1.fr

Running title: p53 inhibits TSPAN8-mediated invasion

Key words: TSPAN8, p53, invasion, melanoma

Abstract

Cutaneous melanoma is a very deadly cancer because of its proclivity to metastasize. Despite the recent development of targeted and immune therapies, patient survival remains low. It is therefore crucial to enhance understanding of the molecular mechanisms underlying invasion. We previously identified tetraspanin 8 (TSPAN8) as an important actor of melanoma invasiveness, and several of its transcriptional regulators which affect TSPAN8 expression during melanoma progression towards an invasive stage. The present study found that TSPAN8 promoter contains consensus-binding sites for p53 transcription factor. We demonstrated that p53 silencing was sufficient to turn on TSPAN8 expression in non-invasive melanoma cells and that p53 acts as a direct transcriptional repressor of TSPAN8. We also showed that p53 modulated Matrigel™ invasion in melanoma cells in a TSPAN8-dependent manner. In conclusion, this study reveals p53 as a negative regulator of TSPAN8 expression. As TP53 gene is rarely mutated in melanoma, it was hitherto poorly studied but its role in apoptosis and growth suppression in melanoma is increasingly becoming clear. The study highlights the importance of p53 as an actor of melanoma invasion and the concept that reactivating p53 could provide a strategy for modulating not only proliferative but also invasive capacity in melanoma treatment.

Introduction

Cutaneous melanoma is one of the leading causes of death due to cancer worldwide because of its proclivity to metastasize. Immunotherapies and highly selective targeted therapies have led to promising clinical advances, but most patients relapse due to acquired treatment resistance. Consequently, combination strategies have recently been developed, with substantial improvement in clinical outcome. Nevertheless, there is an urgent need to discover new actors of melanoma progression as potential therapeutic targets. Therefore, understanding the molecular and cellular mechanisms underlying the initial steps of melanoma progression is crucial to identifying new therapeutic strategies that could be combined with current therapies to improve survival.

We previously identified tetraspanin 8 protein (TSPAN8) as an important factor in early melanoma invasion[1]. TSPAN8 is one of the 33 mammalian members of the tetraspanin family, composed of transmembrane proteins that organize laterally, together or with other membrane partners such as integrins, to form "tetraspanin webs". These platforms signal within cells to regulate many cellular processes: adhesion, migration, invasion or survival (for a review, see [2]). TSPAN8 has been implicated in many types of cancer. Overexpression was reported in glioma and colorectal, esophageal, hepatic, gastric and pancreatic carcinoma. Furthermore, TSPAN8 expression correlates strongly with metastatic potential in liver, colon and pancreatic carcinoma [3-9]. In colon and liver cancer, TSPAN8 exerts a pro-invasive function by controlling cell-cell and cell-matrix interactions through its association with membrane partners such as α6β4 integrin-PKC-activated, E-cadherin, EpCAM, claudin-7 and CD44 (for a review, see [10]). Moreover, TSPAN8 may be a promising new therapeutic target, since TSPAN8-specific antibodies were shown to reduce cell motility, block tumor angiogenesis *in vivo* and inhibit the growth of colorectal tumors in a xenogeneic nude mouse model [7, 11, 12] and significantly reduce incidence of epithelial ovarian cancer metastasis *in vivo* [13].

In cutaneous melanoma, we previously showed that TSPAN8 expression is undetectable in normal skin and becomes expressed at very high levels in primary melanomas and lymph node metastases. We also demonstrated that TSPAN8 overexpression is sufficient to increase cell invasion capacity [1]. Previous studies of TSPAN8 focused on its expression level, functions and biochemical interactions with protein partners during cancer development, but nothing is known about its transcriptional regulation. To understand how TSPAN8 expression is turned on, inducing invasive properties in melanoma cells, we recently performed an RNA interference-based screen. Several TSPAN8 transcriptional regulators were identified, including lung-cancer metastasis-related protein 1 (LCMR1), which increases TSPAN8 expression and causes loss of melanoma cell-matrix adherence, leading to cell invasion (Agaësse et al, 2016).

The present study identified TSPAN8 as a p53 transcriptional target for melanoma cell invasion, suggesting that p53, although rarely mutated but sometimes inactivated in melanoma, may play an important role not only in apoptosis and cell cycle arrest but also in melanoma cell invasion. The promoting sequence of TSPAN8 contains consensus-binding sites for p53 transcription factor. We demonstrated that p53 silencing is sufficient to induce TSPAN8 expression in melanoma cells. We also showed, by chromatin immunoprecipitation and luciferase assays, that p53 is a direct transcriptional repressor of TSPAN8. We finally demonstrated that p53 inhibition led to an increase of Matrigel™ invasion in a TSPAN8-dependent manner. Overall, our data emphasize the present results highlight the crucial role that the p53 transcription factor plays in melanoma aggressiveness via its involvement in regulating TSPAN8 expression.

Results and Discussion

The internal promoter of TSPAN8 contains consensus-binding sites for p53 transcription factor

Ensembl.org describes three coding isoforms in humans, which all encode the same TSPAN8 protein of 237 amino-acids. We previously showed that invasive melanoma cells predominantly express isoform 2, which is transcribed from an internal promoter (Agaësse et al, 2016). *In silico* analysis of this promoter (pTSPAN8) by the MatInspector gene regulation software (Genomatix.de) revealed that pTSPAN8 contains consensus-binding sites for many transcription factors, and in particular two half-sites for the p53 tumor suppressor gene that are located in the second exon of TSPAN8 full-length cDNA (Figure 1a). Since p53 is a tumor repressor [7] and TSPAN8 a pro-metastatic tetraspanin, we postulated that p53 could be a repressor of TSPAN8 expression in melanoma cells. We first assessed whether a decrease in baseline p53 expression between non-invasive (IC8 clone) and invasive (T1C3 clone) melanoma cells could explain the occurrence of TSPAN8 expression in the latter (Figure 1b, left panel and Figure 1c). Similar amounts of p53 were observed at both at mRNA (Figure 1b, right panel) and protein (Figure 1c) levels. This is consistent with the function of transcription factors, for which activation status is often much more important than expression level. We therefore investigated whether p53 exerts a negative regulatory role on TSPAN8 expression by performing silencing experiments in various melanoma cell lines.

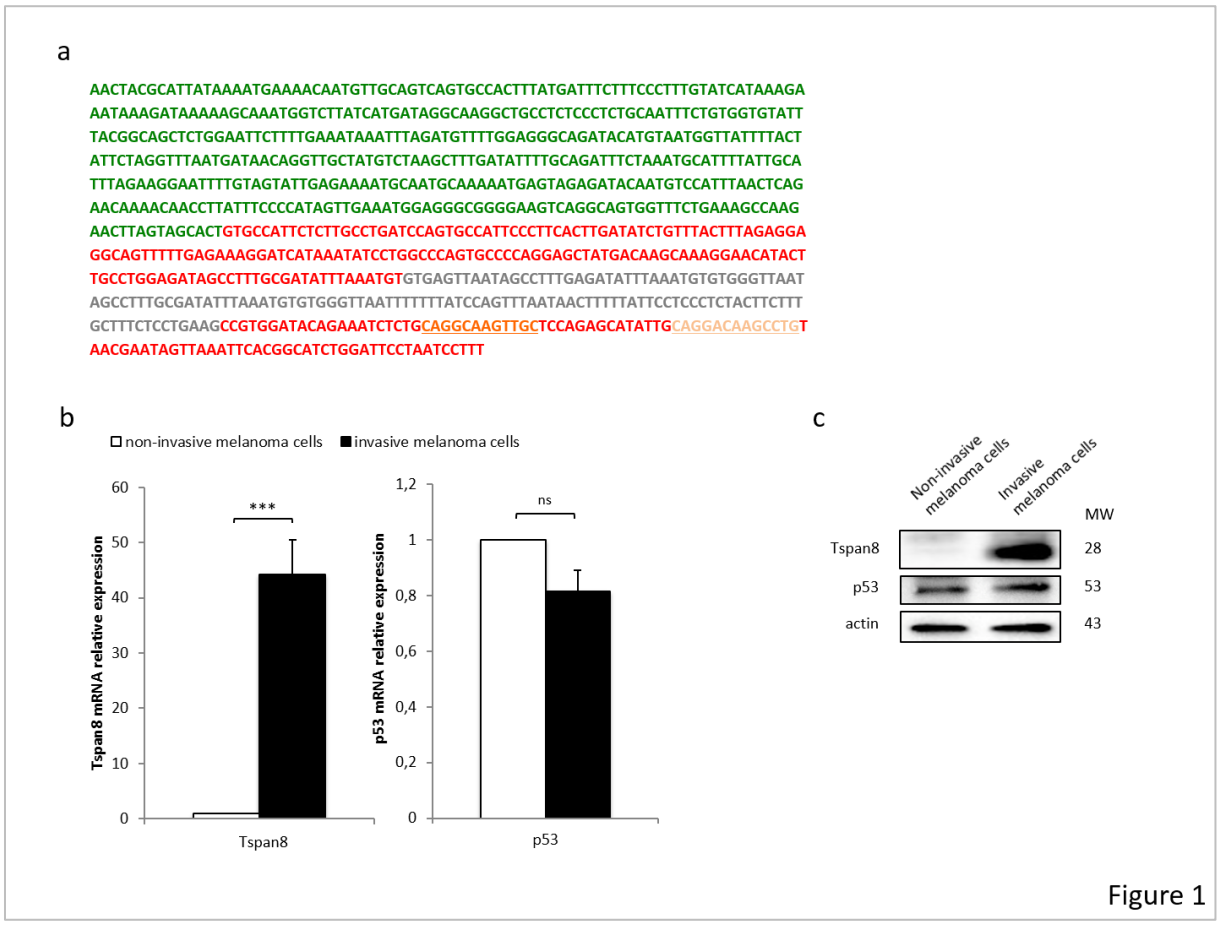


Figure 1

Figure 1 : TSPAN8 functional promoter and p53 expression in melanoma cells. (a) Promoting sequence of the TSPAN8-002 isoform shows p53 consensus binding-sites as predicted by Genomatix. Promoter upstream of the Transcriptional Starting Site (TSS) is colored in green, exons 1 and 2 in red and intron 1 in gray. The two putative half-sites for p53 binding are underlined, "site 1" is colored in dark orange and "site 2" in light orange. (b) Expression levels of TSPAN8 (left panel) and p53 (right panel) transcripts were assessed by RT-QPCR in non-invasive IC8 and invasive T1C3 melanoma cells, previously described in Berthier-Vergnes et al. 1 (n=3; ± SEM). We checked that the TP53 gene was wild-type in these melanoma cell lines. The RT-QPCR protocol

and primers used were described in (Agaësse et al, 2016), except for p53 primers: p53-forward 5'-TGACTGTACCACCATCCACTA-3' and p53-reverse 5'-AAACACGCACCTCAAAGC-3'. Statistical significance was calculated by a two-tailed Student t-test for unpaired samples. Mean differences were considered significant when ***: $p < 0.001$. ns: non-significant. (c) Expression levels of TSPAN8 and p53 proteins were assessed by western blot in non-invasive IC8 and invasive T1C3 melanoma cells (n=3; a representative experiment is shown). Western blots were performed as previously described in (Agaësse et al, 2016). β-actin (Clone C4 Millipore 1/5,000) was used as a loading control. TSPAN8 was detected using a mouse monoclonal anti-TSPAN8 antibody (TS29.2 clone 1/2,000; 37) and p53 using a mouse monoclonal anti-p53 antibody (D01, Santa Cruz).

p53 is a direct transcriptional repressor of TSPAN8 expression

We assessed the effect of p53 inhibition on TSPAN8 expression. Using siRNA, we showed that efficient p53 silencing in human non-invasive IC8 melanoma cells is sufficient to turn on TSPAN8 expression at mRNA (Figure2a) and protein (Figure 2c, upper panel) levels. This significant increase in TSPAN8 expression was also observed in another non-invasive melanoma cell line, WM115 (Figure 2e, left panel). In invasive T1C3 cells, TSPAN8 was expressed at high baseline level and p53 silencing further increased expression, at both mRNA (Figure 2b) and protein (Figure 2c, lower panel) levels. The overexpressed TSPAN8 protein was even addressed to the membrane, since it was detected at cell surface by flow cytometry analysis (Figure 2d). TSPAN8 expression was also increased in another cell line, SKMel28, known for invasiveness (Figure 2e, right panel). Overall, these findings showed that p53 silencing is sufficient to induce TSPAN8 expression. Unlike many types of human cancer, in which TP53 gene is often mutated [14], TP53 is intact in more than 95% of human melanomas (for a review, see [15]). However, it was recently shown that wild-type p53 was transcriptionally inactive in several melanoma cell lines [16] and that p53 played a role in melanomagenesis in several animal models [17, 18 19-22]. It can thus be postulated that, in non-invasive melanoma cells, p53 could act to repress TSPAN8 expression, and that a decrease in p53 repression activity triggers TSPAN8 expression. This is consistent with the repressive role of p53 on several other target genes (for a review, see [23]).

We then investigated whether p53 exerts its effect on TSPAN8 expression directly, through the putative half-p53-consensus binding sites we identified in pTSPAN8. We first performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments using a p53 antibody versus a control immunoglobulin (Ig), and used QPCR to analyze p53 enrichment on pTSPAN8 (Figure 3a). We showed that, compared to a negative control located -1kb upstream of pTSPAN8, p53 was enriched 20-fold on the positive control p21 promoter and significantly enriched 4-fold on p53 consensus sites of TSPAN8 promoter. This indicates that endogenous p53 is specifically recruited onto p53 sites of pTSPAN8 in melanoma cells. We then tested whether TSPAN8 transcription activation was dependent on p53 consensus binding sites in pTSPAN8, by performing luciferase assays on pTSPAN8 containing native or mutant p53 binding sites. As previously described (Agaësse et al. 2016), the promoting sequence of TSPAN8 significantly increased luciferase activity 3.8-fold compared to empty vector. We showed that inhibiting p53 by siRNA had no impact on the control empty vector but was sufficient to further significantly increase luciferase activity 7-fold under the control of pTSPAN8 (Figure 3b). Moreover, when one or both half-p53-consensus binding sites of pTSPAN8 were mutated, p53 silencing did not enhance luciferase intensity as strongly as did native pTSPAN8 (Figure 3c), demonstrating that p53 is a direct transcriptional repressor of TSPAN8, through p53 binding-sites in pTSPAN8.

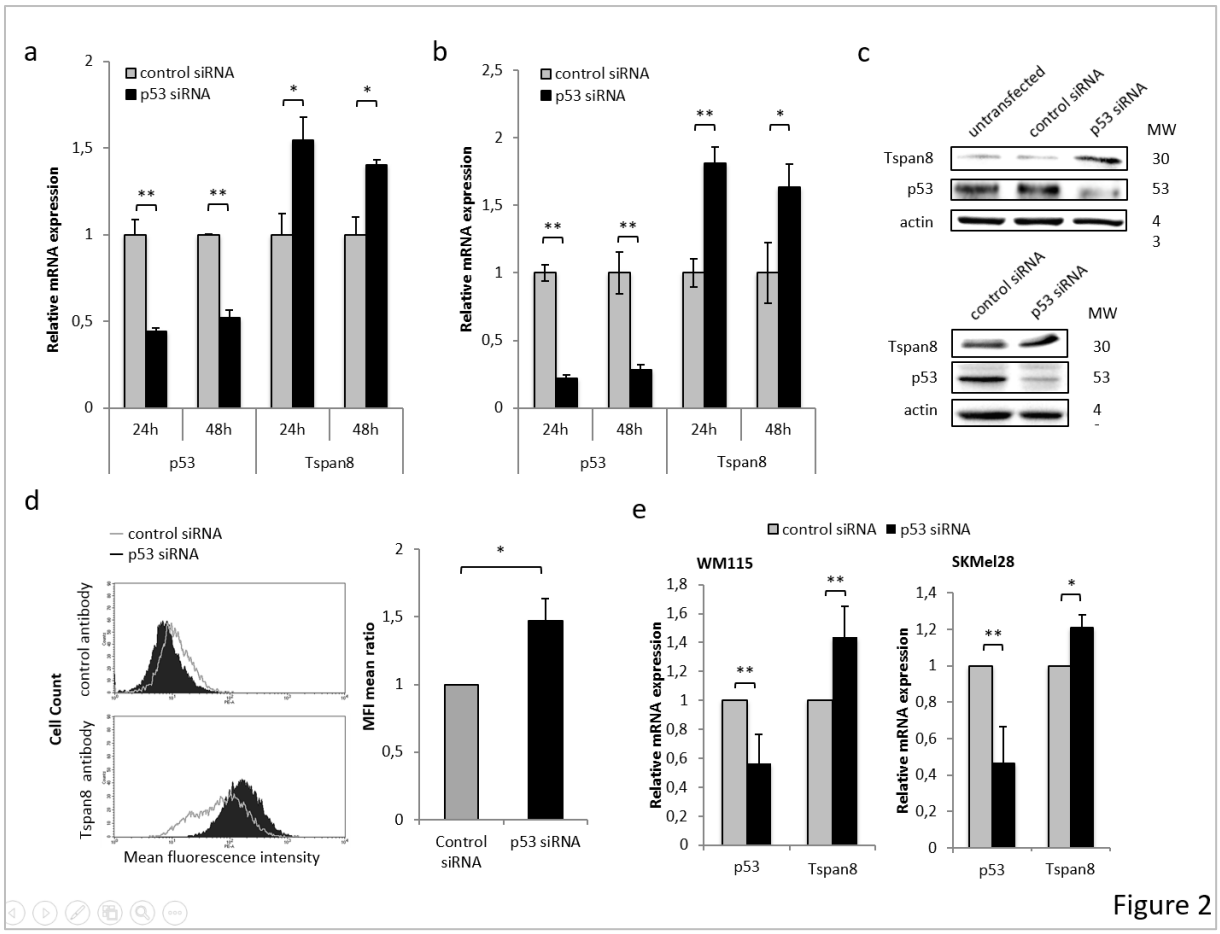


Figure 2

Figure 2 : p53 silencing in non-invasive and invasive melanoma cells increases TSPAN8 expression. (a-b) QPCR analysis showed p53 and TSPAN8 transcript expression levels 48 and 72 hours after control or p53 siRNA transfection in (a) non-invasive IC8 cells and (b) invasive T1C3 cells (n=3; ± SD). For siRNA transfection, 105 cells per well were seeded in 6-well plates and, after 24h, transfected with 20nM of control siRNA or p53 siRNA with INTERFERin (Polyplus). Targeting sequences were 5'-UAAGGCUAUGAAGAGAUAC-3' for control siRNA and 5'-UAUGGCGGGAGGUAGACUG-3' for p53 siRNA. (c) Expression levels of TSPAN8 and p53 proteins were assessed by western blot in non-invasive IC8 (upper panel) and invasive T1C3 (lower panel) melanoma cells (n=3; a representative experiment is shown). (d) Mean TSPAN8 cell-surface protein expression was assessed by FACS (fluorescence-activated cell sorting cytometry) in invasive T1C3 melanoma cells 72h hours post-transfection with control or p53 siRNA, as previously described in Berthier-Vergnes et al. 1. The left panel is representative of 3 independent experiments and the right panel represents the mean ± SD of 3 independent experiments. (e) QPCR analysis showed p53 and TSPAN8 transcript expression levels 48 to 72 hours after control or p53 siRNA transfection in non-invasive WM115 (left panel) and invasive SKMel28 (right panel) cells, in which TP53 gene is not mutated (n=3; ± SD). Statistical significance was assessed by two-tailed Student t-test for unpaired samples. Mean differences were considered significant when *: $p<0.05$. **: $p < 0.01$.

To sum up, the data showed that TSPAN8 expression could be turned on in melanoma cells when its direct transcriptional regulator, p53, is silenced. Several mechanisms have been proposed recently for p53 inactivation in melanoma. MDM4 overexpression may promote metastatic progression by antagonizing p53's pro-apoptotic function [24]. MDM2, cyclin B1 and nuclear iASPP are also enriched in melanoma metastasis and may lead to p53 inhibition [25]. p53 may also be deactivated through CDKN2A deletion or mutation, as occurs in around 40% of melanoma cases [26]. Down-regulation of miR-18 or miR-3151, combined with BRAF inhibition, may result in regulation either of the MDM2-p53 axis [25] or of the nuclear p53 location [27], respectively. Hence, considering the role we previously described for TSPAN8 [1] (and Agaësse et al, 2016), we can hypothesize that an inactivation of p53, by any of these mechanisms, may induce TSPAN8 expression and acquisition of an invasive phenotype in melanoma.

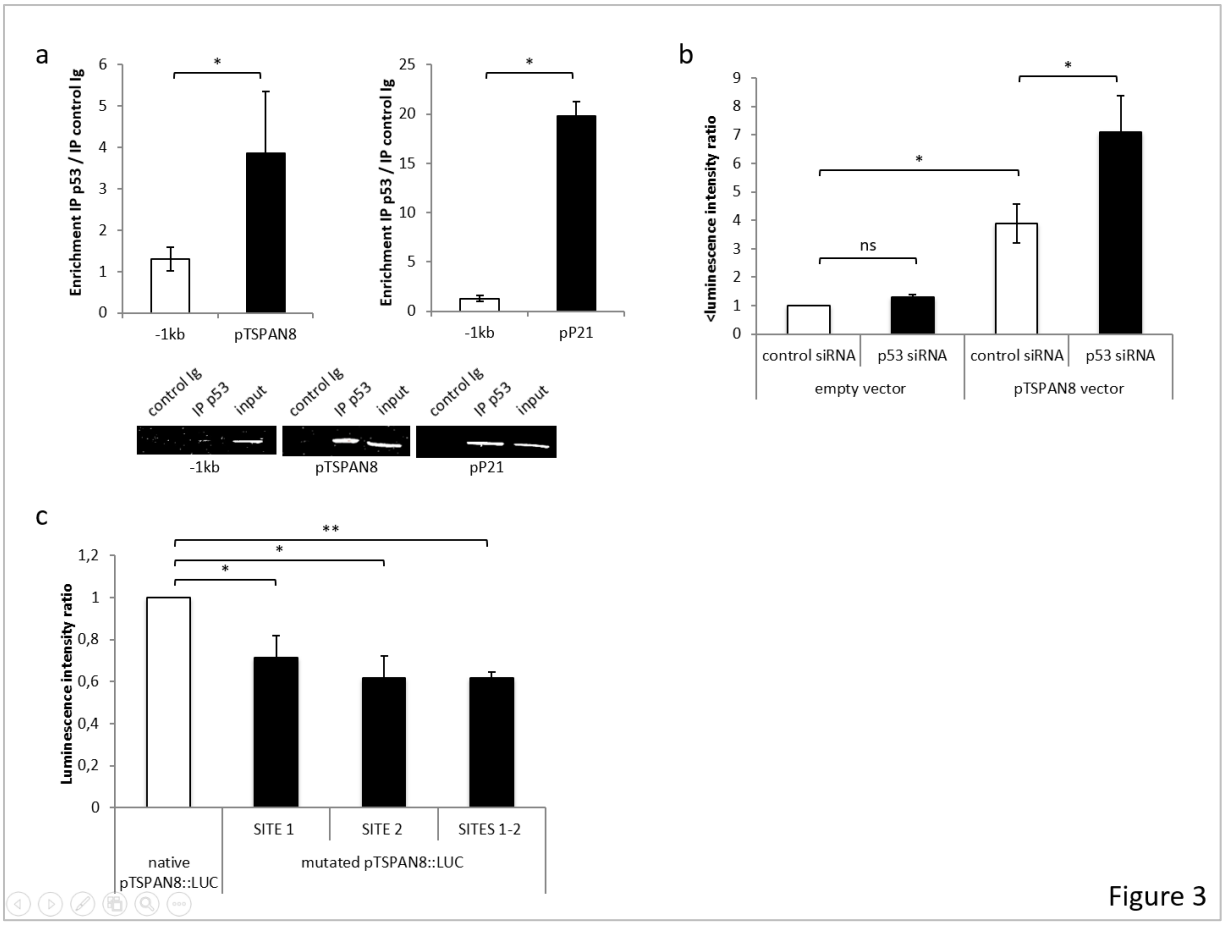


Figure 3

Figure 3 : p53 is recruited onto p53-consensus binding sites in TSPAN8 promoter and represses TSPAN8 expression. (a) p53-ChIP (Chromatin Immuno-Precipitation) assays were performed in invasive T1C3 melanoma cells (n=4). Enrichment of TSPAN8 promoter region (left panel) was analyzed in comparison with a negative control promoter region located -1kb upstream of the beginning of TSPAN8 promoter. p21 promoter region (right panel) was used as positive control. ChIP experiments were performed, as previously described by Masse et al. 38. A representative experiment after agarose gel electrophoresis is shown in the lower panel. (b-c) Luciferase assays were performed with 20nM of control or p53 siRNA combined with 250ng of (b) native pTSPAN8::LUC (constructed as described by Agaësse et al., Oncogene, in press) and/or (c) pTSPAN8 in which p53 consensus binding sites were mutated. Directed mutagenesis was performed using the In Fusion HD Cloning Plus kit (Ozyme), according to the manufacturer's instructions. PCR was performed at 55°C. Primers used for mutagenesis were: forward 5'-TTCCGGGCCAAGTCCAGAGCATATTGCAGGA-3' and reverse 5'-CTTGGCCCGGAACAGAGATTTCTGTATCCACG-3' for "site 1"; forward 5'-CTTCGGGCAAGCTAACGAATAGTTAAATTCACGGC-3' and reverse 5'-GCTTGCCCGAAGGCAATATGCTCTGGAGCA-3' for "site 2". For luciferase experiments, 105 cells per well were seeded in 24-well plates and, after 24h, transfected with 250ng of control plasmid or plasmid of interest for 24h, combined with 20nM of control siRNA or p53 siRNA. Luciferase assays were performed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. The luminescence intensity ratio was calculated relative to that of the pGL4.10-empty-vector. Data were normalized to the transfection efficacy assessed by pCMV-RL vector co-transfection. At least three independent biological replicates were performed. Statistical significance was assessed by two-tailed Student t-test for unpaired samples. Mean differences were considered significant when *: $p<0.05$. **: $p < 0.01$. ns: non-significant.

p53 regulates in vitro melanoma cell invasion in a TSPAN8-dependent manner

We have previously shown that TSPAN8 promoted melanoma invasion through Matrigel™ without interfering with proliferation or migration behavior [1]. We therefore hypothesized that TSPAN8 expression regulated by p53 would not affect the cell cycle as previously described in mouse melanoma [21], but would rather regulate cell invasion. Recent studies demonstrated that wild-type p53 modulates the invasiveness of breast cancer cells [28] [29], osteosarcoma cells [30] and hepatocellular carcinoma cells [31]. In melanoma, very little is known about the involvement of p53 in invasion. One study reported that expression of a dominant-negative form of p53 strongly increased the invasiveness of A375P

melanoma cells, whereas wild-type p53 inhibited it [32]. Very recently, Roth et al. showed that the mouse-specific isoform Δ122p53, similar to the human Δ133p53 isoform, which is overexpressed in melanoma [33], promoted invasion in an IL-6- and CCL2-dependent manner [34]. We therefore tested whether p53 could specifically regulate invasion in a TSPAN8-dependent manner. p53 silencing was shown to increase the invasiveness of T1C3 melanoma cells in Boyden chambers (Figure 4a). To determine whether p53 affected melanoma invasion through TSPAN8 regulation, epistasis experiments were performed, using T1C3 cells in which TSPAN8 expression was efficiently silenced after selection of cells stably expressing TSPAN8 shRNA (T1C3/shTSPAN8; Agaësse et al, Oncogene, in press). The results showed that T1C3/shTSPAN8 cells were less invasive than T1C3/shcontrol cells, confirming that TSPAN8 expression promotes invasiveness in Matrigel™. Moreover, inhibiting p53 in T1C3/shcontrol cells increased the number of invading cells, and this increase was partially abolished by inhibiting p53 expression in T1C3/shTSPAN8 (Figure 4b).

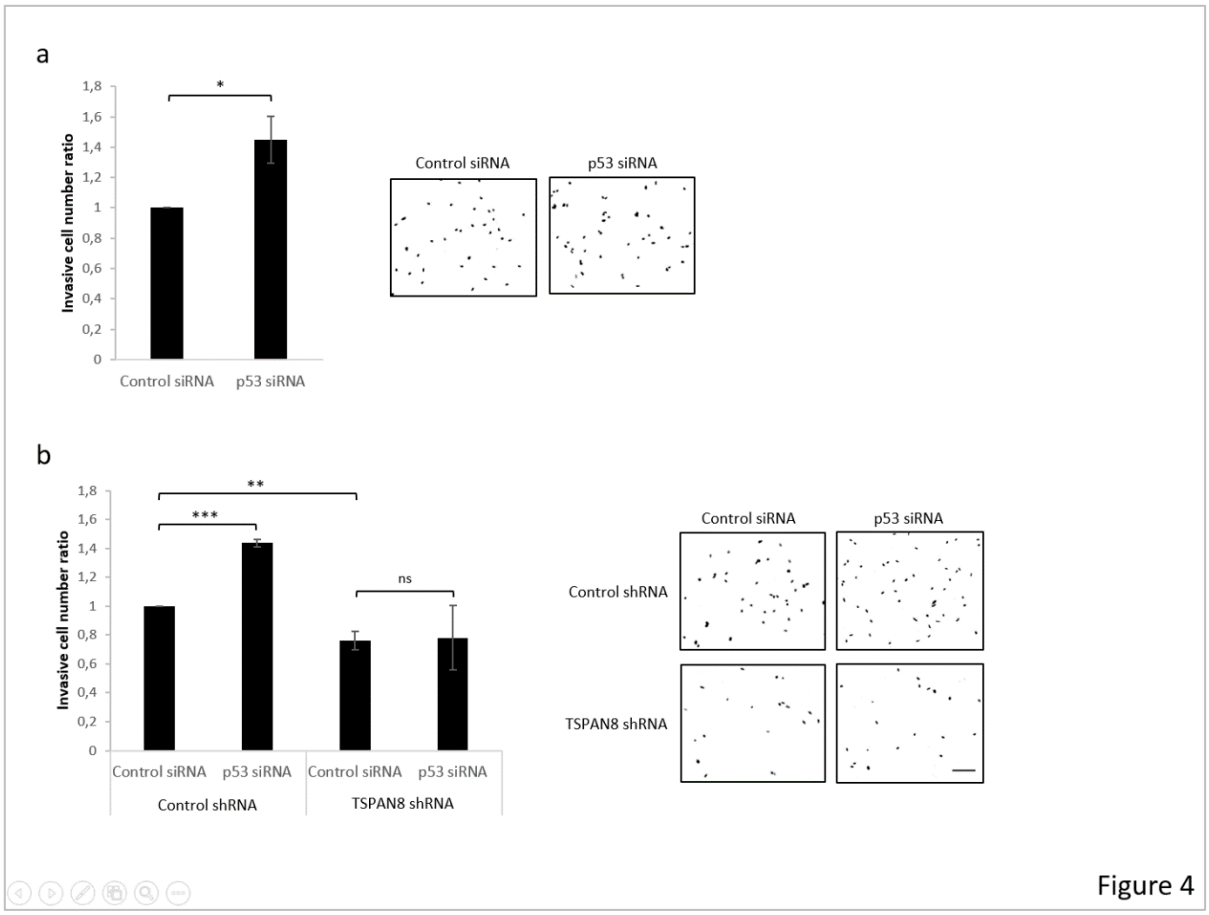


Figure 4: p53 modulates Matrigel™ invasion in invasive cells in a TSPAN8-dependent manner. (a-b) Boyden chamber Matrigel™ invasion assays were performed on control or p53 siRNA transfected invasive T1C3 cells (a) and on T1C3 cells stably expressing either control or TSPAN8 shRNA (b). 105 cells per well were seeded in 6-well plates. Transfections were performed 24h later with 20nM of control or p53 siRNA. After 36h, cells were resuspended in 10% FCS- McCoy's medium by trypsination and centrifuged at 1,200g for 5min. The residual FCS of the pellet was washed in 1ml of PBS and centrifuged. Finally, pelleted cells were resuspended in McCoy's medium without FCS and for each condition, 35,000 cells were seeded in McCoy's medium without FCS in the upper Boyden's chamber, while the lower chamber was loaded with 5µg/ml -10% FCS – McCoy's medium. After 36h of incubation, all the Matrigel™ was scrubbed away, cells were fixated on the membrane for 15min in -20°C methanol, and stained for 10min in 1mM DAPI. The whole membrane surface was scanned at a magnification of 100X using a time-lapse microscope scan slide protocol (ZEISS), and all invaded cells were counted. At least three independent biological replicates were performed. A representative visual field is illustrated in the right panel; scale bar=200µM. Statistical significance was calculated by two-tailed Student t-test for unpaired samples. Mean differences were considered significant when *: $p<0.05$. **: $p < 0.01$. ***: $p < 0.001$. ns: non-significant.

In conclusion, we demonstrated that p53 represses melanoma invasiveness *in vitro* in a TSPAN8-dependent manner. It can thus be hypothesized that inactivation of p53 transcriptional repressor activity triggers TSPAN8 expression and subsequent acquisition of invasiveness. The present study highlights that reactivating p53 could be a therapeutic strategy in melanoma. However, although this strategy was already proposed and showed promising results, for example using MDM4 [24], MDM2 or iASPP [35] inhibitors, it was hitherto thought that p53 reactivation would act mainly on p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest functions. Indeed, it was shown that p53 reactivation by PRIMA-1^{Met} synergizes with BRAF inhibition by Vemurafenib to induce apoptosis and suppress proliferation of BRAF mutant melanoma cells *in vitro* [36]. Since we previously showed that TSPAN8 expression is also decreased by Vemurafenib [39] (Agaësse et al, 2016), it can now be hypothesized that reactivating p53 and inhibiting BRAF signaling would help to decrease melanoma cells' invasiveness by repressing TSPAN8 expression, and could be promising in future melanoma therapies.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

We thank Hélène Grégoire for technical assistance. This work was supported by a grant from the French Society for Dermatological Research (SRD) and a grant from La Ligue Contre le Cancer (Comité Ardèche). We acknowledge the Roche Company for financial support for manuscript writing and publication.

Bibliography

1 Berthier-Vergnes O, Kharbili ME, de la Fouchardiere A, Pointecouteau T, Verrando P, Wierinckx A et al. Gene expression profiles of human melanoma cells with different invasive potential reveal TSPAN8 as a novel mediator of invasion. Br J Cancer 2011; 104: 155-165.

2 Yanez-Mo M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdes M, Sanchez-Madrid F. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. Trends Cell Biol 2009; 19: 434-446.

3 Kanetaka K, Sakamoto M, Yamamoto Y, Yamasaki S, Lanza F, Kanematsu T et al. Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2001; 35: 637-642.

4 Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, Hensler M. Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. Clin Exp Metastasis 2002; 19: 427-436.

5 Gesierich S, Paret C, Hildebrand D, Weitz J, Zgraggen K, Schmitz-Winnenthal FH et al. Colocalization of the tetraspanins, CO-029 and CD151, with integrins in human pancreatic adenocarcinoma: impact on cell motility. Clin Cancer Res 2005; 11: 2840-2852.

6 Zhou Z, Ran YL, Hu H, Pan J, Li ZF, Chen LZ et al. TM4SF3 promotes esophageal carcinoma metastasis via upregulating ADAM12m expression. Clin Exp Metastasis 2008; 25: 537-548.

7 Greco C, Bralet MP, Ailane N, Dubart-Kupperschmitt A, Rubinstein E, Le Naour F et al. E-cadherin/p120-catenin and tetraspanin Co-029 cooperate for cell motility control in human colon carcinoma. Cancer Res 2010; 70: 7674-7683.

8 Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M et al. Cell surface tetraspanin TSPAN8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. Cancer Res 2010; 70: 1668-1678.

9 Yue S, Mu W, Erb U, Zoller M. The tetraspanins CD151 and TSPAN8 are essential exosome components for the crosstalk between cancer initiating cells and their surrounding. Oncotarget 2015; 6: 2366-2384.

10 Hemler ME. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. Nat Rev Cancer 2014; 14: 49-60.

11 Gesierich S, Berezovskiy I, Ryschich E, Zoller M. Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. Cancer Res 2006; 66: 7083-7094.

12 Ailane N, Greco C, Zhu Y, Sala-Valdes M, Billard M, Casal I et al. Effect of an anti-human Co-029/tspan8 mouse monoclonal antibody on tumor growth in a nude mouse model. Front Physiol 2014; 5: 364.

13 Park CS, Kim TK, Kim HG, Kim YJ, Jeoung MH, Lee WR et al. Therapeutic targeting of tetraspanin8 in epithelial ovarian cancer invasion and metastasis. Oncogene 2016.

14 Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. Cell 2009; 137: 413-431.

15 Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. Nat Rev Cancer 2003; 3: 559-570.

16 Houben R, Hesbacher S, Schmid CP, Kauczok CS, Flohr U, Haferkamp S et al. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. PLoS One 2011; 6: e22096.

17 Bardeesy N, Bastian BC, Hezel A, Pinkel D, DePinho RA, Chin L. Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. Mol Cell Biol 2001; 21: 2144-2153.

18 Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. Curr Biol 2005; 15: 249-254.

19 Goel VK, Ibrahim N, Jiang G, Singhal M, Fee S, Flotte T et al. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. Oncogene 2009; 28: 2289-2298.

20 Dovey M, White RM, Zon LI. Oncogenic NRAS cooperates with p53 loss to generate melanoma in zebrafish. Zebrafish 2009; 6: 397-404.

21 Terzian T, Torchia EC, Dai D, Robinson SE, Murao K, Stiegmann RA et al. p53 prevents progression of nevi to melanoma predominantly through cell cycle regulation. Pigment Cell Melanoma Res 2010; 23: 781-794.

22 Schartl M, Wilde B, Laisney JA, Taniguchi Y, Takeda S, Meierjohann S. A mutated EGFR is sufficient to induce malignant melanoma with genetic background-dependent histopathologies. J Invest Dermatol 2010; 130: 249-258.

23 Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9: 402-412.

24 Gembarska A, Luciani F, Fedele C, Russell EA, Dewaele M, Villar S et al. MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. Nat Med 2012; 18: 1239-1247.

25 Dar AA, Majid S, Rittsteuer C, de Semir D, Bezrookove V, Tong S et al. The role of miR-18b in MDM2-p53 pathway signaling and melanoma progression. J Natl Cancer Inst 2013; 105: 433-442.

26 Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. N Engl J Med 2005; 353: 2135-2147.

27 Lankenau MA, Patel R, Liyanarachchi S, Maharry SE, Hoag KW, Duggan M et al. MicroRNA-3151 inactivates TP53 in BRAF-mutated human malignancies. Proc Natl Acad Sci U S A 2015; 112: E6744-6751.

28 Sankpal NV, Willman MW, Fleming TP, Mayfield JD, Gillanders WE. Transcriptional repression of epithelial cell adhesion molecule contributes to p53 control of breast cancer invasion. Cancer Res 2009; 69: 753-757.

29 Wang SP, Wang WL, Chang YL, Wu CT, Chao YC, Kao SH et al. p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. Nat Cell Biol 2009; 11: 694-704.

30 Moran DM, Maki CG. Nutlin-3a induces cytoskeletal rearrangement and inhibits the migration and invasion capacity of p53 wild-type cancer cells. Mol Cancer Ther 2010; 9: 895-905.

31 Lim SO, Kim H, Jung G. p53 inhibits tumor cell invasion via the degradation of snail protein in hepatocellular carcinoma. FEBS Lett 2010; 584: 2231-2236.

32 Gadea G, de Toledo M, Anguille C, Roux P. Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. J Cell Biol 2007; 178: 23-30.

33 Avery-Kiejda KA, Zhang XD, Adams LJ, Scott RJ, Vojtesek B, Lane DP et al. Small molecular weight variants of p53 are expressed in human melanoma cells and are induced by the DNA-damaging agent cisplatin. Clin Cancer Res 2008; 14: 1659-1668.

34 Roth I, Campbell H, Rubio C, Vennin C, Wilson M, Wiles A et al. The Delta133p53 isoform and its mouse analogue Delta122p53 promote invasion and metastasis involving pro-inflammatory molecules interleukin-6 and CCL2. Oncogene 2016.

35 Lu M, Breyssens H, Salter V, Zhong S, Hu Y, Baer C et al. Restoring p53 function in human melanoma cells by inhibiting MDM2 and cyclin B1/CDK1-phosphorylated nuclear iASPP. Cancer Cell 2013; 23: 618-633.

36 Krayem M, Journe F, Wiedig M, Morandini R, Najem A, Sales F et al. p53 Reactivation by PRIMA-1(Met) (APR-246) sensitises (V600E/K)BRAF melanoma to vemurafenib. Eur J Cancer 2016; 55: 98-110.

37 Le Naour F, Andre M, Greco C, Billard M, Sordat B, Emile JF et al. Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. Mol Cell Proteomics 2006; 5: 845-857.

38 Masse I, Barbollat-Boutrand L, Molina M, Berthier-Vergnes O, Joly-Tonetti N, Martin MT et al. Functional interplay between p63 and p53 controls RUNX1 function in the transition from proliferation to differentiation in human keratinocytes. Cell Death Dis 2012; 3: e318.

39 Agaësse G, Barbollat-Boutrand L, Sulpice E, Bhajun R, Kharbili ME, Berthier-Vergnes O, Degoul F, de la Fouchardière A, Berger E, Voeltzel T, Lamartine J, Gidrol X, Masse I. A large-scale RNAi screen identifies LCMR1 as a critical regulator of TSPAN8-mediated melanoma invasion. Oncogene. 2016 Jul 4. doi: 10.1038/onc.2016.219. [Epub ahead of print]

Partie III : β-caténine promeut l'invasion des cellules de mélanome en favorisant l'expression transcriptionnelle de TSPAN8

1 : Introduction

Lorsque nous avons réalisé le crible, β-caténine ne faisait pas partie des régulateurs putatifs identifiés car son inhibition par le siARN n'induisait pas de variations statistiquement significatives de la fluorescence des cellules. De plus, bien que son régulateur négatif GSK3β figure parmi les régulateurs négatifs putatifs identifiés par le crible, son inhibition n'induit pas d'effet statistiquement significatif sur l'expression endogène de TSPAN8 dans les cellules invasives T1C3.

Cependant, lors de l'analyse *in silico* par le logiciel Genomatix réalisée précédemment pour l'étude du rôle de p53, cinq sites de fixation étaient prédits dans la séquence du promoteur de TSPAN8 pour les facteurs de la famille TCF/LEF qui sont associés à la signalisation β-caténine (**Figure 24**).

AACTACGCATTATAAAATGAAAACAATGTTGCAGTCAGTGCCACTTTATGATTTCTTTCCCTTTGTATCATAAAGAAATAAAGATAAAAAGCAAATGGTCTTATCATGATAGG
CAAGGCTGCCTCTCCCTCTGCAATTTCTGTGGTGTATTTACGGCAGCTCTGGAATTCTTTTGAAATAAATTTAGATGTTTTGGAGGGCAGATACATGTAATGGTTATTTTACTA
TTCTAGGTTTAATGATAACAGGTTGCTATGTCTAAGCTTTGATATTTTGCAGATTTCTAAATGCATTTTATTGCATTTAGAAGGAATTTTGTAGTATTGAGAAAATGCAATGCA
AAAATGAGTAGAGATACAATGTCCATTTAACTCAGAACAAAACAACCTTATTTCCCCATAGTTGAAATGGAGGGCGGGGAAGTCAGGCAGTGGTTTCTGAAAGCCAAGAAC
TTAGTAGCACTGTGCCATTCTCTTGCCTGATCCAGTGCCATTCCCTTCACTTGATATCTGTTTACTTTAGAGGAGGCAGTTTTTGAGAAAGGATCATAAATATCCTGGCCCAGT
GCCCCAGGAGCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCCTGGAGATAGCCTTTGCGATATTTAAATGTGTGAGTTAATAGCCTTTGAGATATTTAAATGTGTGGGTTAATAGC
CTTTGCGATATTTAAATGTGTGGGTTAATTTTTTTATCCAGTTTAATAACTTTTTATTCCTCCCTCTACTTCTTTGCTTTCTCTTTCTGCTCTGAAGCCGTGGATACAGAAATCTCT
GCAGGCAAGTTGCTCCAGAGCATATTGCAGGACAAGCCTGTAACGAATAGTTAAATTCACGGCATCTGGATTCCTAATCCTTT

Figure 24 : Prédiction des sites de fixation des facteurs TCF/LEF dans la séquence promotrice fonctionnelle de TSPAN8.

La prédiction des sites de fixation pour les facteurs TCF/LEF dans la séquence promotrice en amont du TSS de l'isoforme TSPAN8-002 a été réalisée avec le logiciel Genomatix. Les sites figurent en bleu et les séquences « core » sont soulignées.

De plus, bien que le rôle de la signalisation β-caténine dans le mélanome est contrasté - en témoignent les observations rapportées par les diverses publications évoquées dans l'introduction bibliographique – certaines études montrent que la signalisation β-caténine favorise l'invasion des cellules de mélanome humain (Sinnberg et al., 2011), et la dissémination métastatique de mélanomes murin (Gallagher et al., 2013).

Nous avons donc choisi d'étudier l'hypothèse d'une régulation positive de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 par le recrutement de β-caténine au niveau des sites de fixation prédits dans son promoteur. Nous avons donc fait des expériences de qPCR et western blot pour prouver que β-caténine régule l'expression de TSPAN8 ; des expériences de ChIP et des tests luciférases pour prouver que cette régulation est dépendante de la fixation de β-caténine sur le promoteur de TSPAN8. Enfin, nous avons réalisé des tests d'invasion après inhibition de β-caténine et de TSPAN8 pour montrer que cette régulation de TSPAN8 par β-caténine est suffisamment robuste pour avoir des conséquences phénotypiques sur les cellules.

2 : Matériel & Méthodes

2.1 : Lignées cellulaires et culture

Les clones de cellules de mélanomes précédemment établies, IC8 non-invasive et T1C3 invasive sont toutes deux issues d'une même lignée de mélanome parental M4BE (voir Berthier-Vergnes et al., 2011). Ces deux clones ont été cultivées en monocouche en milieu McCoy's 5A (Gibco) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (Hyclone), 100 IU/ml pénicilline (PAA), et 100 IU/ml streptomycine (PAA). Les flasques ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2. Les cellules ont été trypsinées et divisées au 1/5ème deux fois par semaine de sorte qu'elles n'atteignent jamais la confluence, mais également pour pouvoir prélever les cellules nécessaires aux expériences. La réaction de trypsine a été arrêtée par le SVF présent dans le milieu de culture. Des tests de détection des contaminations bactériennes et de mycoplasme ont été réalisés à plusieurs reprises pour s'assurer de la qualité des conditions de culture.

2.2 : Transfections transitoires

Pour les expériences d'interférence à l'ARN, 100 000 cellules/puits ont été ensemencées en plaques 6 puits. Après 24h, les cellules ont été transfectées avec de l'interferrin (Polyplus) et un siARN à la concentration finale de 20nM.

Pour les surexpressions, 500ng des vecteurs pCMVvide, pCMV-β-caténine WT ou pCMV-β-caténine ΔN89 (gracieusement fournis par Claude Caron de Fromentel, Inserm, CRCL) (Ruptier et al., 2011) ont étés transfectés 24h après ensemencement de 75 000 cellules/puits pour les IC8 ou 100 000 cellules/puits pour les T1C3.

Pour les tests luciférase, les cellules ont été ensemencées en plaques 24 puits à raison de 75 000 cellules/puits pour les IC8 et 100 000 cellules/puits pour les T1C3. Après 24h, les cellules ont été transfectées durant 8h avec l'agent de transfection Jet Peï (Polyplus) et des différents vecteurs d'intérêt en fonction du type d'expérience. Les vecteurs utilisés sont : les vecteurs rapporteurs firefly luciferase pGL4.10 vide (promega) et pGL4.10-pTSPAN8 (voir construction ci-après); le vecteur normalisateur pCMV–renilla luciférase (Promega); le vecteur pCMV vide ; les vecteurs d'intérêt pCMV-β-caténine WT et pCMV-β-caténine ΔN89. Les quantités de vecteurs transfectés par puits sont 250 ng pour les vecteurs pGL4.10, 10 ng pour le vecteur pCMV-RL et 500 ng pour les vecteurs d'intérêt. Chaque condition a été réalisée en triplicat technique pour évaluer les écarts-types internes à chaque expérience mais les écarts-types présentés sont ceux des réplicats biologiques indépendants.

2.3 : Tests luciférase

Les tests luciférase ont été effectués le lendemain de la transfection des vecteurs selon les instructions du fournisseur avec le kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Les mesures de luminescence ont été effectuées sur un lecteur de plaque Victor (Perkin Elmer). Les données obtenues ont été normalisées par rapport à l'activité de la Renilla luciférase qui reflète l'efficacité de transfection.

2.4 : Extraction d'ARN et rétro-transcription

24h ou 48h après transfection des siARN, ou 48h après transfection des vecteurs, les cellules ont été lysées dans 400µL de Tampon RLT. Les ARN ont été extraits avec le kit RNEASY (Qiagen), puis la qualité et la concentration des ARNs ont été déterminées par mesure au Nanodrop « ND2000 ». Pour une même expérience, les concentrations des ARN ont été homogénéisées avant l'étape de rétro-transcription (RT). Les réactions de RT ont ensuite été réalisées sur 500ng d'ARN avec le kit *PrimScript RT reagent kit*$_{(perfect\ real\ time)}$ (TAKARA) selon les instructions du fournisseur.

2.5 : PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les qPCR ont été réalisées sur 10 ng d'ADNc par puits avec le mix *SYBR premix Ex Taq II* (TAKARA) sur une machine *Mx3000P real time PCR* (Stratagene). Des gammes de concentrations ont été effectuées pour vérifier l'efficacité de qPCR de chaque couple d'amorce et chaque échantillon a été testé en duplicat. Les valeurs ont été calculées selon la méthode du ΔΔCt puis normalisées sur le niveau d'expression de l'ARNr 18S. En effet, les autres normalisateurs utilisés de façon courante tels que la GAPDH, la β-Actine et l'α-tubuline ne sont pas adaptés à nos expériences car ils varient trop selon que le mélanome soit invasif ou non (Goidin et al., 2001).

Les 2 tableaux ci-dessous présentent les amorces et les cycles utilisés pour les réactions de qPCR :

	Gène	Amorce (5'→3') Sens	Amorce (5'→3') Antisens	TM
	18 S	5' CGATGCGGCGGCGTTATT 3'	5' CCTGGTGCCCTTCCGT 3'	60°C
	BCAT	5'TGCAGTTCGCCTTCACTATG3'	5'ACTAGTCGTGGAATGGCACC3'	58°C
	LEF1	5'GCAGGCTAAATATTATGAATTAGC3'	5'GTTGGGAATGAGCTTCGTTTTCC3'	58°C
	TSPAN8	5'TTGCTCTGACCTGTCCT3'	5'TTTTTCACTTTCCCCTGTGG3'	60°C
Amorces ChIP β-caténine	-1kb sur Prom. TSPAN8	5' GGAATTTCCAGGAGTGAACTG 3'	5' ATTTTGGTGGATGCTGAACA 3'	58°C
	Site 1	5' TGAAAACAATGTTGCAGTCAG 3'	5' AGGCAGCCTTGCCTATCAT 3'	55°C
	Site 2	5' TGATAACAGGTTGCTATGTCTAAGC 3'	5' TTTTGCATTGCATTTTCTCAA 3'	55°C
	Site 3	5' CAGTGCCATTCCCTTCACTT 3'	5' CAGGCAAGTATGTTCCTTTGC 3'	58°C
	Site 4	5' TTGCCTGGAGATAGCCTTTG 3'	5' GGGAGGAATAAAAAGTTATTAAACTGG 3'	55°C
	Site 5	5' TCCTCCCTCTACTTCTTTGCTTT 3'	5' CAGGCTTGTCCTGCAATATG 3'	55°C
	Sites 1+2	5' TGAAAACAATGTTGCAGTCAG 3'	5' TTTTGCATTGCATTTTCTCAA 3'	57°C
	Sites 3-5	5' CAGTGCCATTCCCTTCACTT 3'	5' CAGGCTTGTCCTGCAATATG 3'	57°C

Tableau 2 : Amorces utilisées pour les réactions de qPCR.

Dans le tableau sont indiqués pour chaque gène : les séquences sens et antisens utilisées, ainsi que la température d'hybridation (TM) pour laquelle nous avons validé le couple d'amorces utilisé. Les amorces pour la TSPAN8 ciblent l'ADNc des 4 isoformes de la protéine. Chaque couple d'amorce a au préalable été mis au point pour avoir une amplification spécifique et avec la meilleure efficacité possible.

Dénaturation initiale	Cycles d'amplification (*40)			Courbe de Fusion		
95°C	95°C	TM	72°C	95°C	TM	95°C
30 s	5 s	30 s	30 s	1'	30s	fin

Tableau 3 : Cycles utilisés pour les réactions de qPCR.

Les intensités de fluorescence sont mesurées après chaque amplification lors des cycles.

2.6 : Immuno précipitation de chromatine (ChIP)

Les cellules ont été ensemencées en concentrations identiques dans plusieurs flasques f75. Une première flasque a servi à compter les cellules. Les autres flasques ont été fixées 10 minutes avec du paraformaldéhyde 1% à température ambiante. La réaction de fixation est arrêtée par ajout de 0,125M de glycine, incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Après deux rinçages au PBS froid, les cellules sont récupérées par grattage à 4°C dans du PBS PMSF 1mM, puis centrifugées. Le culot est resuspendu en tampon de lyse dans un volume permettant une concentration finale de 5 millions de cellules pour 300µl. Après 10 minutes d'incubation à 4°C, les lysats sont soniqués au bioruptor : 15 cycles de 30 secondes de sonication par minute sur 5 millions de cellules dans 300µl.

Après sonication, une fraction de 20µl est déposée sur gel d'agarose + BET (Bromure d'EThidium) pour contrôler la taille des fragments obtenus. Le reste est préincubé avec un IG contrôle et des billes d'agarose-protéine A afin d'éliminer ce qui s'y fixerait de façon aspécifique. Ensuite, le surnageant est divisé en 2 volumes égaux et incubés avec soit un IG anti β-caténine soit un IG contrôle à 4°C sur la nuit. Le lendemain, afin de réaliser la précipitation, les échantillons sont incubés 2h avec les billes des billes d'agarose-protéine A.

Après une série de 8 lavages avec des tampons de stringences différentes, les immuno- précipitats sont élués. Les échantillons sont traités avec 1µg de RNAse A et 2,5 µl de Protéinase K à 10mg/ml pendant 30 minutes à 37°C. Enfin, les « cross-linkings » entre les protéines et l'ADN dus à la fixation au paraformaldéhyde sont réversés sur la nuit à 60°C après addition dans le milieu de NaCl à 200mM final. Enfin, après une étape de purification sur colonne, les séquences d'ADN sont analysées par QPCR.

2.7 : Western Blots

Après 72h de transfection, les protéines ont été récoltées par solubilisation des cellules en tampon RIPA - PIC (Roche), dosées, dénaturées à 95°C en tampon Laemli en conditions non dénaturantes pour la révélation de TSPAN8 et dénaturante pour la révélation des autres protéines (β-mercaptoethanol à 10% dans le tampon Laemli).

Les échantillons sont ensuite déposés sur gel d'acrylamide à 10%. La migration est réalisée à 120 volts durant environ 2h, puis transférées 1h à 300mA sur une membrane de nitrocellulose. Après un marquage/fixation au rouge ponceau, la membrane est lavée puis saturée avec du TBS - Tween 0,1% - lait 10%. L'anticorps primaire est incubé sur la nuit à 4°C. Après 3 lavages de 10min en TBS - Tween 0,1%, l'anticorps secondaire est incubé 2h à RT. Après 3 nouveaux lavages (dernier lavage en TBS **sans** Tween), la membrane est révélée au Chemidoc (révélateur : Clarity™ Western ECL Substrate Cat.# 170-5060, Bio-Rad).

Les conditions pour les anticorps sont les suivantes : Anticorps primaires : anti TSPAN8 (fourni par C. Boucheix INSERM U1004) : 1/1500ème ; anti β-caténine (H-102): sc-7199, Santacruz) au 1/700ème ; anti actine : (clone C4 MAB1501 Milipore Temecula) au 1/5000ème . Anticorps secondaire : Goat anti mouse (#31430, Pierce) 1/5000ème.

2.8 : Tests d'invasion de Matrigel™ en chambres de Boyden

Les inserts (BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber, BD Bioscience) sont réhydratés en milieu McCoy's 5A sans SVF durant 2h avant leur ensemencement. Après 24h de transfection, les cellules sont resuspendues par trypsination, comptées et ensemencées en milieu sans SVF à raison de 50000 cellules par puits dans la chambre supérieure, alors que la chambre inférieure contient du milieu avec 10% de SVF et 5 µg/ml d'insuline. Après 48h d'incubation, tout le Matrigel™ est enlevé avec un coton-tige, puis les cellules sont fixées 15min dans du méthanol à -20°C, puis comptées selon le protocole ci-dessous.

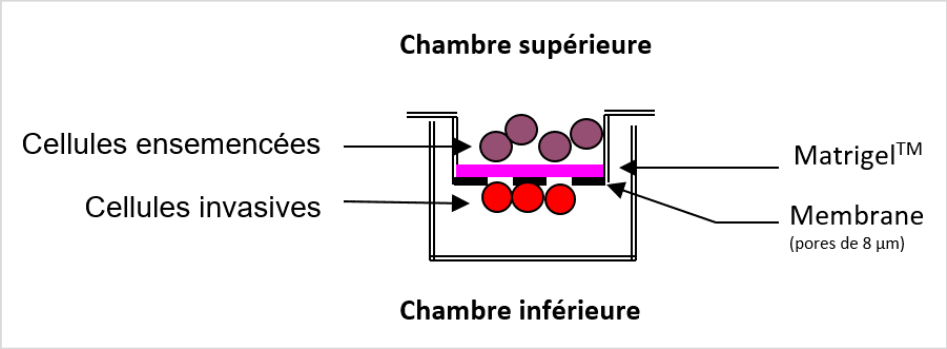


Figure 25 : Représentation schématique d'une expérience d'invasion sur Matrigel™ en chambre de Boyden.

Les cellules sont ensemencées dans la chambre supérieure dans un milieu dépourvu en SVF. Les cellules invasives dégradent le Matrigel™ et migrent dans la chambre inférieure qui contient un milieu attractif (SVF et Insuline dans notre cas).

2.9 : Comptage des cellules invasives

Les noyaux sont marqués avec une solution de DAPI à 4µM pendant 15min. Les membranes des chambres de Boyden sont observés et scannées dans leur intégralité à l'aide du protocole « scan-slide » du logiciel d'acquisition MetaMorph (Universal Imaging Corporation), sur microscope inversé time-lapse Zeiss Axiovert 200 équipé d'une caméra Coolsnap HQ2 avec l'objectif 10X. Pour chaque membrane, tous les noyaux sont ensuite comptés de façon à estimer le nombre de cellules invasives de chaque condition. Les ratios sont calculés sur la condition contrôle de référence de façon à évaluer l'impact de l'expérience sur l'invasion des cellules.

2.10 : Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test de Student, avec pour paramètres : unilatéralité et données appariées (contrôle *vs* échantillon au sein de chaque répétition d'expérience), **ns: différence statistiquement non significative : p> 0,05 ; * p<0,05, **p<0,01, ***p<0.001.**

3 : Résultats

3.1 : β-caténine favorise l'expression transcriptionnelle de TSPAN8

Comme des sites de régulation par TCF/LEF sont prédits dans la séquence du promoteur de TSPAN8 et que la signalisation β-caténine favorise l'invasion de cellules de mélanome humain (Sinnberg et al., 2011), nous avons fait l'hypothèse d'une régulation positive de TSPAN8 par β-caténine. Nous avons commencé par tester si β-caténine était capable de réguler l'expression transcriptionnelle de TSPAN8. Dans les cellules de mélanome T1C3 invasives où TSPAN8 est fortement exprimée, nous avons montré que l'inhibition de β-caténine par siARN est efficace, et conduit à une réduction significative de l'expression de l'ARNm TSPAN8 (**Figure 26 A**). Comme β-caténine agit en association avec les facteurs de transcription TCF/LEF, nous avons également montré qu'un siARN contre LEF1 induit une diminution similaire de l'expression de l'ARNm TSPAN8 (**Figure 26 B**). Les inhibitions de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 induites par les siARN dirigés contre β-caténine et contre LEF1 sont suffisamment robustes pour que l'on observe une diminution de l'expression de la protéine TSPAN8 (**Figure 26 C**, panneau supérieur). De plus, en inhibant de concert β-caténine et LEF1 les niveaux d'expression de la protéine TSPAN8 diminuent de façon beaucoup plus marquée (**Figure 26 C**, panneau inférieur).

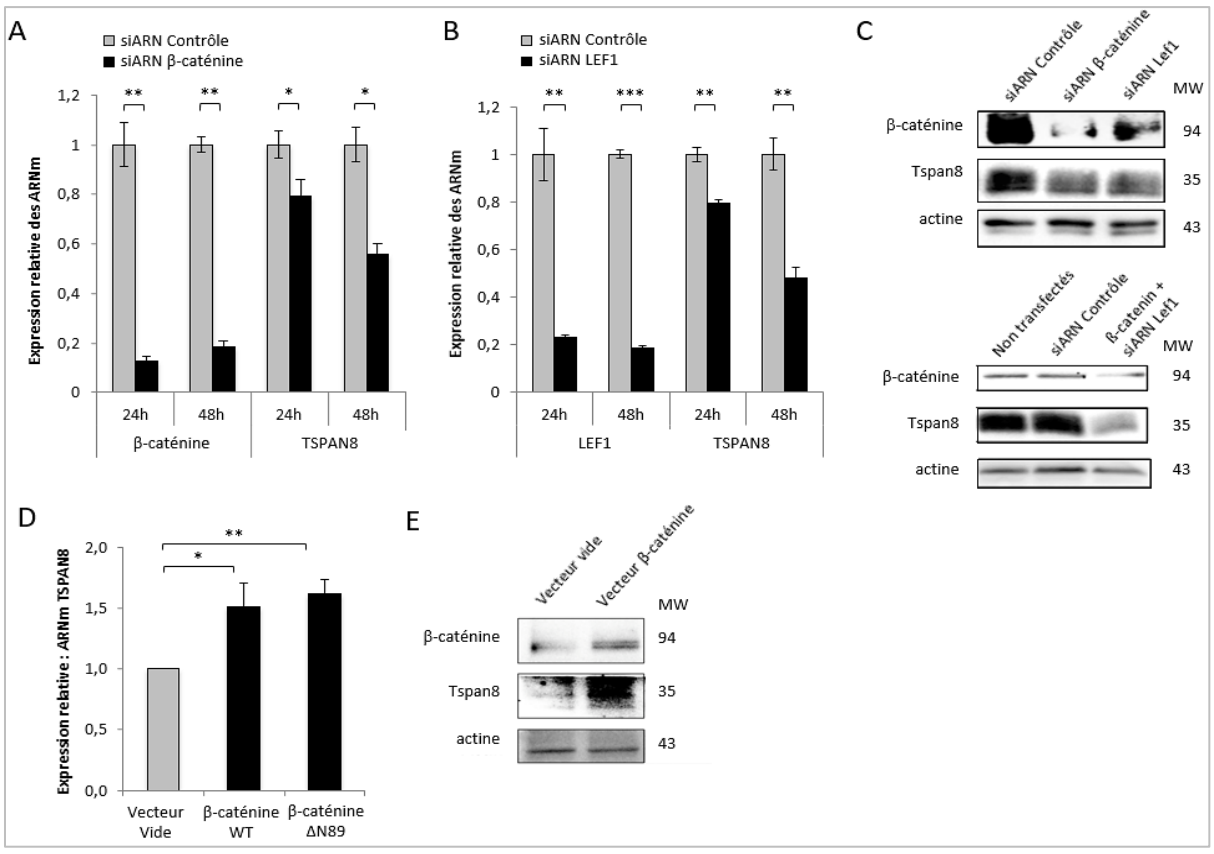


Figure 26 : β-caténine et LEF1 favorisent l'expression de TSPAN8 au niveau de l'ARNm et de la protéine.

(A, B et C) : Des cellules de mélanome invasives T1C3 ont été transfectées avec 10nM de siARN contrôle ou de siARN dirigé contre β-caténine et / ou LEF1 pendant 24h, 48h (A, B) ou 72h (C) et l'expression de TSPAN8 a été évaluée au niveau transcriptionnel par qPCR (A, B) et protéique par Western Blot (C).
(D, E) : Des cellules de mélanome non-invasives IC8 ont été transfectées avec 500ng de vecteur contrôle (vecteur vide) ou de vecteur de surexpression de β-caténine sauvage (WT, D) ou de β-caténine stabilisée (ΔN89, D, E). L'effet de ces surexpressions sur l'expression de TSPAN8 a été évalué par qPCR (D) et par Western Blot (E).
Les moyennes et écarts types présentés ici ont été calculés sur des triplicatas biologiques et les Western Blots sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. *** p<0,001 ; ** p<0,01 ; * p<0,5.

En accord avec ces premières observations dans les cellules invasives T1C3, nous avons montré dans les cellules non-invasives IC8 qui n'expriment pas TSPAN8, que l'expression ectopique de β-caténine est suffisante pour faire apparaitre dans ces cellules l'expression de TSPAN8, tant au niveau transcriptionnel (**Figure 26 D**), qu'au niveau de la protéine (**Figure 26 E**). Dans ces expériences, bien que l'augmentation d'expression transcriptionnelle de TSPAN8 soit plus robuste lors de la surexpression d'une forme stabilisée de β-caténine (ΔN89), la surexpression d'une forme sauvage est également capable d'induire l'expression de TSPAN8 dans ces cellules (**Figure 26 D**).

3.2 : β-caténine est recrutée sur les sites TCF/LEF du promoteur de TSPAN8 et régule son activité transcriptionnelle

Comme les expériences d'inhibition par siARN et de surexpression ectopique de β-caténine nous ont confortés dans l'hypothèse d'une régulation positive de l'expression de TSPAN8 par la signalisation β-caténine ; et comme des sites de fixation pour les cofacteurs de la famille TCF/LEF étaient prédits dans la séquence promotrice de TSPAN8, nous avons souhaité vérifier si la régulation positive de TSPAN8 observée précédemment était directement opérée via les sites prédits.

Aussi, dans cette optique, nous avons réalisé une série d'expériences d'Immuno- Précipitation de Chromatine (ChIP) qui montrent que β-caténine est bien recrutée sur le promoteur de TSPAN8 au niveau de plusieurs régions qui incluent certains des sites prédits (**Figure 27 A**). Toutefois, avec ces expériences nous ne sommes pas parvenus à identifier un site de fixation sur lequel β-caténine serait préférentiellement recrutée.

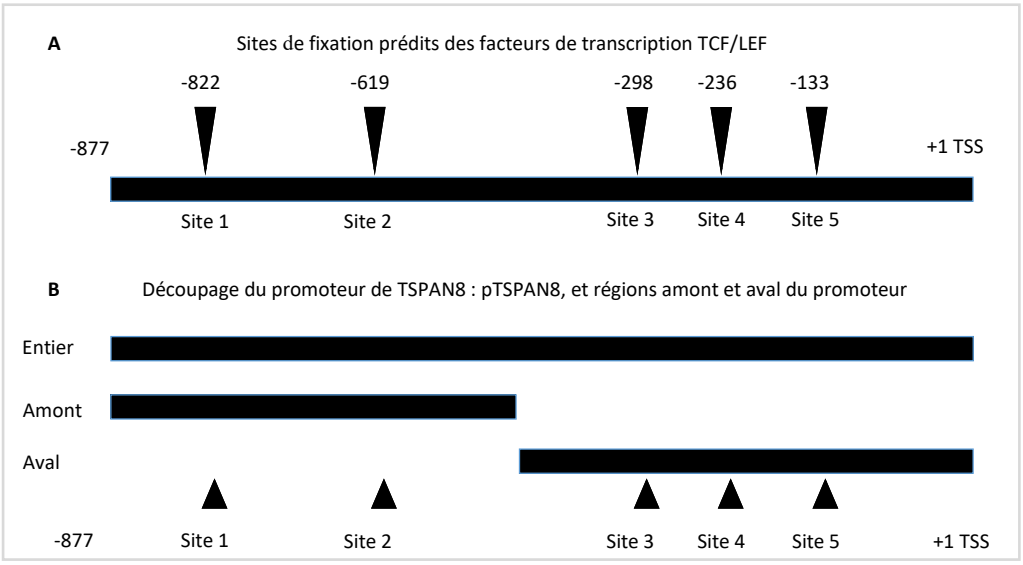


Figure 27 : Représentation schématique des sites de fixation prédits pour β-caténine sur la séquence promotrice de TSPAN8.

(A) Dans la séquence du promoteur de TSPAN8, 5 sites de fixations pour les facteurs TCF/LEF sont prédits. (B) Ces sites permettent de définir une région amont avec les 2 premiers sites, et une région aval avec les 3 derniers sites. Ces régions amont et aval ont été clonées dans un vecteur rapporteur luciférase afin de comparer l'activité du promoteur en entier avec les promoteurs tronqués.

Comme les sites 1 et 2 sont répartis sur la première moitié du promoteur (en amont), et que les sites 3, 4 et 5 sont répartis sur la deuxième moitié du promoteur (en aval) (**Figure 27B**), nous avons procédé par dichotomie afin de savoir si β-caténine était recrutée plutôt en amont du promoteur, ou plutôt en aval dans la région proche du TSS (Transcription Start Site). Cependant, une fois encore nous ne sommes pas parvenus à démontrer l'existence d'une région préférentielle pour le recrutement de β-caténine sur le promoteur de TSPAN8, puisque nous observons un enrichissement uniquement de la région située en amont dans 2 expériences (**Figure 28 A**), un enrichissement uniquement de la région aval proche du TSS dans trois expériences (**Figure 28 B**). Enfin, un enrichissement simultané de ces 2 régions est observé dans deux dernières expériences (**Figure 28 C**).

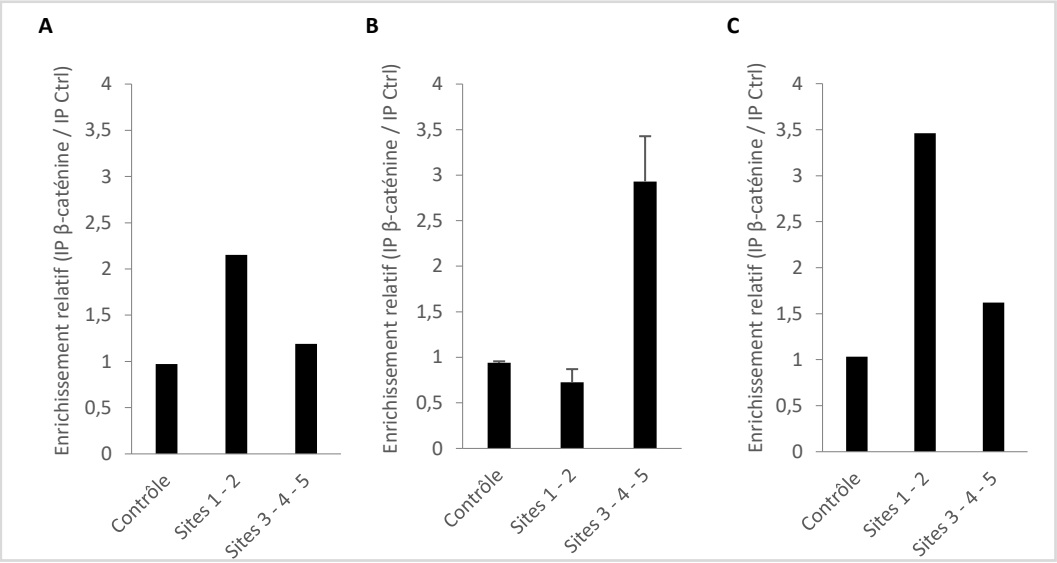


Figure 28 : Enrichissement comparatif des séquences amont et aval du promoteur de TSPAN8 lors de l'immuno précipitation de la chromatine par un anticorps anti β-caténine.

Les enrichissements relatifs moyens en séquences spécifiques des sites 1 et 2, et des sites 3, 4, et 5 ont été évalués par qPCR. L'enrissement après immuno précipitaion de la chromatine à l'aide d'un anticorps anti β-caténine a été rapporté à celui obtenu avec un anticorps contrôle (Ctrl). Ces enrichissements sont présentés pour des expériences indépendantes de ChIP : **(A)** deux expériences qui montrent un enrichissement de l'amont du promoteur contenant les sites 1 et 2 ; **(B)** 3 expériences qui montrent un enrichissement de l'aval du promoteur qui contient les sites 3, 4, et 5 (S.E.M.) ; **(C) :** 2 expériences qui montrent un enrichissement à la fois de la région amont et de la région aval du promoteur.

Afin de montrer que le recrutement de β-caténine sur le promoteur de TSPAN8 est à l'origine de la régulation de l'expression de ce gène par la signalisation β-caténine, nous avons réalisé des tests à l'aide d'un rapporteur luciférase qui reflète l'activité de la séquence promotrice de TSPAN8 entière, de sa partie amont (sites 1 et 2) ou de sa partie aval (3, 4, 5) (voir **Figure 27 B**).

Ici, cette construction reportrice luciférase nous a permis de montrer que β-caténine régule l'activité transcriptionnelle du promoteur de TSPAN8. En effet, dans les cellules non-invasives, un vecteur d'expression ectopique de β-caténine sauvage (WT) induit une augmentation de presque 5 fois de l'intensité de luminescence, et l'expression ectopique de la forme stabilisée ΔN89 de β-caténine induit une augmentation de plus de 15 fois de l'intensité de luminescence des cellules exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur entier de TSPAN8 (**Figure 29**). Aussi, par la suite nous avons choisi pour les différentes expériences d'expression ectopique, de ne plus travailler qu'avec la β-caténine stabilisée ΔN89.

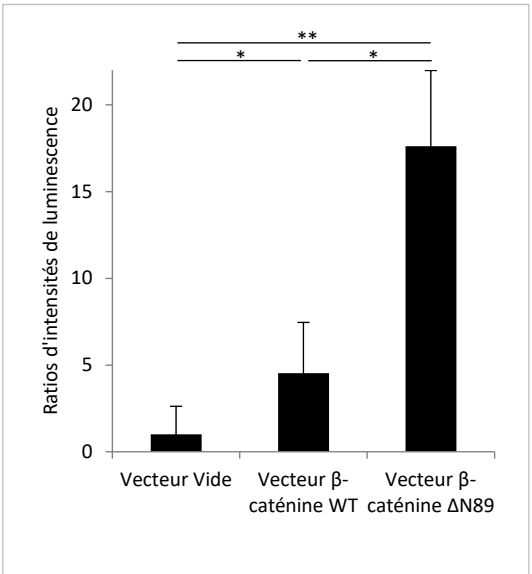


Figure 29 : L'expression ectopique de β-caténine stimule l'activité transcriptionnelle du promoteur de TSPAN8.

Les cellules de mélanome non-invasives IC8 ont été transfectées avec 500ng de vecteur de surexpression contrôle ou de vecteur de surexpression β-caténine sauvage (WT) ou stabilisée (ΔN89). Dans le même temps, les cellules ont été transfectées avec 5ng d'un vecteur normalisateur « rénila luciférase », et avec 250ng de vecteur rapporteur codant la « firefly luciférase » soit sans promoteur (contrôle), soit sous le contrôle du promoteur de TSPAN8 (pTSPAN8). Les valeurs sont le ratio de l'intensité du vecteur pTSPAN8 rapporté sur l'intensité du vecteur contrôle, tous deux normalisés sur l'efficacité de transfection mesurée par le vecteur rénila-luciférase, pour chacune des conditions séparément. Les valeurs sont ensuite normalisées sur le ratio d'intensité obtenu sans surexpression de β-caténine (Vecteur Vide). Les valeurs présentées sont les moyennes et écarts-type d'un triplicata technique. * : p< 0.05 ; ** : p<0,01.

De la même manière que pour les expériences de ChIP, nous avons ensuite procédé par dichotomie : nous avons réalisé deux constructions rapportrices luciférases : l'une sous le contrôle de la région amont du promoteur et l'une sous le contrôle de la région aval du promoteur (voir **Figure 27 B**). Nous avons alors pu évaluer l'effet de la surexpression de β-caténine stabilisée ΔN89 sur l'activité transcriptionnelle de chacune de ces portions de la séquence promotrice. Comme sur les tests luciférases présentés précédemment, l'expression d'une β-caténine ΔN89 stabilisée induit une forte augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur entier de TSPAN8 par rapport au contrôle (**Figure 30**). Cette augmentation d'activité induite par β-caténine ΔN89 est conservée avec la partie en aval du promoteur (la région la plus proche du TSS contenant les sites 3, 4, 5), alors que 40% de cette augmentation est perdue lorsque la luciférase est sous le contrôle de l'amont du promoteur (contenant les sites 1 et 2). Cela suggère que la régulation du promoteur de TSPAN8 par β-caténine est majoritairement due à la fixation de du complexe TCF/LEF/β-caténine sur les sites en aval du promoteur (sites 3, 4, 5).

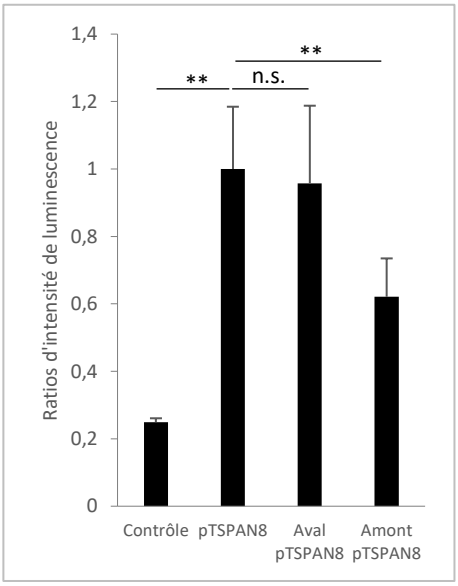


Figure 30 : La surexpression de β-caténine favorise l'activité transcriptionnelle du promoteur de TSPAN8, préférentiellement via la région aval du promoteur.

Les cellules non-invasives IC8 ont été transfectées avec 500 ng de vecteur contrôle ou surexprimant la β-caténine ΔN89. Dans le même temps, les cellules ont été transfectées avec 5ng d'un vecteur normalisateur « rénila luciférase », et avec 250ng d'un vecteur rapporteur codant la « firefly luciférase » soit sans promoteur (contrôle), soit sous le contrôle du promoteur de TSPAN8 entier (pTSPAN8), de sa partie aval, ou de sa partie amont. Les valeurs présentées sont les moyennes et écarts-types de 3 expériences indépendantes. Il s'agit pour chaque condition des ratios de l'intensité mesurée lors de la surexpression de β-caténine ΔN89 rapportés sur l'intensité mesurée sans surexpression de β-caténine. Les valeurs sont normalisées sur le ratio de la condition pTSPAN8, après avoir été normalisées par rapport à l'efficacité de transfection de chaque condition reflété par l'activité « rénila luciférase ». ** p<0,01 ; n.s. non significatif.

3.3 : β-caténine favorise l'invasion dépendante de TSPAN8 par les cellules de mélanome

Comme l'expression de TSPAN8 est régulée par β-caténine et que son expression dans les cellules de mélanome favorise l'invasion du Matrigel™, nous avons voulu évaluer le rôle de β-caténine dans les cellules de mélanome lors de l'invasion dépendante de TSPAN8.

Nous avons donc réalisé une série de tests d'invasion sur Matrigel™ en chambre de Boyden après inhibition par siARN, soit de β-caténine, soit de LEF1, soit de β-caténine et de LEF1 en même temps. Nous avons ainsi pu observer que l'inhibition de β-caténine et l'inhibition de LEF1 mènent toutes deux à une inhibition de l'invasion du Matrigel™ par les cellules de mélanome (**Figure 31**). Mais de façon intéressante, nous avions montré précédemment que l'inhibition concomitante de β-caténine et de LEF1 permet une meilleure inhibition de l'expression de TSPAN8 (**Figure 26 C**, panneau du bas), et nous montrons ici que cela permet également une inhibition bien plus efficace de l'invasion par les cellules de mélanome (**Figure 31**).

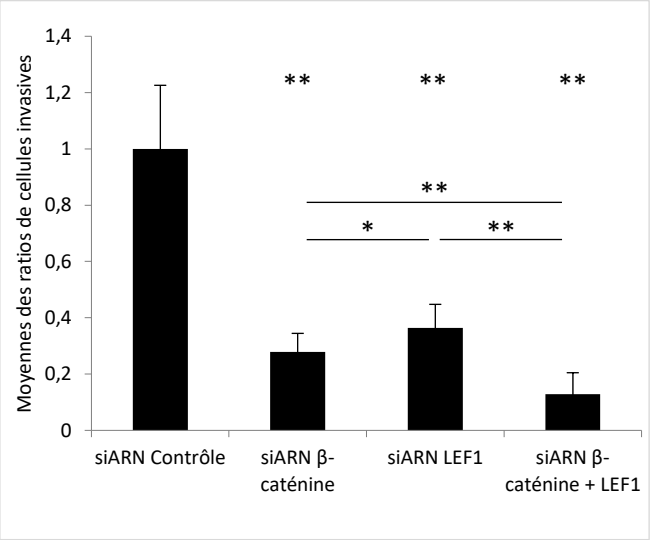


Figure 31 : L'inhibition de β-caténine et de LEF1 par siARN réprime le potentiel invasif des cellules de mélanome.

Les cellules invasives T1C3 ont été transfectées avec 20nM de siARN dirigé contre β-caténine et/ ou LEF1. Après 48h elles ont été ensemencées sur Matrigel™ en chambre de Boyden et incubées 36h. Les valeurs présentées sont issues de 3 expériences indépendantes et sont les moyennes et écart types du nombre de cellules invasives comptées normalisées sur les valeurs obtenues avec la condition siARN contrôle. ; ** p<0,01 ; * p<0,5.

Afin de montrer que la diminution de l'invasion du Matrigel™ observée lors de l'inhibition de β-caténine est dépendante de l'expression de TSPAN8, nous avons réalisé une expérience préliminaire d'épistasie entre β-caténine et TSPAN8. Cette expérience montre que la surexpression de β-caténine dans les cellules de mélanome invasives T1C3 accroit leur potentiel invasif. Mais l'inhibition concomitante de TSPAN8 par siARN annule totalement cet accroissement du potentiel invasif des cellules de mélanome invasives (**Figure 32**). Bien que cette expérience nécessite d'être répétée, elle suggère que la régulation du potentiel invasif des cellules de mélanome par β-caténine est dépendante de TSPAN8.

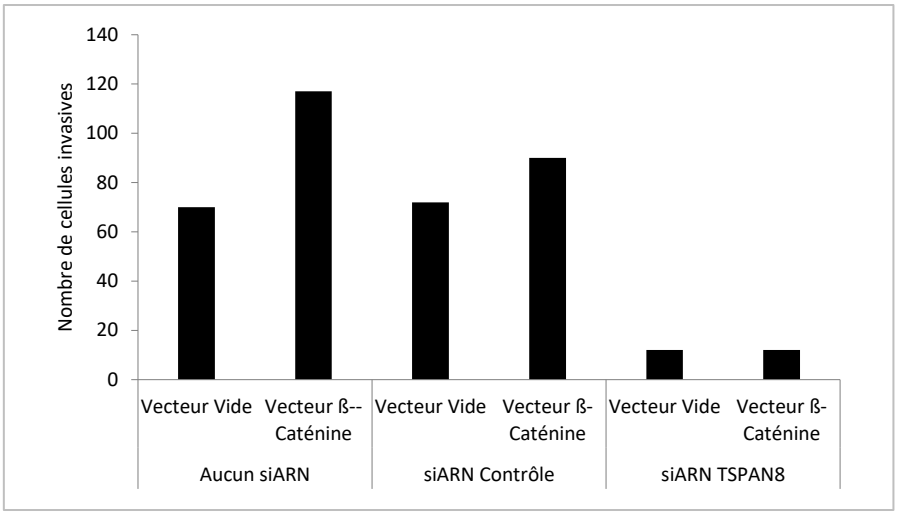


Figure 32 : La surexpression ectopique de β-caténine favorise l'invasion du Matrigel™ par les cellules de mélanome de façon dépendante de TSPAN8.
Les cellules invasives T1C3 ont été transfectées avec 500ng de vecteur contrôle (Vecteur Vide) ou de surexpression de la β-caténine stabilisée ΔN89, et, le cas échéant, 5nM de siARN SmartPool (ON-TARGETplus siRNA - Dharmacon) contrôle ou ciblant TSPAN8. Après 48h les cellules ont été ensemencées sur Matrigel™ en chambre de Boyden et incubées 48h. Les valeurs présentées sont issues d'une seule expérience et représentent le nombre de cellules invasives comptées.

3.4 : L'inhibition de l'expression de β-caténine et de LEF1 n'influe pas l'évolution du nombre de cellules en culture sur 96h

Comme le nombre de cellules invasives comptées en chambre de Boyden dépend directement du nombre de cellules dans la chambre supérieure, nous avons voulu nous assurer que l'évolution du nombre de cellules en culture n'est pas influencée significativement par l'inhibition de β-caténine et de LEF1 par siARN. En comptant les cellules transfectées après 48h, 72h et 96h, nous avons pu montrer que ces inhibitions de β-caténine et de LEF1 n'ont pas d'effet sur l'évolution du nombre de cellules T1C3 en culture (**Figure 33**). Cela suggère que les expériences d'invasion réalisées en chambre de Boyden n'ont pas été biaisées par une évolution différente du nombre de cellules durant la durée du test d'invasion.

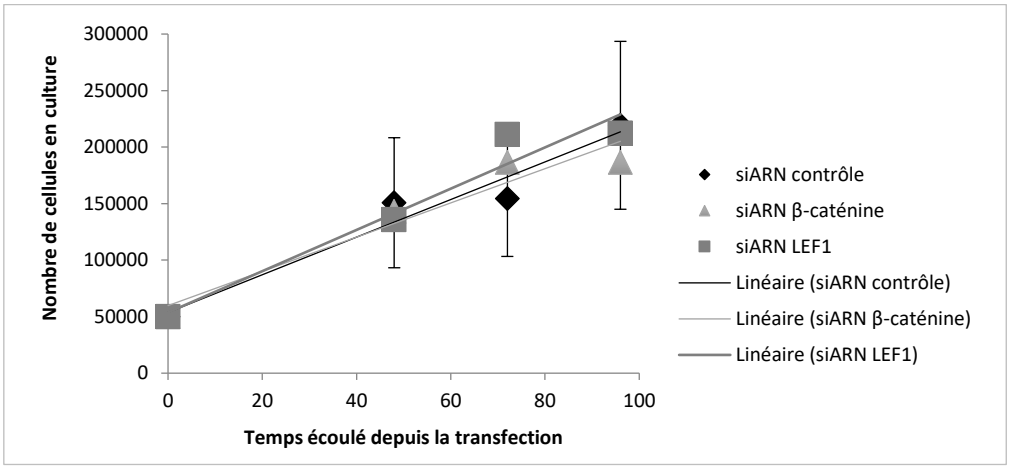


Figure 33 : L'évolution du nombre de cellules T1C3 en culture n'est pas influencée par l'inhibition de β-caténine et de LEF1.
Les cellules ont été comptées 48h, 72h, et 96h après transfection avec 10nM de siARN contrôle, ou dirigé contre β-caténine ou LEF1. Les valeurs présentées sont les moyennes et les erreurs types de 3 répétitions indépendantes de l'expérience. Par souci de lisibilité, seuls les erreurs types de la condition contrôle sont représentées, mais les erreurs types des autres conditions sont du même ordre de grandeur.

3.5 : L'inhibition de p53 favorise l'expression de β-caténine

Nous avions précédemment montré que p53 régule négativement l'expression de TSPAN8 et nous avons montré également que β-caténine régule positivement TSPAN8. Or, il est démontré dans plusieurs travaux que p53 régule négativement la signalisation de β-caténine en favorisant sa dégradation (Sadot et al., 2001), notamment en activant GSK3β (Levina et al., 2004; Watcharasit et al., 2002). De plus, bien que dans leur étude de 2001, Sadot et al. ont montré que p53 doit être transcriptionnellement actif pour inhiber β-caténine, à notre connaissance aucune étude ne montrait que la régulation de β-caténine par p53 s'opère au niveau transcriptionnel.

Nous avons donc voulu vérifier si dans nos cellules de mélanome, p53 ne régulerait pas également la transcription de β-caténine. Nous avons donc mesuré l'expression de β-caténine après inhibition par siARN de l'expression de p53 dans les IC8 non-invasives et dans les T1C3 invasives. À 24h comme à 48h après transfection, l'inhibition de p53 mène à une hausse d'expression de l'ARNm β-caténine dans les cellules IC8 non-invasives (**Figure 34 A)**. Dans les IC8 (**Figure 34 B)** comme dans les T1C3 (**Figure 34 C)**, 72h après transfection, l'inhibition de p53 favorise l'expression protéique de β-caténine. Dans nos cellules de mélanome, p53 inhibe donc l'expression transcriptionnelle et protéique de β-caténine.

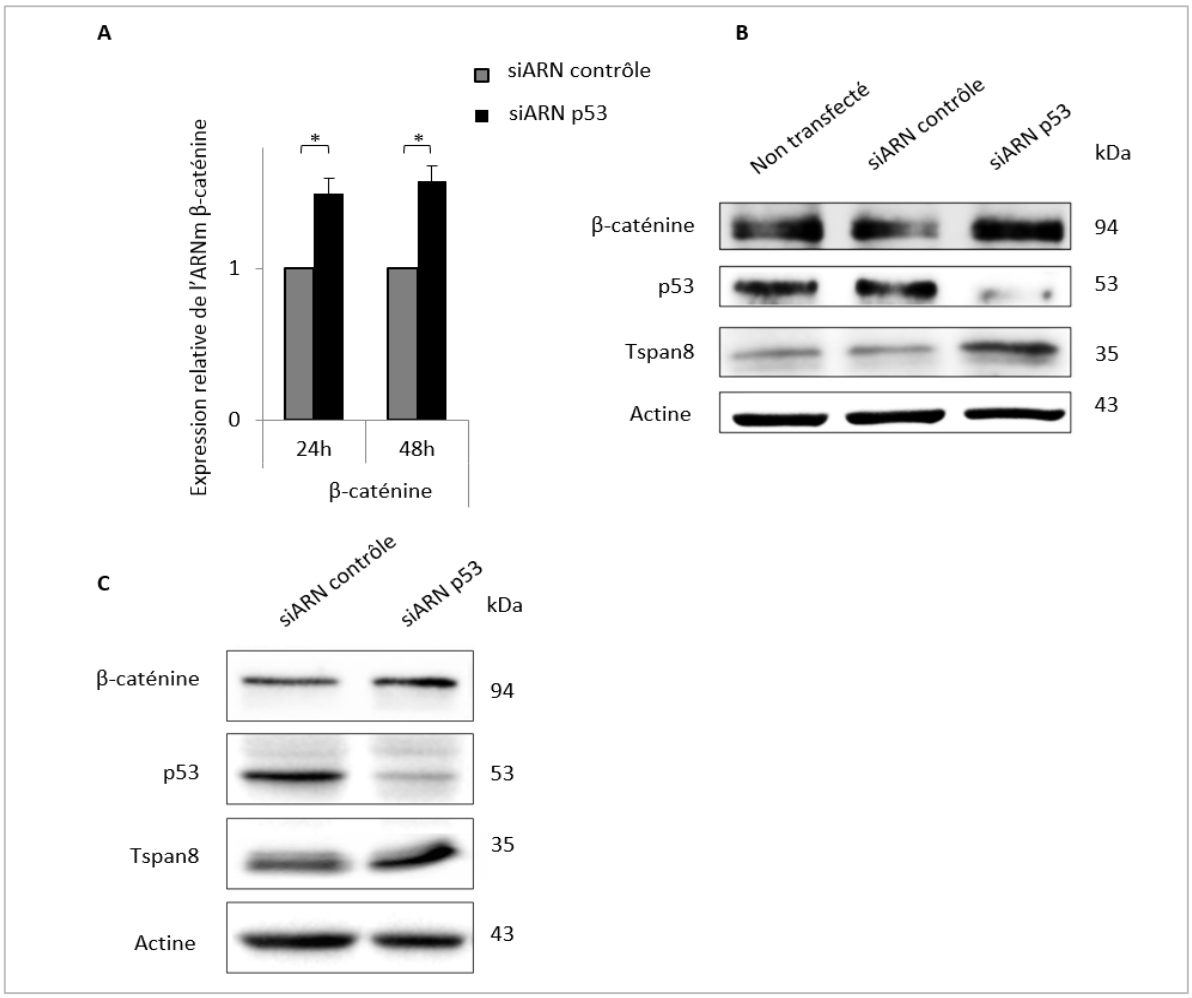


Figure 34 : L'inhibition de p53 par siARN favorise l'expression transcriptionnelle et protéique de β-caténine.

Les IC8 (**A** et **B**) et les T1C3 (**C**) ont été transfectées avec 20nM de siARN contrôle ou dirigé contre p53. (**A)** Après 24h et 48h, l'expression transcriptionnelle de β-caténine a été mesurée par RT-qPCR. (**B** et **C**) Après 72h, l'expression protéique de β-caténine a été évaluée par western blot. Les moyennes et écarts types présentés ici ont été calculés sur des triplicatas biologiques et les Western Blots sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. * p<0,5.

4 : Conclusion

Dans cette dernière partie, nous avons démontré que β-caténine est recrutée sur le promoteur de TSPAN8 et favorise son activité transcriptionnelle. D'un point de vue phénotypique, cela se traduit par une augmentation du potentiel invasif des cellules T1C3 *in vitro*, alors que cela ne semble pas avoir d'impact sur la survie et la prolifération des cellules, bien que des expériences de marquage de l'AnnexinV et de BrdU en FACS seraient nécessaires pour confirmer cela. De plus, nous montrons pour la première fois que p53 inhibe l'expression transcriptionnelle de β-caténine. Ceci est d'autant plus intéressant que nous avons montré précédemment que p53 inhibe également l'expression de TSPAN8.

Le rôle de β-caténine dans le mélanome est contrasté, mais nous montrons à l'instar de Sinnberg et al. en 2011 que la signalisation β-caténine favorise l'invasion des cellules de mélanome humain, et nous montrons de plus que cela dépend probablement de l'expression de TSPAN8, bien qu'il faudrait reproduire cette expérience préliminaire d'épistasie afin de pouvoir prouver que cela est statistiquement significatif.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le mélanome est le cancer de la peau le plus meurtrier en raison de son fort potentiel métastatique et de sa résistance aux thérapies conventionnelles. Il résulte de la transformation maligne des mélanocytes qui commence par proliférer dans l'épiderme, puis acquièrent la capacité d'envahir le derme et de disséminer à distance. Malgré de nombreuses campagnes de prévention, l'incidence du mélanome ne cesse d'augmenter. Pour les formes métastatiques, le taux de survie des patients n'atteint que 10 à 20%. Bien que de nouvelles thérapies ciblées telles que les inhibiteurs de BRAF dont le Vemurafenib (PLX4032) apportent un bénéfice significatif de survie globale, la plupart des patients développent des mécanismes de résistance en quelques mois et rechutent (Millet et al., 2016).

Le franchissement de la jonction dermo-épidermique (JDE) par les cellules de mélanome est la toute première étape qui conditionne le risque de métastases. Aussi, il est indispensable de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'invasion précoce du mélanome afin de pouvoir identifier des biomarqueurs présentant un intérêt diagnostic, pronostic et thérapeutique.

Les travaux antérieurs de l'équipe, basés sur un modèle cellulaire qui mime la transition RGP-VGP, ont permis de montrer que l'expression de TSPAN8 confère *in vitro* un fort potentiel invasif aux cellules de mélanome (Berthier-Vergnes et al., 2011) qui sont alors capables de franchir la JDE et d'envahir le derme en peau humaine reconstruite (El Kharbili et al., en préparation). *In situ*, l'expression de TSPAN8 n'est pas observée dans la peau saine ni dans les nævi, mais elle est fortement exprimée dans les tumeurs primaires et les métastases de mélanomes (Berthier-Vergnes et al., 2011).

TSPAN8 appartient à la famille des protéines transmembranaires tétraspanines, dont certaines agissent comme suppresseurs et d'autres comme promoteurs de métastases. Actuellement, les études qui portent sur les tétraspanines visent principalement à identifier leurs partenaires au sein des réseaux tétraspanine et les voies de signalisation qui se situent en aval, mais leur régulation transcriptionnelle est très peu est documentée. *In situ,* la surexpression de TSPAN8 est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux carcinomes et les données expérimentales montrent que TSPAN8 joue un rôle pro-métastatique et pro-angiogénique dans ces cancers. Cependant, son mode d'action et la régulation de son expression dans le mélanome ne sont pas documentés.

Puisque l'expression de TSPAN8 *in situ* dans la peau apparait avec le mélanome et suffit *in vitro* à conférer un potentiel invasif aux cellules de mélanome (Berthier-Vergnes et al., 2011, El Kharbili et al., en préparation), nous avons souhaité identifier les régulateurs de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8. Nous avons choisi de réaliser un criblage haut débit des gènes qui régulent l'activité transcriptionnelle du promoteur de TSPAN8 dans nos cellules de mélanome invasives. Nous avons ainsi testé 150 gènes humains connus pour leur implication dans les processus métastatiques et identifié pour la première fois 6 régulateurs de l'expression endogène de TSPAN8, dont 2 sont des répresseurs (PTEN et IQGAP1) et 4 sont des activateurs (LCMR1, TPT1, BCAR1 et ACTN1).

Au cours de ma thèse, nous avons focalisé nos travaux sur l'impact fonctionnel de la régulation de l'expression de TSPAN8 par l'un d'entre eux : LCMR1, mais également par p53 et par β-caténine pour lesquels nous avons identifié des sites de régulation dans le promoteur de TSPAN8 par analyse *in silico.* Nous avons montré que : (**1**) Ces 3 acteurs régulent l'invasion dépendante de TSPAN8 dans le mélanome ; (**2**) La régulation de l'expression de TSPAN8 par p53 et par β-caténine dépend de leur fixation sur le promoteur de TSPAN8 ; (**3**) *In situ* chez les patients, le niveau d'expression de LCMR1 corrèle avec celui de TSPAN8 ; (**4**) *In vitro* le Vemurafenib inhibe l'expression de ces deux gènes dans les cellules de mélanome invasives ; (**5**) *In vivo* l'expression de TSPAN8 est responsable d'une plus forte tumorigénicité des cellules de mélanomes lors de xénogreffes chez la souris.

Après avoir fait le point des résultats obtenus pour chacun de ces régulateurs, nous proposerons un modèle de la régulation de l'invasion dépendante de TSPAN8 dans le mélanome cutané.

1 : LCMR1 favorise l'invasion TSPAN8-dépendante dans le mélanome

Au cours du criblage, nous avons identifié LCMR1 (Lung Cancer Metasasis Related protein 1) - un membre du Complexe Mediator également connu sous le nom de MED19 - comme un régulateur positif de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8.

Quelques travaux montrent que l'expression de LCMR1 joue un rôle pro-tumoral dans les cellules de carcinomes de poumon (Xu et al., 2012), de côlon (Ji-Fu et al., 2012), de l'estomac (Ding et al., 2012), du foie (Zou et al., 2011), de l'ovaire (Liu et al., 2012b), du pancréas (Li et al., 2011b), du sein (Li et al., 2011a), de la prostate (Cui et al., 2011), de la vessie (Wen et al., 2013; Zhang et al., 2012), de la langue (Zhu et al., 2013), et dans l'ostéosarcome (Wang et al., 2011; Yu et al., 2014). Dans les carcinomes, LCMR1 favorise la prolifération et la survie : son inhibition induit l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et inhibe la croissance tumorale *in vivo* chez la souris nude. Enfin, LCMR1 a été identifié comme un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du poumon (Chen et al., 2011). Cependant, le rôle fonctionnel de LCMR1 n'est pas clairement établi et aucune de ses cibles n'avait été identifiée.

À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir identifié une cible fonctionnelle de LCMR1 : TSPAN8, et à avoir montré que l'expression de LCMR1 joue un rôle dans le mélanome cutané. En effet, nous avons montré *in vitro* que l'expression de LCMR1 dans les cellules de mélanome inhibe l'adhérence au collagène IV et favorise l'invasion du Matrigel™ en induisant l'expression de TSPAN8.

Cette régulation de TSPAN8 par LCMR1 est pertinente puisque *in situ* chez les patients les expressions de ces 2 protéines sont corrélées, avec de fortes expressions de TSPAN8 et de LCMR1 dans les tumeurs primaires, par opposition aux nævi qui sont faiblement marqués en IHC. Cette corrélation positive a été confirmée au niveau transcriptionnelle puisque *in situ,* une faible expression des ARNm TSPAN8 et LCMR1 est observée dans les nævi, alors que dans les métastases cutanées et lymphatiques, une expression modérée de LCMR1 est associée à une expression modérée de TSPAN8, et une forte expression de LCMR1 est associée à une expression forte ou très forte de TSPAN8.

De façon étonnante, nous montrons dans nos cellules de mélanome que LCMR1 ne semble pas réguler la prolifération ou la survie contrairement à ce qui est montré dans les carcinomes. Ainsi, cela suggère que dans le mélanome LCMR1 régule uniquement l'adhérence et l'invasion, alors que dans les carcinomes, LCMR1 régule le cycle cellulaire et la survie, ainsi que l'invasion tel que cela a été montré en chambre de Boyden par Sun et al. en 2011.

Ceci est d'autant plus intéressant que le traitement des cellules avec un inhibiteur de $BRAF^{V600E}$ utilisé en thérapie ciblée chez les patients, le Vemurafenib (PLX4032), induit une diminution de l'expression de LCMR1 et de TSPAN8 *in vitro*. De plus, l'inhibition de l'expression de ces 2 protéines par siARN avant le traitement des cellules par le PLX4032 *in vitro* diminue le nombre de cellules vivantes résistantes au traitement. Cela suggère que ces protéines pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles en aval de la voie BRAF qui est très fréquemment impliquée dans le développement du mélanome.

2 : p53 inhibe l'invasion TSPAN8-dépendante dans le mélanome

Nous avons montré que dans le mélanome, p53 est un régulateur négatif direct de l'activité transcriptionnelle du promoteur de TSPAN8 et de l'invasion dépendante de l'expression de TSPAN8.

Dans le mélanome le gène TP53 est rarement muté (pour revue, Chin, 2003), ce qui explique que l'étude du rôle de p53 a longtemps été délaissé dans ce cancer. Cependant, des travaux montrent que l'activité de régulateur transcriptionnel de p53 est souvent perdue dans des cellules de mélanome qui expriment fortement une forme sauvage de p53 (Houben et al., 2011).

Dans le mélanome, p53 peut être inhibé par différents mécanismes tels que la mutation/délétion de CDKN2A (observée dans 40% des mélanomes) (Curtin et al., 2005), ou la surexpression de ses inhibiteurs MDM4 (observée dans 65% des mélanomes) (Gembarska et al., 2012) et MDM2 (notamment en réponse à la diminution de l'expression de miR-18b) (Dar et al., 2013), ou encore par la surexpression de l'onco- miR 3151 stimulée par $BRAF^{V600E}$ (Lankenau et al., 2015).

En effet, l'expression de miR-18b est plus faible dans les mélanomes que dans les nævi et les patients atteints de mélanomes exprimant miR-18b ont un meilleur pronostic vital. De plus, l'expression de miR-18b est réprimée par hyperméthylation dans les lignées de mélanome et sa surexpression ectopique favorise l'activité de p53 en inhibant l'expression de MDM2, ce qui inhibe la prolifération, la migration et l'invasion des cellules, et semble également « réverser » l'EMT (Dar et al., 2013). Par ailleurs, chez les patients atteints de mélanome $BRAF^{V600E}$, il a été rapporté une plus forte expression de de l'onco- miR 3151 qui corrèle avec une perte d'expression de p53 *in situ* (Lankenau et al., 2015). *In vitro,* ces auteurs montrent que l'activité de $BRAF^{V600E}$ favorise l'expression de l'onco- miR 3151 qui est responsable de l'inhibition de l'expression de p53.

L'inhibition de l'activité transcriptionnelle de p53 pourrait être la conséquence de la surexpression d'isoformes courtes des gènes p53, p63 ou p73. Ces isoformes « ΔN » ne possèdent pas le domaine N-terminal qui permet la transactivation, et sont connues pour exercer un effet dominant négatif sur les isoformes longues TA (TransActivating). En effet, elle reconnaissent les sites de fixations ERp53 des gènes cibles sans pouvoir en induire l'expression (pour revue, Murray-Zmijewski et al., 2006). Soutenant cette hypothèse, l'expression de ΔNp73 dans le mélanome favorise la chimiorésistance (Thangasamy et al., 2010), l'EMT et la dissémination métastatique *in vivo ;* et *in situ* chez les patients, ΔNp73 est plus fortement exprimé dans les métastases que dans les tumeurs primaires, dans lesquelles l'expression de ΔNp73 est positivement corrélée à l'indice de Breslow (Steder et al., 2013).

p53 n'est pas muté dans nos cellules de mélanome invasives et non-invasives (les clones T1C3 et IC8), (résultat obtenu en collaboration avec Qing Wang, CRCL Lyon) et nous montrons ici que ses niveaux d'expression sont similaires entre ces deux clones. De plus, dans nos expériences, l'inhibition de p53 mène systématiquement à une surexpression de TSPAN8 et à une surprolifération des cellules. Ces deux effets semblent légèrement plus prononcés dans les cellules non-invasives que dans les invasives, ce qui montre que p53 possède une activité transcriptionnelle dans ces 2 clones, et suggère que cette activité transcriptionnelle est diminuée dans les cellules invasives. Il serait intéressant de pouvoir vérifier cette hypothèse en utilisant une construction rapportice de l'activité transcriptionnelle de p53 (PathDetect®, utilisé et décrit par Houben et al. en 2011). Nous pourrions également comparer la réponse des cellules à la stabilisation de p53 par inhibition de MDM2 par la nutlin3 ; ou encore mesurer la réponse des cellules aux dommages à l'ADN induit par un agent tel que la Doxorubicine, puisque p53 est un acteur majeur dans l'induction et le contrôle de ces mécanismes de réparation de l'ADN et de l'induction de l'apoptose en réponse aux stress cellulaires.

Nous montrons que l'inhibition de p53 par siARN dans les cellules invasives comme dans les non-invasives induit une augmentation du nombre de cellules en culture (**Figure 37**, annexe 1). Bien que ces résultats viennent contredire ce qui avait été décrit précédemment lors du knock-out de p53 dans des cellules de mélanome humain (Avery-Kiejda et al., 2011), ils sont en revanche en accord avec d'autres résultats qui montrent que la suractivation de p53 limite la progression des mélanomes en inhibant leur prolifération (Terzian et al., 2010). Il faudrait pouvoir mesurer en FACS l'incorporation de BrdU dans ces cellules afin de savoir à quoi est due cette différence (prolifération, inhibition de l'apoptose…). Toutefois, cette « surprolifération » n'est probablement pas dépendante de TSPAN8 car son expression n'affecte pas ce phénotype *in vitro* (Berthier-Vergnes et al., 2011).

Nous montrons également que l'inhibition de l'expression de TSPAN8 par p53 réprime le potentiel invasif des cellules de mélanome *in vitro.* Pour diminuer l'influence de la surprolifération induite par l'inhibition de p53 dans les cellules, ces expériences ont été réalisées sur des temps suffisamment courts. De plus, les tests d'épistasie en chambre de Boyden montrent que l'inhibition concomitante de TSPAN8 et de p53 n'induit pas d'augmentation de l'invasion par rapport à l'inhibition de TSPAN8 seule. Ceci montre que l'inhibition de p53 dépend de l'expression de TSPAN8 pour induire une augmentation de l'invasion. Cela suggère donc que les résultats obtenus avec ces tests d'invasion ne sont pas significativement biaisés par la surprolifération induite par l'inhibition de p53.

Dans ce contexte, il est tentant de faire l'hypothèse que la perte d'activité de p53 lors de la progression du mélanome permet la prolifération et la survie des cellules, et qu'elle permet également l'apparition de l'expression de TSPAN8, responsable de l'acquisition du potentiel invasif. Ceci concorde avec différents travaux qui montrent que l'invasion des cellules de mélanome est favorisée lors de l'inhibition de p53 par une forme dominante négative (Gadea et al., 2007), ou par une isoforme courte de p53 (Roth et al., 2016), ou par la surexpression de MDM2 (Dar et al., 2013).

Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant lors de prochains travaux de pouvoir chercher si il existe une corrélation entre les niveaux d'expression de TSPAN8 et les niveaux d'expression des différentes isoformes de p53, p63 et p73, et de leurs régulateurs MDM2 et MDM4, dans les nævi, les tumeurs primaires et les métastases de mélanome.

Cette inhibition par p53 de l'invasion TSPAN8-dépendante pourrait avoir des applications cliniques pour le traitement du mélanome. En effet, des études récentes s'intéressent à l'utilisation de thérapies ciblant p53 pour traiter le mélanome. Ainsi, le Dimethylfumarate - une drogue utilisée pour traiter diverses pathologies chez l'homme (pour revue, Al-Jaderi et Maghazachi, 2016) - favorise l'apoptose des cellules de mélanome en stimulant l'activité de p53 (Kaluzki et al., 2016), et inhibe également la croissance tumorale et le développement de métastases lors de xénogreffes chez la souris SCID (Loewe et al., 2006), probablement via l'inhibition de l'interaction des cellules de mélanome avec les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques (Kaluzki et al., 2016). Enfin, la réactivation de p53 par PRIMA-1^{MET} permet de sensibiliser les cellules de mélanome au traitement par le Vemurafenib (Krayem et al., 2016).

Puisque le Vemurafenib inhibe l'expression de LCMR1 et de TSPAN8 dans nos cellules de mélanome, il serait intéressant de combiner un traitement de réexpression ou d'activation de p53 en association avec l'inhibition de BRAF afin de déterminer si cela permet d'inhiber plus efficacement l'invasion dépendante de TSPAN8 par les cellules de mélanome.

3 : β-caténine favorise l'invasion TSPAN8-dépendante dans le mélanome

L'implication de β-caténine dans la physiopathologie du mélanome est bien documentée, dans des modèles murins, comme dans des modèles de cultures de cellules humaines de mélanome. Tel que nous l'avons vu dans l'introduction, le rôle de β-caténine dans le mélanome humain est très contrasté selon le contexte génétique et les modèles utilisés.

Nos expériences montrent que β-caténine est recrutée sur le promoteur de TSPAN8 et favorise son expression. En effet, la surexpression de β-caténine permet de faire apparaitre l'expression de TSPAN8 dans les cellules non-invasives qui ne l'expriment pas normalement, alors que l'inhibition de β-caténine et de son partenaire LEF1 dans les cellules invasives réduit le niveau d'expression de TSPAN8. Cette régulation se répercute *in vitro* sur le potentiel invasif des cellules de mélanome sur Matrigel™. En effet, l'inhibition de l'expression de β-caténine et de son partenaire LEF1 dans les cellules invasives diminue leur potentiel invasif. De plus, une première expérience d'épistasie montre que l'augmentation de l'invasion induite par la surexpression de β-caténine dans ces cellules dépend de l'expression de TSPAN8. Il serait intéressant à l'avenir de tester si l'augmentation de l'expression de TSPAN8 induite lors de la surexpression de β-caténine est suffisante pour favoriser un potentiel invasif dans les cellules non-invasives de mélanome.

Plusieurs études chez l'homme montrent que la signalisation β-caténine est associée à un bon pronostic, à une diminution de l'invasion *in vitro*, et *in vivo à* une inhibition de la formation de métastases pulmonaires lors de xénogreffes de cellules humaines de mélanome chez la souris (Arozarena et al., 2011; Bachmann et al., 2005; Gould Rothberg et al., 2009, Domingues et al., 2014).

Toutefois, nos données sont en accord avec les travaux effectués par Sinnberg et al. en 2011 sur plusieurs lignées humaines de mélanome différentes de celles utilisées par Arozarena et al. et Domingues et al.. En effet, les expériences de Sinnberg et al. montrent que la signalisation β-caténine est nécessaire à l'invasion du Matrigel™ en chambre de Boyden et à l'invasion d'un modèle de peau humaine reconstruite. De plus, l'expression de β-caténine favorise la croissance tumorale lors de xénogreffes de ces cellules chez la souris SCID et semble nécessaire à la survie des lignées cellulaires métastatiques (Sinnberg et al., 2011).

Nos données concordent également avec une seconde étude qui montre que le traitement de cellules humaines de mélanome par la Silymarine diminue fortement le niveau de β-caténine nucléaire et l'invasion du Matrigel™ en chambre de Boyden (Vaid et al., 2011). Les auteurs de cette étude ont confirmé ce rôle pro-invasif de β-caténine en obtenant des résultats similaires avec le traitement des cellules par un inhibiteur de la signalisation β-caténine, le FH535.

Ces observations d'un rôle pro-invasif de β-caténine dans le mélanome sont pertinentes pour certains patients, tel que le souligne l'étude de Chien et al. en 2014 qui montre qu'un taux élevé de β-caténine nucléaire observé **avant** un traitement au Dabrafenib (un inhibiteur de BRAF) est associé à un taux de survie plus faible chez des patients atteints de mélanome de stade IV présentant des métastases cérébrales.

Nos données sont également en accord avec les travaux effectués sur les modèles murins qui montrent que chez la souris, la signalisation β-caténine favorise le développement du mélanome et de ses métastases (Conde-Perez et al., 2015, Damsky et al., 2011, Gallagher et al., 2013).

Certains auteurs pensent que des « switchs » phénotypiques (prolifératif ⇔ invasif) accompagnent la progression du mélanome (Hoek et Goding, 2010) et que ces switchs seraient notamment le reflet de variations dans la voie de signalisation WNT/β-caténine (Eichhoff et al., 2011; Webster et al., 2015a). L'activation de la voie WNT non canonique par WNT5A serait associée à un potentiel métastatique plus élevé des cellules de mélanome et *in situ* à des tumeurs de plus haut grade (Webster et al., 2015b). Ainsi, une étude a montré dans des cellules humaines de mélanome que l'activation de la voie WNT non canonique par la fixation de WNT5A sur FZD4 active IQSEC1 (IQ motif and Sec7 domain 1) et ARF6 (Adenosine diphosphate Ribosylation Factor 6), ce qui inhibe alors l'interaction de β-caténine avec N-cadhérine. Cela libère β-caténine, augmente le niveau de signalisation par β-caténine et corrèle *in vivo* à un potentiel de dissémination métastatique plus élevé lors de xénogreffes chez la souris nude (Grossmann et al., 2013).

Puisque dans notre modèle la transition des cellules vers un phénotype invasif est la conséquence de l'apparition de l'expression de TSPAN8, il serait intéressant d'étudier l'activité des voies WNT canoniques et non-canoniques dans nos cellules afin de vérifier si cette apparition de l'expression de TSPAN8 corrèle avec un switch dans ces voies de signalisation.

4 : Bilan de l'étude fonctionnelle de la régulation de TSPAN8 par LCMR1, p53 et β-caténine :

Nous avons montré que LCMR1/MED19 favorise l'expression transcriptionnelle de TSPAN8. Cette expression est également induite par β-caténine et inhibée par p53, qui sont tous deux recrutés sur le promoteur de TSPAN8. Ces régulations se traduisent *in vitro* par une modulation du phénotype invasif des cellules de mélanome. De plus, nous montrons que p53 régule l'expression transcriptionnelle de β-caténine, alors que seule une régulation de sa stabilité était démontrée auparavant (Sadot et al., 2001 ; Levina et al., 2004; Watcharasit et al., 2002). Enfin, nous montrons que l'inhibition de la voie MAPK BRAF/MEK/ERK par le Vemurafenib induit une diminution d'expression de LCMR1 et de TSPAN8.

Ces premiers résultats nous permettent de commencer à dresser un modèle hypothétique de la régulation de l'invasion dépendante de TSPAN8 dans le mélanome cutané (Figure 35) en accord avec les données bibliographiques existantes.

LCMR1/MED19 est une sous-unité du complexe Mediator qui régule l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase II en régulant la fixation des facteurs de transcription (pour revue, Allen et Taatjes, 2015; Plaschka et al., 2015). Le Complexe Mediator existe en différentes configurations, composées de différentes sous-unités (MEDn) qui ont chacune leurs propres affinités avec les facteurs de transcription. Cela permet d'obtenir différents profils d'expression du génome (pour revue, Allen et Taatjes, 2015).

Or on sait que p53 et β-caténine interagissent avec le complexe Mediator pour réguler la transcription. p53 régule la transcription en induisant des changements structurels dans le complexe Mediator (Meyer et al., 2010). En particulier, l'activité transcriptionnelle de p53 est favorisée par MED17, bien qu'aucune interaction directe n'ait pu être démontrée pour le moment (Kikuchi et al., 2015). De plus, l'activité transcriptionnelle du promoteur de p21 est favorisée par l'interaction de p53 avec le module CDK du complexe qui est composé de CDK8, de Cyclin C, et de MED12 (Donner et al., 2007). β-caténine interagit également avec le complexe Mediator au travers de ses cofacteurs BCL9 et Pygopus, notamment avec la sous-unité MED12 (Kim et al., 2006). Enfin, BRAF favorise l'expression de l'onco- miR 3151 qui inhibe l'expression de p53 (Lankenau et al., 2015).

En conclusion, il apparait que l'expression de TSPAN8 est en aval d'un réseau de régulation faisant intervenir LCMR1/MED19, p53, β-caténine et la voie BRAF. De plus, les données de la littérature permettent de faire l'hypothèse que ces différents acteurs interagissent également entre eux.

Lors de prochains travaux, il serait intéressant de comprendre comment l'expression de la sous-unité LCMR1/MED19 influe sur le complexe Mediator et si cela modifie les interactions du complexe avec p53 et β-caténine. Il serait également intéressant de vérifier si une interaction directe existe entre LCMR1 et p53 ou β-caténine. Enfin, il faudrait déterminer les mécanismes précis de la régulation de l'expression de TSPAN8 par LCMR1, ainsi que par le Vemurafenib et la voie BRAF.

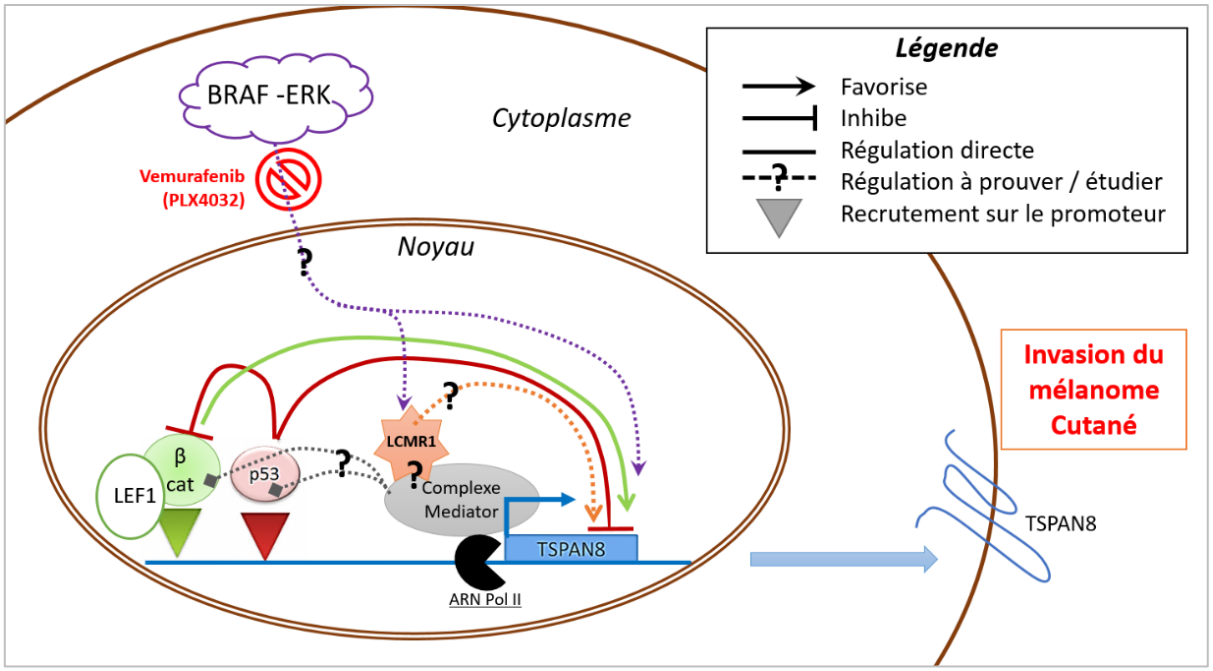


Figure 35 : Modèle de la régulation de l'invasion dépendante de TSPAN8 dans le mélanome cutané.

Chaque acteur est représenté avec un code couleur. Le nuage symbolise l'ensemble des acteurs impliqués dans la voie de signalisation BRAF. Les traits pleins représentent des régulations démontrées, alors que les traits en pointillés avec un point d'interrogation en gras symbolisent des régulations de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 dont les mécanismes moléculaires ne sont pas encore élucidés. L'effet du traitement au Vemurafenib est symbolisé par un signe « interdit » rouge. Les triangles représentent le recrutement de p53 et β-caténine sur le promoteur de TSPAN8.

5 : Les autres régulateurs identifiés par le crible

Pour PTEN, IQGAP1, TPT1, BCAR1 et ACTN1, il reste à étudier les mécanismes moléculaires qui leur permettent de réguler la transcription de TSPAN8, et également à vérifier que ces régulateurs affectent les phénotypes d'adhérence et d'invasion dépendants de TSPAN8. Il serait également intéressant de pouvoir poursuivre le crible des régulateurs transcriptionnels de TSPAN8 en criblant tout le génome afin de pouvoir identifier les voies de signalisation impliquées dans la régulation transcriptionnelle de TSPAN8.

Pour deux de ces régulateurs, PTEN et IQGAP1, bien que nous n'ayons pas étudié leur implication dans la régulation du potentiel d'invasion, les données bibliographiques sont particulièrement intéressantes au regard du modèle de régulation de l'expression de TSPAN8 proposé précédemment.

5.1 : PTEN inhibe l'expression transcriptionnelle de TSPAN8

Nous montrons que PTEN régule négativement l'expression transcriptionnelle de TSPAN8. Cela semble cohérent puisque la perte de PTEN est impliquée dans la mélanogenèse, mais également parce que PTEN favorise la stabilisation et l'activité de p53, et inhibe la stabilisation de β-caténine.

Un tiers des mélanomes présente une perte d'hétérozygotie de PTEN, un inhibiteur majeur de la voie PI3K/AKT qui est activée par NRAS et par les récepteur RTK. La suractivation de cette voie est impliquée dans la progression tumorale de divers cancers, et dans le mélanome elle favorise entre autres la prolifération et l'invasion, tel que nous l'avons vu dans l'introduction.

PTEN est essentiel pour la stabilisation de la protéine p53. En effet, le double KO $PTEN^{-/-}$ dans des cellules embryonnaires de souris conduit à une perte drastique de l'expression protéique de p53, alors que les niveaux d'ARNm de p53 restent inchangés. Cette observation a été confirmée dans des tissus de cerveaux de souris PTEN WT, $PTEN^{+/-}$, $PTEN^{-/-}$ (Freeman et al., 2003). Dans cette étude, les auteurs montrent que cette stabilisation de p53 par PTEN n'est pas dépendante de l'activité de phosphatase de PTEN (donc du niveau d'activation de AKT). De plus, PTEN interagit avec p53 dans le noyau ce qui le stabilise et augmente sa demi-vie en favorisant son acétylation par p300/CBP (Li et al., 2006a). Cela favorise également le recrutement de p53 sur l'ADN. Ces travaux sont corroborés par ceux de Chang et al. en 2008 qui montrent que l'association de PTEN et de p53 dans le noyau joue un rôle crucial dans la réponse au stress oxydatif, tant pour l'induction de l'apoptose, que pour la diminution du niveau de ROS (Reactive Oxygen Species).

PTEN inhibe AKT, ce qui favorise l'activité de GSK3β (Hajduch et al., 1998; Pap et Cooper, 1998) et favorise ainsi la dégradation de β-caténine par GSK3β. À ce titre, il a été montré dans plusieurs lignées, dont une lignée de mélanome murin, que cette régulation de GSK3β par AKT est nécessaire à l'inhibition de l'expression de Cycline D2 par PTEN. En effet, l'activité de PTEN inhibe ainsi la signalisation β-caténine/TCF4 qui favorise, avec CREB, l'expression de Cycline D2 impliquée dans le cycle cellulaire (Huang et al., 2007).

Puisque nous démontrons que l'expression de TSPAN8 est directement régulée, négativement par p53, et positivement par β-caténine, il serait judicieux de pouvoir identifier les mécanismes qui permettent à PTEN d'inhiber l'expression de TSPAN8, en particulier d'étudier si cette régulation dépend - au moins en partie - de p53 ou de β-caténine.

5.2 : IQGAP1 inhibe l'expression transcriptionnelle TSPAN8

IQGAP1 (IQ motif–containing GTPase Activating Protein 1) est une protéine d'échafaudage qui régule divers processus dans la cellule. Elle a également un rôle oncogène dans plusieurs cancers dont le mélanome (pour revue, White et al., 2009). En particulier, IQGAP1 régule l'activité de plusieurs voies de signalisation parmi lesquelles on retrouve les MAPK, (IQGAP1 favorise l'interaction de ERK1/2 avec BRAF) ; et la voie WNT/β-caténine (par interaction directe avec β-caténine mais également par interaction avec E-cadhérine) (pour revue, Johnson et al., 2009). Enfin, IQGAP1 peut se localiser dans le noyau, entre autres pour favoriser le cycle cellulaire (Johnson et al., 2011), bien que le rôle nucléaire de IQGAP1 reste à étudier.

IQGAP1 favorise la phosphorylation d'ERK, la croissance tumorale, la viabilité et la migration des cellules de diverses lignées de mélanomes qui surexpriment l'EGFR, ou qui présentent une mutation de KRAS, NRAS ou de BRAF. De plus, l'inhibition d'IQGAP1 inhibe la croissance de cellules de mélanome résistantes au Vemurafenib (Jameson et al., 2013). Ceci suggère qu'un traitement d'inhibition d'IQGAP1 pourrait contrecarrer la résistance aux traitements d'inhibition des MAPK. Curieusement, cet effet n'est pas retrouvé dans les lignées de mélanome qui ne présentent pas d'altération de la voie EGFR/MAPK (Jameson et al., 2013).

La fixation de β-caténine par IQGAP1 diminue l'interaction entre β-caténine et ses partenaires membranaires E-cadhérine et α-caténine ce qui permet la dissociation de l'adhérence cellule-cellule dépendante d'E-cadhérine (pour revue, Johnson et al., 2009). Ainsi, dans des cellules de mélanome murin B16F10, il a été récemment montré que la présence d'IQGAP1 au niveau des sites de rétractation de la membrane cellulaire est associée à la diminution de l'adhérence de ces sites, ce qui permet la migration cellulaire (Foroutannejad et al., 2014). IQGAP1 favorise également l'importation de β-caténine dans le noyau par l'importine-β5 (Goto et al., 2013).

Ainsi, au regard de l'ensemble de ces fonctions, il semble étonnant que l'inhibition d'IQGAP1 par siARN favorise l'expression de TSPAN8. En effet, l'expression de TSPAN8 est favorisée par β-caténine et probablement aussi par la voie BRAF, 2 voies qui sont favorisées par IQGAP1. De plus, tout comme IQGAP1, TSPAN8 inhibe l'adhérence.

Cependant, du fait de son rôle de protéine d'échafaudage, les fortes surexpressions, tout comme les inhibitions d'IQGAP1, peuvent donner des effets similaires, notamment sur l'activation de MEK et ERK (Roy et al., 2004, 2005). En effet, la forte surexpression d'une protéine d'échafaudage peut induire un « effet dominant négatif » du fait de la séquestration des protéines cibles qui ne peuvent alors plus librement interagir avec leurs partenaires. Cela pourrait expliquer que la surexpression d'une protéine d'échafaudage puisse induire un effet similaire à l'effet son inhibition, de façon analogue à ce qui est connu sous le nom « d'effet prozone » dans les réactions anticorps-antigène (discuté dans Ferrell, 2000).

Pour le moment nous n'avons étudié que l'effet de l'inhibition d'IQGAP1 par siARN. Il faudrait donc pouvoir approfondir l'étude de la fonction d'IQGAP1 dans nos cellules afin de vérifier si sa surexpression a un effet cohérent avec l'effet de son inhibition sur la régulation de l'expression de TSPAN8, ou bien si un effet « prozone-like » affecte IQGAP1 dans nos cellules de mélanome.

6 : Modèle hypothétique de la régulation de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8 par LCMR1, p53, β-caténine, PTEN, IQGAP1 et la voie BRAF

Les données bibliographiques ainsi que les expériences réalisées au cours de ces travaux de thèse permettent de dessiner un modèle hypothétique de la régulation transcriptionnelle de TSPAN8 qui se base sur le modèle proposé précédemment en incluant PTEN et IQGAP1 (Figure 36).

Il est intéressant de constater que les différents acteurs semblent fortement interconnectés :

Nous venons de voir que :

- L'expression de TSPAN8 est favorisée par LCMR1/MED19, par la voie BRAF et par β-caténine, mais inhibée par p53.
- p53 et β-caténine interagissent avec le complexe Mediator dont fait partie LCMR1/MED19
- p53 inhibe l'expression et l'activité de β-caténine.
- PTEN inhibe l'activité de β-caténine tout en favorisant celle de p53, et inhibe également l'expression de TSPAN8.
- IQGAP1 favorise la stabilisation et la localisation nucléaire de β-caténine, l'activité de la voie BRAF, et régule également l'expression de TSPAN8.

De plus, il est important de noter que la voie BRAF inhibe GSK3β. En effet, ERK est connu pour interagir directement avec le domaine ^{291}FKFP de GSK3β et promouvoir sa phosphorylation en Ser9, ce qui inactive GSK3β et favorise la stabilisation β-caténine (Ding et al., 2005). GSK3β est également connu pour favoriser l'expression de p53 (Zhang et al., 2013), mais aussi pour se fixer sur p53 et promouvoir son activité (Watcharasit et al., 2002, 2003) via son acétylation en Lys373 et Lys382 (Eom et Jope, 2009) et sa phosphorylation en Ser33 (Turenne et Price, 2001).

Ainsi, ces données permettent d'entrevoir un réseau hypothétique de régulation transcriptionnelle de TSPAN8 dont l'expression favorise l'invasion du mélanome. Ce réseau fait intervenir plusieurs voies de signalisation connues pour leurs implications dans la physiopathologie du mélanome (Figure 36).

La littérature montre que la transition du mélanome vers un phénotype invasif s'accompagne de transitions dans plusieurs voies de signalisation. Notamment, tel qu'évoqué plus haut, on observe des switchs entre les voies WNT/β-caténine canoniques et non-canoniques (pour revue, Webster et al., 2015a). Mais on observe également des variations dans les niveaux d'expression de MITF-M, le facteur de transcription spécifique du lignage mélanocytaire, dont l'expression est contrôlée entre-autres par les voies BRAF et WNT/β-caténine (pour revue, Wellbrock et Arozarena, 2015).

Ainsi, dans le mélanome le phénotype invasif est associé à une perte totale de l'expression de MITF et une expression de WNT5A. Comme dans nos cellules l'invasion est induite par l'apparition de l'expression de TSPAN8 qui est régulée par la voie BRAF et par β-caténine, il serait intéressant lors de prochains travaux de comparer le niveau d'activité de MITF dans nos cellules et de vérifier si ce facteur de transcription ne serait pas un régulateur de l'expression transcriptionnelle de TSPAN8.

Une autre piste de travail pourrait consister à étendre le criblage à l'ensemble du génome afin de déterminer quelles sont les grandes voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de TSPAN8 dans le mélanome.

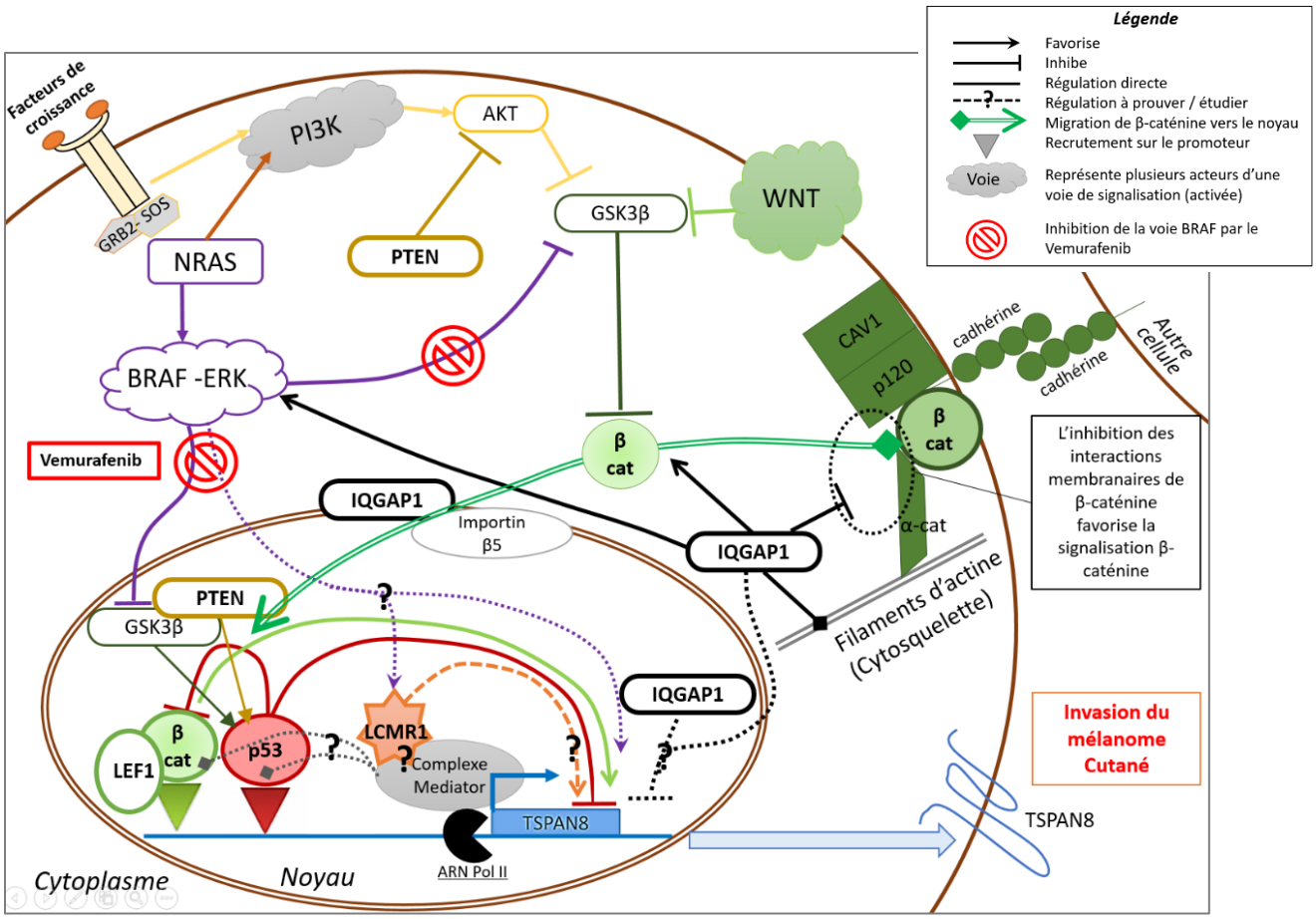


Figure 36 : Modèle hypothétique global de la régulation de l'expression de TSPAN8 lors de la progression du mélanome.

Les régulateurs dont nous avons validé l'impact sur l'expression transcriptionnelle endogène de TSPAN8 figurent dans des bulles aux contours épais et leurs noms sont écrits en gras. Chaque nuage symbolise un ensemble d'acteurs impliqués dans une même voie de signalisation. Chaque voie de signalisation est symbolisée avec un code couleur, en foncé figurent les inhibiteurs de la voie. Le vert clair symbolise les acteurs favorisant la signalisation β-caténine, alors que le vert foncé symbolise les acteurs inhibant la signalisation β-caténine : GSK3β, Cavéoline 1 (CAV1) p120 caténine (P120), α-caténine (α cat). Le double trait vert symbolise la signalisation β-caténine, et plus précisément la migration de la β-caténine de la membrane vers le noyau. Les traits pleins représentent des régulations connues entre les différents acteurs, alors que les traits en pointillés avec un point d'interrogation symbolisent des régulations à prouver, ou dont les mécanismes moléculaires ne sont pas encore élucidés. L'effet du traitement d'inhibition de la voie BRAF est représenté par un signe « interdit » rouge. Les triangles représentent le recrutement de p53 et β-caténine sur le promoteur de TSPAN8.

Certaines de ces voies font d'ores et déjà l'objet de thérapies ciblées pour traiter les patients. Or, l'utilisation d'un de ces traitements, le Vemurafenib (PLX4032), permet d'inhiber l'expression de TSPAN8 dans nos cellules de mélanome. De plus, une étude récente rapporte que les ARNm circulants de TSPAN8 constituent un biomarqueur sanguin fiable pour le pronostic et le diagnostic de patients atteints de cancer colorectal (Rodia et al., 2016). Plusieurs études suggèrent également que cibler TSPAN8 avec un anticorps dirigé contre sa large boucle extracellulaire serait une thérapie prometteuse dans le traitement des cancers du côlon et de l'ovaire (Ailane et al., 2014; Kim et al., 2015; Park et al., 2016). En effet, ces traitements par anticorps inhibent l'invasion *in vitro* et l'occurrence des métastases *in vivo* lors de xénogreffes chez la souris nude.

Aussi, au regard des résultats de l'équipe, nous pensons qu'il serait pertinent, afin de permettre une meilleure prise en charge des patients à l'avenir, de pouvoir évaluer l'intérêt de l'utilisation de TSPAN8 comme biomarqueur de diagnostic et pronostic, mais aussi comme cible thérapeutique dans le mélanome, puisque nous montrons également que l'expression de TSPAN8 favorise la tumorigénicité de cellules de mélanome humain lors de xénogreffe chez la souris nude.

CONCLUSION

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'identifier pour la première fois des régulateurs transcriptionnels de TSPAN8 et apporte une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'apparition de son expression lors de la progression du mélanome. Sur le long terme, ces résultats, ainsi que l'étude des autres gènes identifiés grâce au criblage devraient permettre de définir les réseaux de régulation transcriptionnelle qui contrôlent l'expression de TSPAN8 responsable de l'invasion précoce du mélanome cutané. TSPAN8 et certains de ses régulateurs pourraient constituer de nouveaux biomarqueurs de diagnostic, de pronostic et des cibles thérapeutiques pour lutter plus efficacement contre les formes invasives et métastatiques de mélanome. Soutenant cela, des travaux montrent l'intérêt de l'utilisation de TSPAN8 comme biomarqueur chez les patients de cancers de l'ovaire, et *in vivo* comme cible thérapeutique dans les cancers de l'ovaire et du côlon. Enfin, une meilleure compréhension de la régulation de TSPAN8 sera très certainement précieuse dans la lutte contre les autres pathologies dans lesquelles TSPAN8 est impliquée.

ANNEXES

1 : L'inhibition de p53 par siARN favorise la prolifération des cellules de mélanome T1C3 et IC8

Comme p53 est connu entre autres pour inhiber le cycle cellulaire et la prolifération, et que l'invasion des cellules en chambre de Boyden dépend du nombre de cellules présentes dans la chambre supérieure, nous avons souhaité évaluer l'effet de l'inhibition de p53 par siARN sur le nombre de cellules en culture. Sans surprise, l'inhibition de p53 favorise l'augmentation du nombre de cellules humaines de mélanome en culture (**Figure 37**).

En effet, dans les cellules invasives T1C3, nous observons systématiquement dans 3 répétitions indépendantes de l'expérience un accroissement plus prononcé du nombre de cellules en culture avec le temps. Cependant, du fait de fortes variations entre les répétitions, nos comptages révèlent une augmentation du nombre de cellules qui est significative uniquement après 48h de transfection (**Figure 37** A). En moyenne, l'inhibition de p53 induit une augmentation du nombre de T1C3 de 22%, 83% et 63% à 48h, 72h, et 96h respectivement.

Pour les cellules non-invasives IC8, les variations entre les répétitions de l'expérience étaient bien plus faibles et les comptages montrent un accroissement significatif systématique du nombre de cellules en culture 48h, 72h et 96h après transfection (**Figure 37** B). En moyenne, l'inhibition de p53 induit une augmentation du nombre d'IC8 de 45%, 43% et 80% à 48h, 72h, et 96h respectivement.

Les tests d'invasion en chambre de Boyden après inhibition de p53 ont été réalisés sur les T1C3 pendant 36h, et ils montrent en moyenne une augmentation de plus de 40% de l'invasion (voir Travaux partie II). Même si l'inhibition de p53 induit une augmentation du nombre de cellules en culture, cette augmentation dans les T1C3 n'est en moyenne que de 22% après 48h. Ainsi, même si on ne peut exclure que l'augmentation du nombre de cellules en culture a biaisé les résultats des tests d'invasion en amplifiant la différence, elle ne peut pas à elle seule expliquer l'augmentation du nombre de cellules invasives que nous observons dans ces expériences.

De plus, il faut noter que les cellules sont ensemencées dans la chambre supérieure dans un milieu sans SVF ce qui ne permet pas leur croissance. Enfin, les résultats obtenus en épistasie avec les chambres de Boyden montrent qu'en l'absence d'expression de TSPAN8, l'inhibition de p53 n'a pas d'effet sur l'invasion.

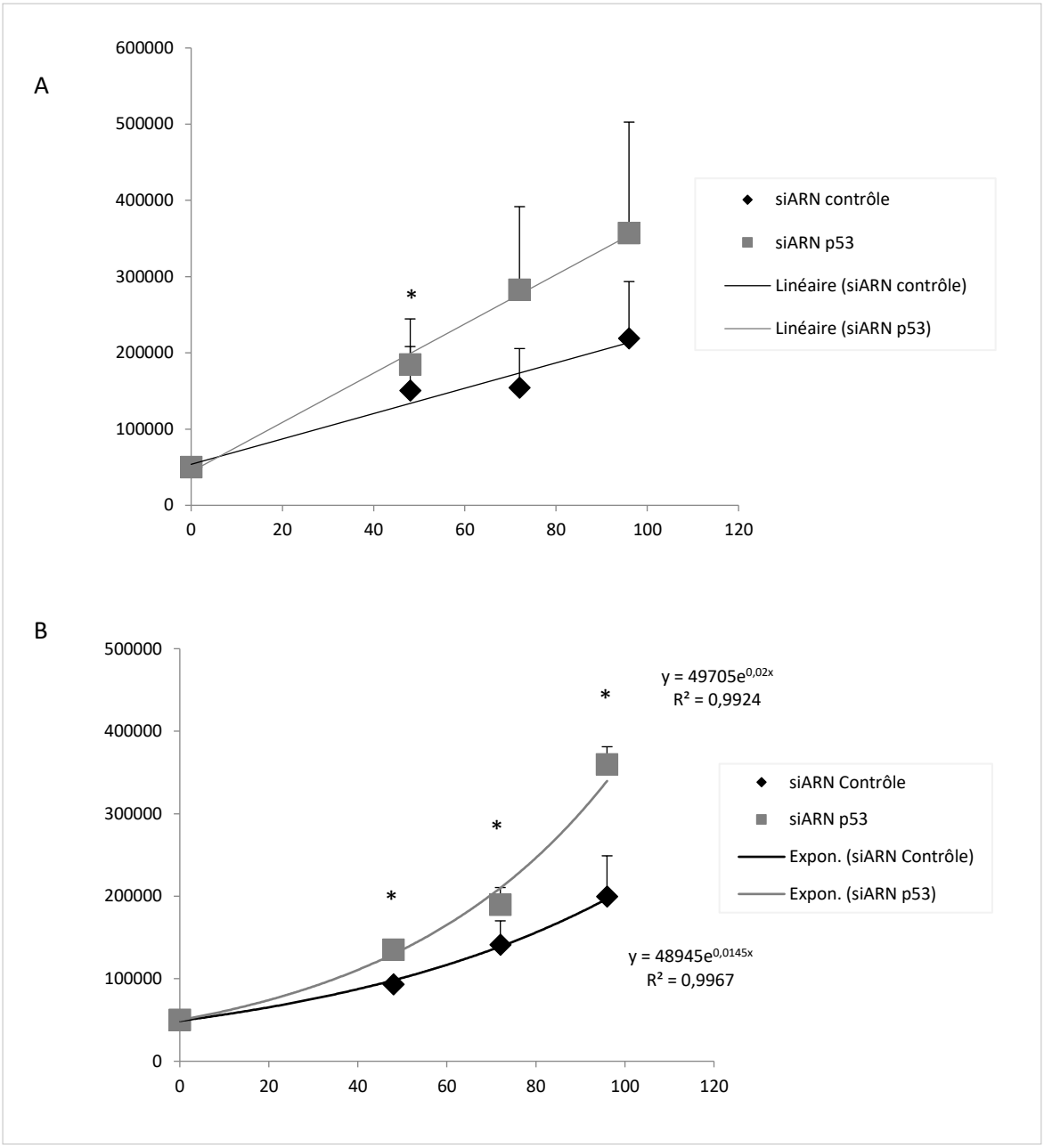


Figure 37 : L'inhibition de p53 par siARN favorise l'augmentation du nombre de cellules de mélanome en culture.

Après 48, 72 et 96 h de transfection avec 20nM de siARN dirigé contre p53, le nombre de cellules invasives T1C3 (**A**), et non-invasives IC8 (**B**), ont été comptées. Les valeurs présentées sont les moyennes et les erreurs standards obtenues à partir de 3 répétitions indépendantes. * : pvalue <0,05.

2 : Revue : Les tétraspanines dans la physiopathologie de la peau

Pour des raisons de droits d'auteurs et de copyrights, cet article de revue est disponible uniquement dans la version complète de ce manuscrit, qui est disponible auprès de la B.U. de l'université Lyon1 via l'intranet.

Cette revue est également disponible chez notre éditeur :

http://www.medecinesciences.org/fr/articles/medsci/abs/2016/03/medsci20163203p267/medsci20163203p267.html

Lien pubmed : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27011245

Référence :

Les tétraspanines dans la physiopathologie de la peau

Ingrid Masse, Gweltaz Agaësse et Odile Berthier-Vergnes

Med Sci (Paris), 32 3 (2016) 267-273

DOI: https://doi.org/10.1051/medsci/20163203011

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe, M., Sugiura, T., Takahashi, M., Ishii, K., Shimoda, M., and Shirasuna, K. (2008). A novel function of CD82/KAI-1 on E-cadherin-mediated homophilic cellular adhesion of cancer cells. Cancer Lett. *266*, 163–170.

Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., and Hoschuetzky, H. (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. J. Cell. Sci. *107 (Pt 12)*, 3655–3663.

Adameyko, I., Lallemend, F., Aquino, J.B., Pereira, J.A., Topilko, P., Müller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., et al. (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. Cell *139*, 366–379.

Ailane, N., Greco, C., Zhu, Y., Sala-Valdés, M., Billard, M., Casal, I., Bawa, O., Opolon, P., Rubinstein, E., and Boucheix, C. (2014). Effect of an anti-human Co-029/tspan8 mouse monoclonal antibody on tumor growth in a nude mouse model. Front Physiol *5*.

Aktary, Z., and Pasdar, M. (2012). Plakoglobin: role in tumorigenesis and metastasis. Int J Cell Biol *2012*, 189521.

Aktary, Z., Bertrand, J.U., and Larue, L. (2016). The WNT-less wonder: WNT-independent β-catenin signaling. Pigment Cell Melanoma Res *29*, 524–540.

Al-Jaderi, Z., and Maghazachi, A.A. (2016). Utilization of Dimethyl Fumarate and Related Molecules for Treatment of Multiple Sclerosis, Cancer, and Other Diseases. Front Immunol *7*, 278.

Allen, B.L., and Taatjes, D.J. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *16*, 155–166.

Anami, K., Oue, N., Noguchi, T., Sakamoto, N., Sentani, K., Hayashi, T., Naito, Y., Oo, H.Z., and Yasui, W. (2016). TSPAN8, identified by Escherichia coli ampicillin secretion trap, is associated with cell growth and invasion in gastric cancer. Gastric Cancer *19*, 370–380.

André, M., Le Caer, J.-P., Greco, C., Planchon, S., El Nemer, W., Boucheix, C., Rubinstein, E., Chamot-Rooke, J., and Le Naour, F. (2006). Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. Proteomics *6*, 1437–1449.

André, M., Morelle, W., Planchon, S., Milhiet, P.-E., Rubinstein, E., Mollicone, R., Chamot-Rooke, J., and Le Naour, F. (2007). Glycosylation status of the membrane protein CD9P-1. Proteomics *7*, 3880–3895.

Andreu, Z., and Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. Front Immunol *5*, 442.

Arce, L., Yokoyama, N.N., and Waterman, M.L. (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. Oncogene *25*, 7492–7504.

Archbold, H.C., Yang, Y.X., Chen, L., and Cadigan, K.M. (2012). How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/β-catenin pathway. Acta Physiol (Oxf) *204*, 74–109.

Arozarena, I., Bischof, H., Gilby, D., Belloni, B., Dummer, R., and Wellbrock, C. (2011). In melanoma, beta-catenin is a suppressor of invasion. Oncogene *30*, 4531–4543.

Atefi, M., Avramis, E., Lassen, A., Wong, D.J.L., Robert, L., Foulad, D., Cerniglia, M., Titz, B., Chodon, T., Graeber, T.G., et al. (2014). Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. Clin. Cancer Res. *20*, 3446–3457.

Atkinson, J.M., Rank, K.B., Zeng, Y., Capen, A., Yadav, V., Manro, J.R., Engler, T.A., and Chedid, M. (2015). Activating the Wnt/β-Catenin Pathway for the Treatment of Melanoma--Application of LY2090314, a Novel Selective Inhibitor of Glycogen Synthase Kinase-3. PLoS ONE *10*, e0125028.

Avery-Kiejda, K.A., Zhang, X.D., Adams, L.J., Scott, R.J., Vojtesek, B., Lane, D.P., and Hersey, P. (2008). Small molecular weight variants of p53 are expressed in human melanoma cells and are induced by the DNA-damaging agent cisplatin. Clin. Cancer Res. *14*, 1659–1668.

Avery-Kiejda, K.A., Bowden, N.A., Croft, A.J., Scurr, L.L., Kairupan, C.F., Ashton, K.A., Talseth-Palmer, B.A., Rizos, H., Zhang, X.D., Scott, R.J., et al. (2011). P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. BMC Cancer *11*, 203.

Aylon, Y., and Oren, M. (2007). Living with p53, dying of p53. Cell *130*, 597–600.

Bachmann, I.M., Straume, O., Puntervoll, H.E., Kalvenes, M.B., and Akslen, L.A. (2005). Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. Clin. Cancer Res. *11*, 8606–8614.

Bailly, M., and Doré, J.F. (1991). Human tumor spontaneous metastasis in immunosuppressed newborn rats. II. Multiple selections of human melanoma metastatic clones and variants. Int. J. Cancer *49*, 750–757.

Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K.P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K.G. (1995). p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. Nucleic Acids Res. *23*, 362–369.

Baldwin, L.A., Hoff, J.T., Lefringhouse, J., Zhang, M., Jia, C., Liu, Z., Erfani, S., Jin, H., Xu, M., She, Q.-B., et al. (2014). CD151-α3β1 integrin complexes suppress ovarian tumor growth by repressing slug-mediated EMT and canonical Wnt signaling. Oncotarget *5*, 12203–12217.

Ballotti, R. (2015). Identification of melanoma initiating cells: does CD271 have a future? Future Oncology *11*, 1587–1590.

Bandyopadhyay, S., Zhan, R., Chaudhuri, A., Watabe, M., Pai, S.K., Hirota, S., Hosobe, S., Tsukada, T., Miura, K., Takano, Y., et al. (2006). Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. Nat. Med. *12*, 933–938.

Banerji, A., Das, S., and Chatterjee, A. (2008). Culture of human A375 melanoma cells in the presence of fibronectin causes expression of MMP-9 and activation of MMP-2 in culture supernatants. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. *27*, 135–145.

Bardeesy, N., Bastian, B.C., Hezel, A., Pinkel, D., DePinho, R.A., and Chin, L. (2001). Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. Mol. Cell. Biol. *21*, 2144–2153.

Bass, R., Werner, F., Odintsova, E., Sugiura, T., Berditchevski, F., and Ellis, V. (2005). Regulation of urokinase receptor proteolytic function by the tetraspanin CD82. J. Biol. Chem. *280*, 14811–14818.

Bechetoille, N., Haftek, M., Staquet, M.J., Cochran, A.J., Schmitt, D., and Berthier-Vergnes, O. (2000). Penetration of human metastatic melanoma cells through an authentic dermal-epidermal junction is associated with dissolution of native collagen types IV and VII. Melanoma Res. *10*, 427–434.

Berthier-Vergnes, O., Zebda, N., Bailly, M., Bailly, C., Doré, J.F., Thomas, L., and Cochran, A.J. (1993). Expression of peanut agglutinin-binding glycoconjugates in primary melanomas with high risk of metastases. Lancet *341*, 1292.

Berthier-Vergnes, O., Kharbili, M.E., de la Fouchardière, A., Pointecouteau, T., Verrando, P., Wierinckx, A., Lachuer, J., Le Naour, F., and Lamartine, J. (2011). Gene expression profiles of human melanoma cells with different invasive potential reveal TSPAN8 as a novel mediator of invasion. Br. J. Cancer *104*, 155–165.

Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de Lichy, M., Bille, K., Dessen, P., d'Hayer, B., Mohamdi, H., Remenieras, A., et al. (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. Nature *480*, 94–98.

Bhansali, M., Zhou, J., and Shemshedini, L. (2016). TM4SF3 and AR: A Nuclear Complex that Stabilizes Both Proteins. Mol. Endocrinol. *30*, 13–25.

Bhatt, K.V., Spofford, L.S., Aram, G., McMullen, M., Pumiglia, K., and Aplin, A.E. (2005). Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. Oncogene *24*, 3459–3471.

Biechele, T.L., Kulikauskas, R.M., Toroni, R.A., Lucero, O.M., Swift, R.D., James, R.G., Robin, N.C., Dawson, D.W., Moon, R.T., and Chien, A.J. (2012). Wnt/β-catenin signaling and AXIN1 regulate apoptosis triggered by inhibition of the mutant kinase BRAFV600E in human melanoma. Sci Signal *5*, ra3.

Binni, F., Antigoni, I., De Simone, P., Majore, S., Silipo, V., Crisi, A., Amantea, A., Pacchiarini, D., Castori, M., De Bernardo, C., et al. (2010). Novel and recurrent p14 mutations in Italian familial melanoma. Clin. Genet. *77*, 581–586.

Björklund, S., and Gustafsson, C.M. (2005). The yeast Mediator complex and its regulation. Trends Biochem. Sci. 30, 240–244.

Bonaventure, J., Domingues, M.J., and Larue, L. (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. Pigment Cell & Melanoma Research *26*, 316–325

Bonazzi, V.F., Irwin, D., and Hayward, N.K. (2009). Identification of candidate tumor suppressor genes inactivated by promoter methylation in melanoma. Genes Chromosomes Cancer *48*, 10–21.

Boniol, M., Autier, P., Boyle, P., and Gandini, S. (2012). Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. BMJ *345*, e4757.

Bonnevaux, H., Lemaitre, O., Vincent, L., Levit, M.N., Windenberger, F., Halley, F., Delorme, C., Lengauer, C., Garcia-Echeverria, C., and Virone-Oddos, A. (2016). Concomitant Inhibition of PI3Kβ and BRAF or MEK in PTEN-Deficient/BRAF-Mutant Melanoma Treatment: Preclinical Assessment of SAR260301 Oral PI3Kβ-Selective Inhibitor. Mol. Cancer Ther. *15*, 1460–1471.

Botelho, N.K., Schneiders, F.I., Lord, S.J., Freeman, A.K., Tyagi, S., Nancarrow, D.J., Hayward, N.K., Whiteman, D.C., and Lord, R.V.N. (2010). Gene expression alterations in formalin-fixed, paraffin-embedded Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma tissues. Cancer Biol. Ther. *10*, 172–179.

Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins. Cell. Mol. Life Sci. *58*, 1189–1205.

Boucheix, C., Soria, C., Mirshahi, M., Soria, J., Perrot, J.Y., Fournier, N., Billard, M., and Rosenfeld, C. (1983). Characteristics of platelet aggregation induced by the monoclonal antibody ALB6 (acute lymphoblastic leukemia antigen p 24). Inhibition of aggregation by ALB6Fab. FEBS Lett. *161*, 289–295.

Boucheix, C., Nguyen-van-Cong, null, Perrot, J.Y., Foubert, C., Gross, M.S., Weil, D., Laisney, V., Rosenfeld, C., and Frezal, J. (1985). Assignment to chromosome 12 of the gene coding for the human cell surface antigen CD9(p24) using the monoclonal antibody ALB6. Ann. Genet. *28*, 19–24.

Byers, H.R., Maheshwary, S., Amodeo, D.M., and Dykstra, S.G. (2003). Role of cytoplasmic dynein in perinuclear aggregation of phagocytosed melanosomes and supranuclear melanin cap formation in human keratinocytes. J. Invest. Dermatol. *121*, 813–820.

Cadigan, K.M., and Waterman, M.L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. Cold Spring Harb Perspect Biol *4*.

Candeias, M.M., Powell, D.J., Roubalova, E., Apcher, S., Bourougaa, K., Vojtesek, B., Bruzzoni-Giovanelli, H., and Fåhraeus, R. (2006). Expression of p53 and p53/47 are controlled by alternative mechanisms of messenger RNA translation initiation. Oncogene *25*, 6936–6947.

Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., Ohno-Machado, L., Wolfe, C.J., and Yang, J. (2011). Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. Cancer Res. *71*, 245–254.

Cerezo, M., Tichet, M., Abbe, P., Ohanna, M., Lehraiki, A., Rouaud, F., Allegra, M., Giacchero, D., Bahadoran, P., Bertolotto, C., et al. (2013). Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner. Mol. Cancer Ther. *12*, 1605–1615.

Chang, C.-J., Mulholland, D.J., Valamehr, B., Mosessian, S., Sellers, W.R., and Wu, H. (2008). PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. Mol. Cell. Biol. *28*, 3281–3289.

Chang, Y., Barrett, J.H., Bishop, D.T., Armstrong, B.K., Bataille, V., Bergman, W., Berwick, M., Bracci, P.M., Elwood, J.M., Ernstoff, M.S., et al. (2009). Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. Int J Epidemiol *38*, 814–830.

Chapman, A., Fernandez del Ama, L., Ferguson, J., Kamarashev, J., Wellbrock, C., and Hurlstone, A. (2014). Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion. Cell Rep *8*, 688–695.

Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., 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.

Charrin, S., Le Naour, F., Labas, V., Billard, M., Le Caer, J.-P., Emile, J.-F., Petit, M.-A., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2003). EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. Biochem J *373*, 409–421.

Cheli, Y., Bonnazi, V.F., Jacquel, A., Allegra, M., Donatis, G.M.D., Bahadoran, P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2014). CD271 is an imperfect marker for melanoma initiating cells. Oncotarget 5, 5272–5283.

Cheli, Y., Ohanna, M., Ballotti, R., and Bertolotto, C. (2010). Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. Pigment Cell Melanoma Res 23, 27–40.

Cheli, Y., Giuliano, S., Guiliano, S., Botton, T., Rocchi, S., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2011). Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. Oncogene *30*, 2307–2318.

Chen, L., Liang, Z., Tian, Q., Li, C., Ma, X., Zhang, Y., Yang, Z., Wang, P., and Li, Y. (2011). Overexpression of LCMR1 is significantly associated with clinical stage in human NSCLC. J. Exp. Clin. Cancer Res. *30*, 18.

Cheung, M., Sharma, A., Madhunapantula, S.V., and Robertson, G.P. (2008). Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development. Cancer Res. *68*, 3429–3439.

Chiaverini, C., Beuret, L., Flori, E., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Bahadoran, P., Ortonne, J.-P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2008). Microphthalmia-associated transcription factor regulates RAB27A gene expression and controls melanosome transport. J. Biol. Chem. *283*, 12635–12642.

Chien, A.J., Moore, E.C., Lonsdorf, A.S., Kulikauskas, R.M., Rothberg, B.G., Berger, A.J., Major, M.B., Hwang, S.T., Rimm, D.L., and Moon, R.T. (2009). Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 1193–1198.

Chien, A.J., Haydu, L.E., Biechele, T.L., Kulikauskas, R.M., Rizos, H., Kefford, R.F., Scolyer, R.A., Moon, R.T., and Long, G.V. (2014). Targeted BRAF inhibition impacts survival in melanoma patients with high levels of Wnt/β-catenin signaling. PLoS ONE *9*, e94748.

Chin, L. (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. Nat. Rev. Cancer *3*, 559–570.

Ciuffreda, L., Del Bufalo, D., Desideri, M., Di Sanza, C., Stoppacciaro, A., Ricciardi, M.R., Chiaretti, S., Tavolaro, S., Benassi, B., Bellacosa, A., et al. (2009). Growth-inhibitory and antiangiogenic activity of the MEK inhibitor PD0325901 in malignant melanoma with or without BRAF mutations. Neoplasia *11*, 720–731.

Claas, C., Herrmann, K., Matzku, S., Möller, P., and Zöller, M. (1996). Developmentally regulated expression of metastasis-associated antigens in the rat. Cell Growth Differ. *7*, 663–678.

Claas, C., Seiter, S., Claas, A., Savelyeva, L., Schwab, M., and Zöller, M. (1998). Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. J. Cell Biol. *141*, 267–280.

Cochran, A.J., Wen, D.R., Berthier-Vergnes, O., Bailly, C., Doré, J.F., Bérard, F., Moulin, G., and Thomas, L. (1999). Cytoplasmic accumulation of peanut agglutinin-binding glycoconjugates in the cells of primary melanoma correlates with clinical outcome. Hum. Pathol. *30*, 556–561.

Cohen, A.W., Carbajal, J.M., and Schaeffer, R.C. (1999). VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. Am. J. Physiol. *277*, H2038-2049.

Conde-Perez, A., Gros, G., Longvert, C., Pedersen, M., Petit, V., Aktary, Z., Viros, A., Gesbert, F., Delmas, V., Rambow, F., et al. (2015). A caveolin-dependent and PI3K/AKT-independent role of PTEN in β-catenin transcriptional activity. Nat Commun *6*, 8093.

Conner, S.R., Scott, G., and Aplin, A.E. (2003). Adhesion-dependent activation of the ERK1/2 cascade is by-passed in melanoma cells. J. Biol. Chem. *278*, 34548–34554.

Conrad, W.H., Swift, R.D., Biechele, T.L., Kulikauskas, R.M., Moon, R.T., and Chien, A.J. (2012). Regulating the response to targeted MEK inhibition in melanoma: enhancing apoptosis in NRAS- and BRAF-mutant melanoma cells with Wnt/β-catenin activation. Cell Cycle *11*, 3724–3730.

Copeland, B.T., Bowman, M.J., Boucheix, C., and Ashman, L.K. (2013). Knockout of the tetraspanin Cd9 in the TRAMP model of de novo prostate cancer increases spontaneous metastases in an organ-specific manner. Int. J. Cancer *133*, 1803–1812.

Cui, X., Xu, D., Lv, C., Qu, F., He, J., Chen, M., Liu, Y., Gao, Y., Che, J., Yao, Y., et al. (2011). Suppression of MED19 expression by shRNA induces inhibition of cell proliferation and tumorigenesis in human prostate cancer cells. BMB Rep *44*, 547–552.

Curley, D.P., and Bosenberg, M.W. (2008). A new mechanism of release from senescence: suppression of p16INK4a by beta-catenin. Pigment Cell Melanoma Res *21*, 5–6.

Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.-H., Aiba, S., Bröcker, E.-B., LeBoit, P.E., et al. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. N. Engl. J. Med. *353*, 2135–2147.

Damsky, W.E., Curley, D.P., Santhanakrishnan, M., Rosenbaum, L.E., Platt, J.T., Gould Rothberg, B.E., Taketo, M.M., Dankort, D., Rimm, D.L., McMahon, M., et al. (2011). β-catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. Cancer Cell *20*, 741–754.

Dankort, D., Curley, D.P., Cartlidge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky, W.E., You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M., and Bosenberg, M. (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. Nat. Genet. *41*, 544–552.

Dar, A.A., Majid, S., Rittsteuer, C., de Semir, D., Bezrookove, V., Tong, S., Nosrati, M., Sagebiel, R., Miller, J.R., and Kashani-Sabet, M. (2013). The role of miR-18b in MDM2-p53 pathway signaling and melanoma progression. J. Natl. Cancer Inst. *105*, 433–442.

Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. Nature *379*, 557–560.

Delevoye, C., Giordano, F., van Niel, G., and Raposo, G. (2011). [Biogenesis of melanosomes - the chessboard of pigmentation]. Med Sci (Paris) *27*, 153–162.

Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., et al. (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. Genes Dev. *21*, 2923–2935.

Demetrick, D.J., Herlyn, D., Tretiak, M., Creasey, D., Clevers, H., Donoso, L.A., Vennegoor, C.J., Dixon, W.T., and Jerry, L.M. (1992). ME491 melanoma-associated glycoprotein family: antigenic identity of ME491, NKI/C-3, neuroglandular antigen (NGA), and CD63 proteins. J. Natl. Cancer Inst. *84*, 422–429.

Denat, L., and Larue, L. (2007). [Malignant melanoma and the role of the paradoxal protein Microphthalmia transcription factor]. Bull Cancer *94*, 81–92.

Deng, W., Gopal, Y.N.V., Scott, A., Chen, G., Woodman, S.E., and Davies, M.A. (2012). Role and therapeutic potential of PI3K-mTOR signaling in de novo resistance to BRAF inhibition. Pigment Cell Melanoma Res *25*, 248–258.

Dennis, L.K., and Lowe, J.B. (2013). Does artificial UV use prior to spring break protect students from sunburns during spring break? Photodermatol Photoimmunol Photomed *29*, 140–148.

Ding, Q., Xia, W., Liu, J.-C., Yang, J.-Y., Lee, D.-F., Xia, J., Bartholomeusz, G., Li, Y., Pan, Y., Li, Z., et al. (2005). Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. Mol. Cell *19*, 159–170.

Ding, X., Huang, G., Shi, Y., Li, J., and Fang, X. (2012). Med19 promotes gastric cancer progression and cellular growth. Gene *504*, 262–267.

Dobson, M., Ramakrishnan, G., Ma, S., Kaplun, L., Balan, V., Fridman, R., and Tzivion, G. (2011). Bimodal Regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. Biochim Biophys Acta *1813*, 1453–1464.

Domingues, M.J., Rambow, F., Job, B., Papon, L., Liu, W., Larue, L., and Bonaventure, J. (2014). β-catenin inhibitor ICAT modulates the invasive motility of melanoma cells. Cancer Res. *74*, 1983–1995.

Donner, A.J., Szostek, S., Hoover, J.M., and Espinosa, J.M. (2007). CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes. Mol. Cell *27*, 121–133.

Doré, J.F., Berthier-Vergnes, O., Zebda, N., Bailly, M., Thomas, L., Bailly, C., and Cochran, A.J. (1994). Selective expression of PNA-binding glycoconjugates by invasive human melanomas: a new marker of metastatic potential. Pigment Cell Res. *7*, 461–464.

Dovey, M., White, R.M., and Zon, L.I. (2009). Oncogenic NRAS cooperates with p53 loss to generate melanoma in zebrafish. Zebrafish *6*, 397–404.

Du, K., and Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. J. Biol. Chem. *273*, 32377–32379.

Du, W., Liu, X., Fan, G., Zhao, X., Sun, Y., Wang, T., Zhao, R., Wang, G., Zhao, C., Zhu, Y., et al. (2014). From cell membrane to the nucleus: an emerging role of E-cadherin in gene transcriptional regulation. J Cell Mol Med *18*, 1712–1719.

Duriez, C., Falette, N., Cortes, U., Moyret-Lalle, C., and Puisieux, A. (2000). Absence of p53-dependent induction of the metastatic suppressor KAI1 gene after DNA damage. Oncogene *19*, 2461–2464.

Eichhoff, O.M., Weeraratna, A., Zipser, M.C., Denat, L., Widmer, D.S., Xu, M., Kriegl, L., Kirchner, T., Larue, L., Dummer, R., et al. (2011). Differential LEF1 and TCF4 expression is involved in melanoma cell phenotype switching. Pigment Cell Melanoma Res *24*, 631–642.

Ennen, M., Keime, C., Kobi, D., Mengus, G., Lipsker, D., Thibault-Carpentier, C., and Davidson, I. (2015). Single-cell gene expression signatures reveal melanoma cell heterogeneity. Oncogene *34*, 3251–3263.

Eom, T.-Y., and Jope, R.S. (2009). GSK3 beta N-terminus binding to p53 promotes its acetylation. Mol. Cancer *8*, 14.

Fang, M., Ou, J., Hutchinson, L., and Green, M.R. (2014a). The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFG to mediate the CpG Island Methylator phenotype. Mol. Cell *55*, 904–915.

Fang, T.-T., Sun, X.-J., Chen, J., Zhao, Y., Sun, R.-X., Ren, N., and Liu, B.-B. (2014b). Long non-coding RNAs are differentially expressed in hepatocellular carcinoma cell lines with differing metastatic potential. Asian Pac. J. Cancer Prev. *15*, 10513–10524.

Fang, T., Lin, J., Wang, Y., Chen, G., Huang, J., Chen, J., Zhao, Y., Sun, R., Liang, C., Liu, B., et al. (2016). Tetraspanin-8 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by increasing ADAM12m expression. Oncotarget 7, 40630–40643.

Fedorenko, I.V., Abel, E.V., Koomen, J.M., Fang, B., Wood, E.R., Chen, Y.A., Fisher, K.J., Iyengar, S., Dahlman, K.B., Wargo, J.A., et al. (2016). Fibronectin induction abrogates the BRAF inhibitor response of BRAF V600E/PTEN-null melanoma cells. Oncogene *35*, 1225–1235.

Fekete, T., Rásó, E., Pete, I., Tegze, B., Liko, I., Munkácsy, G., Sipos, N., Rigó, J., and Györffy, B. (2012). Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. Int. J. Cancer *131*, 95–105.

Feng, S., Agoulnik, I.U., Truong, A., Li, Z., Creighton, C.J., Kaftanovskaya, E.M., Pereira, R., Han, H.D., Lopez-Berestein, G., Klonisch, T., et al. (2010). Suppression of relaxin receptor RXFP1 decreases prostate cancer growth and metastasis. Endocr. Relat. Cancer *17*, 1021–1033.

Ferrell, J.E. (2000). What do scaffold proteins really do? Sci. STKE *2000*, pe1.

Fitter, S., Tetaz, T.J., Berndt, M.C., and Ashman, L.K. (1995). Molecular cloning of cDNA encoding a novel platelet-endothelial cell tetra-span antigen, PETA-3. Blood *86*, 1348–1355.

Fitzpatrick, T.B. (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. Arch Dermatol *124*, 869–871.

Foroutannejad, S., Rohner, N., Reimer, M., Kwon, G., and Schober, J.M. (2014). A novel role for IQGAP1 protein in cell motility through cell retraction. Biochem. Biophys. Res. Commun. *448*, 39–44.

Frank, N.Y., Schatton, T., Kim, S., Zhan, Q., Wilson, B.J., Ma, J., Saab, K.R., Osherov, V., Widlund, H.R., Gasser, M., et al. (2011). VEGFR-1 Expressed by Malignant Melanoma-Initiating Cells Is Required for Tumor Growth. Cancer Res *71*, 1474–1485.

Frederick, D.T., Salas Fragomeni, R.A., Schalck, A., Ferreiro-Neira, I., Hoff, T., Cooper, Z.A., Haq, R., Panka, D.J., Kwong, L.N., Davies, M.A., et al. (2014). Clinical profiling of BCL-2 family members in the setting of BRAF inhibition offers a rationale for targeting de novo resistance using BH3 mimetics. PLoS ONE *9*, e101286.

Freeman, D.J., Li, A.G., Wei, G., Li, H.-H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A.D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R.D., et al. (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. Cancer Cell *3*, 117–130.

Fujiwara, K., Ohuchida, K., Sada, M., Horioka, K., Ulrich, C.D., Shindo, K., Ohtsuka, T., Takahata, S., Mizumoto, K., Oda, Y., et al. (2014). CD166/ALCAM expression is characteristic of tumorigenicity and invasive and migratory activities of pancreatic cancer cells. PLoS ONE *9*, e107247.

Funakoshi, T., Tachibana, I., Hoshida, Y., Kimura, H., Takeda, Y., Kijima, T., Nishino, K., Goto, H., Yoneda, T., Kumagai, T., et al. (2003). Expression of tetraspanins in human lung cancer cells: frequent downregulation of CD9 and its contribution to cell motility in small cell lung cancer. Oncogene *22*, 674–687.

Fung, C., Pupo, G.M., Scolyer, R.A., Kefford, R.F., and Rizos, H. (2013). p16(INK) (4a) deficiency promotes DNA hyper-replication and genetic instability in melanocytes. Pigment Cell Melanoma Res *26*, 236–246.

Fuster, J.J., Sanz-González, S.M., Moll, U.M., and Andrés, V. (2007). Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. Trends Mol Med *13*, 192–199.

Gadea, G., de Toledo, M., Anguille, C., and Roux, P. (2007). Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. J. Cell Biol. *178*, 23–30.

Gaggioli, C., Robert, G., Bertolotto, C., Bailet, O., Abbe, P., Spadafora, A., Bahadoran, P., Ortonne, J.-P., Baron, V., Ballotti, R., et al. (2007). Tumor-derived fibronectin is involved in melanoma cell invasion and regulated by V600E B-Raf signaling pathway. J. Invest. Dermatol. *127*, 400–410.

Gallagher, S.J., Rambow, F., Kumasaka, M., Champeval, D., Bellacosa, A., Delmas, V., and Larue, L. (2013). Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. Oncogene *32*, 2230–2238.

Gao, A.C., Lou, W., Dong, J.-T., Barrett, J.C., Danielpour, D., and Isaacs, J.T. (2003). Defining regulatory elements in the human KAI1 (CD 82) metastasis suppressor gene. Prostate *57*, 256–260.

Garcia-España, A., Chung, P.-J., Sarkar, I.N., Stiner, E., Sun, T.-T., and Desalle, R. (2008). Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. Genomics *91*, 326–334.

Garraway, L.A., Widlund, H.R., Rubin, M.A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhim, R., Milner, D.A., Granter, S.R., Du, J., et al. (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. Nature *436*, 117–122.

Gates, R.R., and Zimmermann, A.A. (1953). Comparison of skin color with melanin content. J. Invest. Dermatol. *21*, 339–348.

Gembarska, A., Luciani, F., Fedele, C., Russell, E.A., Dewaele, M., Villar, S., Zwolinska, A., Haupt, S., de Lange, J., Yip, D., et al. (2012). MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. Nat. Med. *18*, 1239–1247.

Genov, M., Kreiseder, B., Nagl, M., Drucker, E., Wiederstein, M., Muellauer, B., Krebs, J., Grohmann, T., Pretsch, D., Baumann, K., et al. (2016). Tetrahydroanthraquinone Derivative (±)-4-Deoxyaustrocortilutein Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Melanoma Cells via Upregulation of p21 and p53 and Downregulation of NF-kappaB. J Cancer *7*, 555–568.

Gesierich, S., Paret, C., Hildebrand, D., Weitz, J., Zgraggen, K., Schmitz-Winnenthal, F.H., Horejsi, V., Yoshie, O., Herlyn, D., Ashman, L.K., et al. (2005). Colocalization of the tetraspanins, CO-029 and CD151, with integrins in human pancreatic adenocarcinoma: impact on cell motility. Clin. Cancer Res. *11*, 2840–2852.

Gesierich, S., Berezovskiy, I., Ryschich, E., and Zöller, M. (2006). Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. Cancer Res. *66*, 7083–7094.

Giuliano, S., Cheli, Y., Ohanna, M., Bonet, C., Beuret, L., Bille, K., Loubat, A., Hofman, V., Hofman, P., Ponzio, G., et al. (2010). Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. Cancer Res. *70*, 3813–3822.

Goding, C.R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. Genes Dev. *14*, 1712–1728.

Goding, C., and Meyskens, F.L. (2006). Microphthalmic-associated transcription factor integrates melanocyte biology and melanoma progression. Clin. Cancer Res. *12*, 1069–1073.

Goel, V.K., Lazar, A.J.F., Warneke, C.L., Redston, M.S., and Haluska, F.G. (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. J. Invest. Dermatol. *126*, 154–160.

Goel, V.K., Ibrahim, N., Jiang, G., Singhal, M., Fee, S., Flotte, T., Westmoreland, S., Haluska, F.S., Hinds, P.W., and Haluska, F.G. (2009). Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. Oncogene *28*, 2289–2298.

Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M.J., Schmitt, D., and Berthier-Vergnes, O. (2001). Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. Anal. Biochem. *295*, 17–21.

Goto, T., Sato, A., Adachi, S., Iemura, S., Natsume, T., and Shibuya, H. (2013). IQGAP1 protein regulates nuclear localization of β-catenin via importin-β5 protein in Wnt signaling. J. Biol. Chem. *288*, 36351–36360.

Gottardi, C.J., and Peifer, M. (2008). Terminal Regions of β-Catenin Come into View. Structure *16*, 336–338.

Gould Rothberg, B.E., Berger, A.J., Molinaro, A.M., Subtil, A., Krauthammer, M.O., Camp, R.L., Bradley, W.R., Ariyan, S., Kluger, H.M., and Rimm, D.L. (2009). Melanoma prognostic model using tissue microarrays and genetic algorithms. J. Clin. Oncol. *27*, 5772–5780.

Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. Nature *445*, 851–857.

Greco, C., Bralet, M.-P., Ailane, N., Dubart-Kupperschmitt, A., Rubinstein, E., Le Naour, F., and Boucheix, C. (2010). E-cadherin/p120-catenin and tetraspanin Co-029 cooperate for cell motility control in human colon carcinoma. Cancer Res. *70*, 7674–7683.

Greene, V.R., Johnson, M.M., Grimm, E.A., and Ellerhorst, J.A. (2009). Frequencies of NRAS and BRAF mutations increase from the radial to the vertical growth phase in cutaneous melanoma. J. Invest. Dermatol. *129*, 1483–1488.

Grossmann, A.H., Yoo, J.H., Clancy, J., Sorensen, L.K., Sedgwick, A., Tong, Z., Ostanin, K., Rogers, A., Grossmann, K.F., Tripp, S.R., et al. (2013). The Small GTPase ARF6 Stimulates β-Catenin Transcriptional Activity During WNT5A-Mediated Melanoma Invasion and Metastasis. Sci Signal *6*, ra14.

Gu, T., Zhang, Z., Wang, J., Guo, J., Shen, W.H., and Yin, Y. (2011). CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase. Cancer Res. *71*, 2821–2825.

Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. (1991). A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. Cell *65*, 13–24.

Guo, Q., Xia, B., Zhang, F., Richardson, M.M., Li, M., Zhang, J.S., Chen, F., and Zhang, X.A. (2012). Tetraspanin CO-029 inhibits colorectal cancer cell movement by deregulating cell-matrix and cell-cell adhesions. PLoS ONE *7*, e38464.

Guo, Y., Pajovic, S., and Gallie, B.L. (2008). Expression of p14ARF, MDM2, and MDM4 in human retinoblastoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. *375*, 1–5.

Guvakova, M. (1997). Overexpressed IGF-I Receptors Reduce Estrogen Growth Requirements, Enhance Survival, and Promote E-Cadherin-Mediated Cell–Cell Adhesion in Human Breast Cancer Cells. Experimental Cell Research *231*, 149–162.

Haass, N.K., and Herlyn, M. (2005). Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. *10*, 153–163.

Hajduch, E., Alessi, D.R., Hemmings, B.A., and Hundal, H.S. (1998). Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. Diabetes *47*, 1006–1013.

Han, H.-J., Russo, J., Kohwi, Y., and Kohwi-Shigematsu, T. (2008). SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. Nature *452*, 187–193.

Han, Z.-B., Yang, Z., Chi, Y., Zhang, L., Wang, Y., Ji, Y., Wang, J., Zhao, H., and Han, Z.C. (2013). MicroRNA-124 suppresses breast cancer cell growth and motility by targeting CD151. Cell. Physiol. Biochem. *31*, 823–832.

Hao, L., Ha, J.R., Kuzel, P., Garcia, E., and Persad, S. (2012). Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. Br. J. Dermatol. *166*, 1184–1197.

Harland, M., Taylor, C.F., Chambers, P.A., Kukalizch, K., Randerson-Moor, J.A., Gruis, N.A., de Snoo, F.A., ter Huurne, J.A.C., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., et al. (2005). A mutation hotspot at the p14ARF splice site. Oncogene *24*, 4604–4608.

Hartman, M.L., and Czyz, M. (2015). MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. Cell. Mol. Life Sci. *72*, 1249–1260.

Hasegawa, H., Utsunomiya, Y., Kishimoto, K., Yanagisawa, K., and Fujita, S. (1996). SFA-1, a novel cellular gene induced by human T-cell leukemia virus type 1, is a member of the transmembrane 4 superfamily. J. Virol. *70*, 3258–3263.

Hashida, H., Takabayashi, A., Tokuhara, T., Taki, T., Kondo, K., Kohno, N., Yamaoka, Y., and Miyake, M. (2002). Integrin alpha3 expression as a prognostic factor in colon cancer: association with MRP-1/CD9 and KAI1/CD82. Int. J. Cancer *97*, 518–525.

Hassel, J.C., Lee, S.B., Meiss, F., Meier, F., Dimitrakopoulou-Strauss, A., Jäger, D., and Enk, A.H. (2016). Vemurafenib and ipilimumab: A promising combination? Results of a case series. Oncoimmunology *5*, e1101207.

Hassen, S., Ali, A.A., Kilaparty, S.P., Al-Anbaky, Q.A., Majeed, W., Boman, B.M., Fields, J.Z., and Ali, N. (2016). Interdependence of DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 in apoptosis in human colorectal carcinoma cell lines. Mol. Cell. Biochem. *412*, 297–305.

He, B., Liu, L., Cook, G.A., Grgurevich, S., Jennings, L.K., and Zhang, X.A. (2005). Tetraspanin CD82 attenuates cellular morphogenesis through down-regulating integrin alpha6-mediated cell adhesion. J. Biol. Chem. *280*, 3346–3354.

He, P., Kuhara, H., Tachibana, I., Jin, Y., Takeda, Y., Tetsumoto, S., Minami, T., Kohmo, S., Hirata, H., Takahashi, R., et al. (2013). Calretinin mediates apoptosis in small cell lung cancer cells expressing tetraspanin CD9. FEBS Open Bio *3*, 225–230.

Healy, E., Belgaid, C., Takata, M., Harrison, D., Zhu, N.W., Burd, D.A., Rigby, H.S., Matthews, J.N., and Rees, J.L. (1998). Prognostic significance of allelic losses in primary melanoma. Oncogene *16*, 2213–2218.

Helgadottir, H., Höiom, V., Tuominen, R., Nielsen, K., Jönsson, G., Olsson, H., and Hansson, J. (2016). Germline CDKN2A Mutation Status and Survival in Familial Melanoma Cases. J. Natl. Cancer Inst. *108*.

Hemesath, T.J., Steingrímsson, E., McGill, G., Hansen, M.J., Vaught, J., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Fisher, D.E. (1994). microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. Genes Dev. *8*, 2770–2780.

Hemler, M.E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 801–811.

Herbst, R.A., Weiss, J., Ehnis, A., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (1994). Loss of heterozygosity for 10q22-10qter in malignant melanoma progression. Cancer Res. *54*, 3111–3114.

Herlevsen, M., Schmidt, D.-S., Miyazaki, K., and Zöller, M. (2003). The association of the tetraspanin D6.1A with the alpha6beta4 integrin supports cell motility and liver metastasis formation. J. Cell. Sci. *116*, 4373–4390.

Higashiyama, M., Taki, T., Ieki, Y., Adachi, M., Huang, C.L., Koh, T., Kodama, K., Doi, O., and Miyake, M. (1995). Reduced motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. Cancer Res. *55*, 6040–6044.

Hoek, K.S., and Goding, C.R. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. Pigment Cell Melanoma Res *23*, 746–759.

Hoek, K.S., Schlegel, N.C., Eichhoff, O.M., Widmer, D.S., Praetorius, C., Einarsson, S.O., Valgeirsdottir, S., Bergsteinsdottir, K., Schepsky, A., Dummer, R., et al. (2008a). Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. Pigment Cell Melanoma Res *21*, 665–676.

Hoek, K.S., Eichhoff, O.M., Schlegel, N.C., Döbbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., and Dummer, R. (2008b). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. Cancer Res. *68*, 650–656.

Hong, I.-K., Kim, Y.-M., Jeoung, D.-I., Kim, K.-C., and Lee, H. (2005). Tetraspanin CD9 induces MMP-2 expression by activating p38 MAPK, JNK and c-Jun pathways in human melanoma cells. Exp. Mol. Med. *37*, 230–239.

Hong, I.-K., Jin, Y.-J., Byun, H.-J., Jeoung, D.-I., Kim, Y.-M., and Lee, H. (2006). Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways. J. Biol. Chem. *281*, 24279–24292.

Hong, I.-K., Jeoung, D.-I., Ha, K.-S., Kim, Y.-M., and Lee, H. (2012). Tetraspanin CD151 stimulates adhesion-dependent activation of Ras, Rac, and Cdc42 by facilitating molecular association between β1 integrins and small GTPases. J. Biol. Chem. *287*, 32027–32039.

Horejsí, V., and Vlcek, C. (1991). Novel structurally distinct family of leucocyte surface glycoproteins including CD9, CD37, CD53 and CD63. FEBS Lett. *288*, 1–4.

Hori, H., Yano, S., Koufuji, K., Takeda, J., and Shirouzu, K. (2004). CD9 expression in gastric cancer and its significance. J. Surg. Res. *117*, 208–215.

Hoschuetzky, H., Aberle, H., and Kemler, R. (1994). Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. J. Cell Biol. *127*, 1375–1380.

Houben, R., Wischhusen, J., Menaa, F., Synwoldt, P., Schrama, D., Bröcker, E.-B., and Becker, J.C. (2008). Melanoma stem cells: targets for successful therapy? J Dtsch Dermatol Ges *6*, 541–546.

Houben, R., Hesbacher, S., Schmid, C.P., Kauczok, C.S., Flohr, U., Haferkamp, S., Müller, C.S.L., Schrama, D., Wischhusen, J., and Becker, J.C. (2011). High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. PLoS ONE *6*, e22096.

Houle, C.D., Ding, X.-Y., Foley, J.F., Afshari, C.A., Barrett, J.C., and Davis, B.J. (2002). Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. Gynecol. Oncol. *86*, 69–78.

Huang, C., Taki, T., Adachi, M., Yagita, M., Sawada, S., Takabayashi, A., Inufusa, H., Yoshie, O., and Miyake, M. (1997). MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression in normal and various cancer tissues. Int. J. Oncol. *11*, 1045–1051.

Huang, C.I., Kohno, N., Ogawa, E., Adachi, M., Taki, T., and Miyake, M. (1998). Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. Am. J. Pathol. *153*, 973–983.

Huang, W., Chang, H.Y., Fei, T., Wu, H., and Chen, Y.-G. (2007). GSK3 beta mediates suppression of cyclin D2 expression by tumor suppressor PTEN. Oncogene *26*, 2471–2482.

Huang, Z., Miao, X., Patarroyo, M., Nilsson, G.P., Pernow, J., and Li, N. (2016). Tetraspanin CD151 and integrin α6β1 mediate platelet-enhanced endothelial colony forming cell angiogenesis. J. Thromb. Haemost. *14*, 606–618.

Huber, A.H., and Weis, W.I. (2001). The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. Cell *105*, 391–402.

Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. Cell *90*, 871–882.

Hülsken, J., Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. J. Cell Biol. *127*, 2061–2069.

Hur, J., Choi, J.-I., Lee, H., Nham, P., Kim, T.-W., Chae, C.-W., Yun, J.-Y., Kang, J.-A., Kang, J., Lee, S.E., et al. (2016). CD82/KAI1 Maintains the Dormancy of Long-Term Hematopoietic Stem Cells through Interaction with DARC-Expressing Macrophages. Cell Stem Cell *18*, 508–521.

Ikenoue, T., Kanai, F., Hikiba, Y., Tanaka, Y., Imamura, J., Ohta, M., Jazag, A., Guleng, B., Asaoka, Y., Tateishi, K., et al. (2005). Functional consequences of mutations in a putative Akt phosphorylation motif of B-raf in human cancers. Mol. Carcinog. *43*, 59–63.

Ikeyama, S., Koyama, M., Yamaoko, M., Sasada, R., and Miyake, M. (1993). Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. J. Exp. Med. *177*, 1231–1237.

Isshiki, K., Elder, D.E., Guerry, D., and Linnenbach, A.J. (1993). Chromosome 10 allelic loss in malignant melanoma. Genes Chromosomes Cancer *8*, 178–184.

Jackson, P., Grimm, M.-O., Kingsley, E.A., Brosius, U., Antalis, T., Yardley, G., and Russell, P.J. (2002). Relationship between expression of KAI1 metastasis suppressor gene, mRNA levels and p53 in human bladder and prostate cancer cell lines. Urol. Oncol. *7*, 99–104.

Jackson, P., Ow, K., Yardley, G., Delprado, W., Quinn, D.I., Yang, J.-L., and Russell, P.J. (2003). Downregulation of KAI1 mRNA in localised prostate cancer and its bony metastases does not correlate with p53 overexpression. Prostate Cancer Prostatic Dis. *6*, 174–181.

Jameson, K.L., Mazur, P.K., Zehnder, A.M., Zhang, J., Zarnegar, B., Sage, J., and Khavari, P.A. (2013). IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAP kinase-driven tumors. Nat. Med. *19*, 626–630.

Jang, H.-I., and Lee, H. (2003). A decrease in the expression of CD63 tetraspanin protein elevates invasive potential of human melanoma cells. Exp. Mol. Med. *35*, 317–323.

Jee, B.K., Park, K.M., Surendran, S., Lee, W.K., Han, C.W., Kim, Y.S., and Lim, Y. (2006). KAI1/CD82 suppresses tumor invasion by MMP9 inactivation via TIMP1 up-regulation in the H1299 human lung carcinoma cell line. Biochem. Biophys. Res. Commun. *342*, 655–661.

Jenkins, M.H., Croteau, W., Mullins, D.W., and Brinckerhoff, C.E. (2015). The BRAF(V600E) inhibitor, PLX4032, increases type I collagen synthesis in melanoma cells. Matrix Biol. *48*, 66–77.

Ji, H., Wang, J., Nika, H., Hawke, D., Keezer, S., Ge, Q., Fang, B., Fang, X., Fang, D., Litchfield, D.W., et al. (2009). EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of alpha-Catenin from beta-Catenin and transactivation of beta-Catenin. Mol. Cell *36*, 547–559.

Jiang, C.C., Lucas, K., Avery-Kiejda, K.A., Wade, M., deBock, C.E., Thorne, R.F., Allen, J., Hersey, P., and Zhang, X.D. (2008). Up-regulation of Mcl-1 is critical for survival of human melanoma cells upon endoplasmic reticulum stress. Cancer Res. *68*, 6708–6717.

Ji-Fu, E., Xing, J.-J., Hao, L.-Q., and Fu, C.-G. (2012). Suppression of lung cancer metastasis-related protein 1 (LCMR1) inhibits the growth of colorectal cancer cells. Mol. Biol. Rep. *39*, 3675–3681.

Jimbow, K., Quevedo, W.C., Fitzpatrick, T.B., and Szabo, G. (1976). Some aspects of melanin biology: 1950-1975. J. Invest. Dermatol. *67*, 72–89.

Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2010). The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. Cold Spring Harb Perspect Biol *2*, a000919.

Johnson, M., Sharma, M., and Henderson, B.R. (2009). IQGAP1 regulation and roles in cancer. Cell. Signal. *21*, 1471–1478.

Johnson, M., Sharma, M., Brocardo, M.G., and Henderson, B.R. (2011). IQGAP1 translocates to the nucleus in early S-phase and contributes to cell cycle progression after DNA replication arrest. Int. J. Biochem. Cell Biol. *43*, 65–73.

Julien, S., Puig, I., Caretti, E., Bonaventure, J., Nelles, L., van Roy, F., Dargemont, C., de Herreros, A.G., Bellacosa, A., and Larue, L. (2007). Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. Oncogene *26*, 7445–7456.

Junge, H.J., Yang, S., Burton, J.B., Paes, K., Shu, X., French, D.M., Costa, M., Rice, D.S., and Ye, W. (2009). TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-induced FZD4/beta-catenin signaling. Cell *139*, 299–311.

Kadekaro, A.L., Kavanagh, R., Kanto, H., Terzieva, S., Hauser, J., Kobayashi, N., Schwemberger, S., Cornelius, J., Babcock, G., Shertzer, H.G., et al. (2005). alpha-Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. Cancer Res. *65*, 4292–4299.

Kageshita, T., Hamby, C.V., Ishihara, T., Matsumoto, K., Saida, T., and Ono, T. (2001). Loss of beta-catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma. Br. J. Dermatol. *145*, 210–216.

Kaluzki, I., Hrgovic, I., Hailemariam-Jahn, T., Doll, M., Kleemann, J., Valesky, E.M., Kippenberger, S., Kaufmann, R., Zoeller, N., and Meissner, M. (2016). Dimethylfumarate inhibits melanoma cell proliferation via p21 and p53 induction and bcl-2 and cyclin B1 downregulation. Tumour Biol.

Kanetaka, K., Sakamoto, M., Yamamoto, Y., Yamasaki, S., Lanza, F., Kanematsu, T., and Hirohashi, S. (2001). Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. *35*, 637–642.

Kanetaka, K., Sakamoto, M., Yamamoto, Y., Takamura, M., Kanematsu, T., and Hirohashi, S. (2003). Possible involvement of tetraspanin CO-029 in hematogenous intrahepatic metastasis of liver cancer cells. J. Gastroenterol. Hepatol. *18*, 1309–1314.

Katayama, K., Nakamura, A., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2008). FOXO transcription factor-dependent p15(INK4b) and p19(INK4d) expression. Oncogene *27*, 1677–1686.

Kersey, J.H., LeBien, T.W., Abramson, C.S., Newman, R., Sutherland, R., and Greaves, M. (1981). P-24: a human leukemia-associated and lymphohemopoietic progenitor cell surface structure identified with monoclonal antibody. J. Exp. Med. *153*, 726–731.

Keswell, D., Kidson, S.H., and Davids, L.M. (2015). Melanocyte migration is influenced by E-cadherin-dependent adhesion of keratinocytes in both two- and three-dimensional in vitro wound models. Cell Biol. Int. *39*, 169–176.

Khanna, P., Chung, C.-Y., Neves, R.I., Robertson, G.P., and Dong, C. (2014). CD82/KAI expression prevents IL-8-mediated endothelial gap formation in late-stage melanomas. Oncogene *33*, 2898–2908.

Kikuchi, Y., Umemura, H., Nishitani, S., Iida, S., Fukasawa, R., Hayashi, H., Hirose, Y., Tanaka, A., Sugasawa, K., and Ohkuma, Y. (2015). Human mediator MED17 subunit plays essential roles in gene regulation by associating with the transcription and DNA repair machineries. Genes Cells *20*, 191–202.

Kim, B., Boo, K., Lee, J.S., Kim, K.I., Kim, W.H., Cho, H.-J., Park, Y.-B., Kim, H.-S., and Baek, S.H. (2010). Identification of the KAI1 metastasis suppressor gene as a hypoxia target gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. *393*, 179–184.

Kim, J.H., Kim, B., Cai, L., Choi, H.J., Ohgi, K.A., Tran, C., Chen, C., Chung, C.H., Huber, O., Rose, D.W., et al. (2005). Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. Nature *434*, 921–926.

Kim, S., Xu, X., Hecht, A., and Boyer, T.G. (2006). Mediator is a transducer of Wnt/beta-catenin signaling. J. Biol. Chem. *281*, 14066–14075.

Kim, T.-K., Park, C.S., Jeoung, M.H., Lee, W.R., Go, N.K., Choi, J.R., Lee, T.S., Shim, H., and Lee, S. (2015). Generation of a human antibody that inhibits TSPAN8-mediated invasion of metastatic colorectal cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *468*, 774–780.

Kim, Y.I., Shin, M.-K., Lee, J.-W., Chung, J.-H., and Lee, M.-H. (2009). Decreased expression of KAI1/CD82 metastasis suppressor gene is associated with loss of heterozygosity in melanoma cell lines. Oncol. Rep. *21*, 159–164.

Kischel, P., Bellahcene, A., Deux, B., Lamour, V., Dobson, R., DE Pauw, E., Clezardin, P., and Castronovo, V. (2012). Overexpression of CD9 in human breast cancer cells promotes the development of bone metastases. Anticancer Res. *32*, 5211–5220.

Kohmo, S., Kijima, T., Otani, Y., Mori, M., Minami, T., Takahashi, R., Nagatomo, I., Takeda, Y., Kida, H., Goya, S., et al. (2010). Cell surface tetraspanin CD9 mediates chemoresistance in small cell lung cancer. Cancer Res. *70*, 8025–8035.

Kondoh, M., Ueda, M., Ichihashi, M., and Mishima, Y. (1993). Decreased expression of human melanoma-associated antigen ME491 along the progression of melanoma pre-canceroses to invasive and metastatic melanomas. Melanoma Res. *3*, 241–245.

Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science *275*, 1784–1787.

Kovacs, D., Migliano, E., Muscardin, L., Silipo, V., Catricalà, C., Picardo, M., and Bellei, B. (2016). The role of Wnt/β-catenin signaling pathway in melanoma epithelial-to-mesenchymal-like switching: evidences from patients-derived cell lines. Oncotarget.

Krayem, M., Journe, F., Wiedig, M., Morandini, R., Najem, A., Salès, F., van Kempen, L.C., Sibille, C., Awada, A., Marine, J.-C., et al. (2016). p53 Reactivation by PRIMA-1(Met) (APR-246) sensitises (V600E/K)BRAF melanoma to vemurafenib. Eur. J. Cancer *55*, 98–110.

Kruse, J.-P., and Gu, W. (2008). SnapShot: p53 posttranslational modifications. Cell *133*, 930–930.e1.

Kuhn, S., Koch, M., Nübel, T., Ladwein, M., Antolovic, D., Klingbeil, P., Hildebrand, D., Moldenhauer, G., Langbein, L., Franke, W.W., et al. (2007). A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. Mol. Cancer Res. *5*, 553–567.

Kumari, S., Devi, G., Badana, A., Dasari, V.R., and Malla, R.R. (2015). CD151—A Striking Marker for Cancer Therapy. Biomark Cancer *7*, 7–11.

Kwon, M.J., Park, S., Choi, J.Y., Oh, E., Kim, Y.J., Park, Y.-H., Cho, E.Y., Kwon, M.J., Nam, S.J., Im, Y.-H., et al. (2012). Clinical significance of CD151 overexpression in subtypes of invasive breast cancer. Br. J. Cancer *106*, 923–930.

Lafleur, M.A., Xu, D., and Hemler, M.E. (2009). Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. Mol. Biol. Cell *20*, 2030–2040.

Lammerding, J., Kazarov, A.R., Huang, H., Lee, R.T., and Hemler, M.E. (2003). Tetraspanin CD151 regulates alpha6beta1 integrin adhesion strengthening. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 7616–7621.

Lane, D., and Levine, A. (2010). p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. Cold Spring Harb Perspect Biol *2*, a000893.

Lankenau, M.A., Patel, R., Liyanarachchi, S., Maharry, S.E., Hoag, K.W., Duggan, M., Walker, C.J., Markowitz, J., Carson, W.E., Eisfeld, A.-K., et al. (2015). MicroRNA-3151 inactivates TP53 in BRAF-mutated human malignancies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *112*, E6744-6751.

Larue, L., and Delmas, V. (2006). The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. Front. Biosci. *11*, 733–742.

Lau, K.S., and Haigis, K.M. (2009). Non-redundancy within the RAS oncogene family: insights into mutational disparities in cancer. Mol. Cells *28*, 315–320.

Lauss, M., Haq, R., Cirenajwis, H., Phung, B., Harbst, K., Staaf, J., Rosengren, F., Holm, K., Aine, M., Jirström, K., et al. (2015). Genome-Wide DNA Methylation Analysis in Melanoma Reveals the Importance of CpG Methylation in MITF Regulation. J. Invest. Dermatol. *135*, 1820–1828.

Lázár-Molnár, E., Hegyesi, H., Tóth, S., and Falus, A. (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. Cytokine *12*, 547–554.

Le Naour, F., Prenant, M., Francastel, C., Rubinstein, E., Uzan, G., and Boucheix, C. (1996). Transcriptional regulation of the human CD9 gene: characterization of the 5'-flanking region. Oncogene *13*, 481–486.

Le Naour, F., Charrin, S., Labas, V., Le Caer, J.-P., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2004). Tetraspanins connect several types of Ig proteins: IgM is a novel component of the tetraspanin web on B-lymphoid cells. Cancer Immunol. Immunother. *53*, 148–152.

Le Naour, F., André, M., Greco, C., Billard, M., Sordat, B., Emile, J.-F., Lanza, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2006a). Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. Mol. Cell Proteomics *5*, 845–857.

Le Naour, F., André, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2006b). Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. Proteomics *6*, 6447–6454.

Lebel-Binay, S., Lagaudrière, C., Fradelizi, D., and Conjeaud, H. (1995). CD82, tetra-span-transmembrane protein, is a regulated transducing molecule on U937 monocytic cell line. J. Leukoc. Biol. *57*, 956–963.

Lee, J.H., Bae, J.A., Lee, J.H., Seo, Y.-W., Kho, D.H., Sun, E.G., Lee, S.E., Cho, S.H., Joo, Y.E., Ahn, K.Y., et al. (2010). Glycoprotein 90K, downregulated in advanced colorectal cancer tissues, interacts with CD9/CD82 and suppresses the Wnt/beta-catenin signal via ISGylation of beta-catenin. Gut *59*, 907–917.

Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A., and Griffith, J. (1995). p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. Cell *81*, 1013–1020.

Levina, E., Oren, M., and Ben-Ze'ev, A. (2004). Downregulation of beta-catenin by p53 involves changes in the rate of beta-catenin phosphorylation and Axin dynamics. Oncogene *23*, 4444–4453.

Levy, S., and Shoham, T. (2005). Protein-protein interactions in the tetraspanin web. Physiology (Bethesda) *20*, 218–224.

Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. Trends Mol Med *12*, 406–414.

Li, A.G., Piluso, L.G., Cai, X., Wei, G., Sellers, W.R., and Liu, X. (2006a). Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN. Mol. Cell *23*, 575–587.

Li, D.W.-C., Liu, J.-P., Schmid, P.C., Schlosser, R., Feng, H., Liu, W.-B., Yan, Q., Gong, L., Sun, S.-M., Deng, M., et al. (2006b). Protein serine/threonine phosphatase-1 dephosphorylates p53 at Ser-15 and Ser-37 to modulate its transcriptional and apoptotic activities. Oncogene *25*, 3006–3022.

Li, G., Schaider, H., Satyamoorthy, K., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., and Herlyn, M. (2001a). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. Oncogene *20*, 8125–8135.

Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2001b). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. Cancer Res. *61*, 3819–3825.

Li, L.-H., He, J., Hua, D., Guo, Z.-J., and Gao, Q. (2011a). Lentivirus-mediated inhibition of Med19 suppresses growth of breast cancer cells in vitro. Cancer Chemother. Pharmacol. *68*, 207–215.

Li, Q., Yang, X.H., Xu, F., Sharma, C., Wang, H.-X., Knoblich, K., Rabinovitz, I., Granter, S.R., and Hemler, M.E. (2013). Tetraspanin CD151 plays a key role in skin squamous cell carcinoma. Oncogene *32*, 1772–1783.

Li, X.-H., Fang, D.-N., and Zeng, C.-M. (2011b). Knockdown of MED19 by short hairpin RNA-mediated gene silencing inhibits pancreatic cancer cell proliferation. Cancer Biother. Radiopharm. *26*, 495–501.

Li, Y.-J., Wei, Z.-M., Meng, Y.-X., and Ji, X.-R. (2005). Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. World J. Gastroenterol. *11*, 2117–2123.

Liu, L., He, B., Liu, W.M., Zhou, D., Cox, J.V., and Zhang, X.A. (2007). Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking. J. Biol. Chem. *282*, 31631–31642.

Liu, S., Ren, S., Howell, P., Fodstad, O., and Riker, A.I. (2008). Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. Pigment Cell Melanoma Res *21*, 545–558.

Liu, Y., Sun, S.-Y., Owonikoko, T.K., Sica, G.L., Curran, W.J., Khuri, F.R., and Deng, X. (2012a). Rapamycin induces Bad phosphorylation in association with its resistance to human lung cancer cells. Mol. Cancer Ther. *11*, 45–56.

Liu, Y., Tao, X., Fan, L., Jia, L., Gu, C., and Feng, Y. (2012b). Knockdown of mediator complex subunit 19 inhibits the growth of ovarian cancer. Mol Med Rep *6*, 1050–1056.

Loewe, R., Valero, T., Kremling, S., Pratscher, B., Kunstfeld, R., Pehamberger, H., and Petzelbauer, P. (2006). Dimethylfumarate impairs melanoma growth and metastasis. Cancer Res. *66*, 11888–11896.

Longo, N., Yáñez-Mó, M., Mittelbrunn, M., de la Rosa, G., Muñoz, M.L., Sánchez-Madrid, F., and Sánchez-Mateos, P. (2001). Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. Blood *98*, 3717–3726.

Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z., and Hunter, T. (2003). Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. Cancer Cell *4*, 499–515.

Lu, Z., Luo, T., Nie, M., Pang, T., Zhang, X., Shen, X., Ma, L., Bi, J., Wei, G., Fang, G., et al. (2015). TSPAN1 functions as an oncogene in gastric cancer and is downregulated by miR-573. FEBS Lett. *589*, 1988–1994.

Lucero, O.M., Dawson, D.W., Moon, R.T., and Chien, A.J. (2010). A re-evaluation of the "oncogenic" nature of Wnt/beta-catenin signaling in melanoma and other cancers. Curr Oncol Rep *12*, 314–318.

Luo, Y., Dallaglio, K., Chen, Y., Robinson, W.A., Robinson, S.E., McCarter, M.D., Wang, J., Gonzalez, R., Thompson, D.C., Norris, D.A., et al. (2012). ALDH1A Isozymes Are Markers of Human Melanoma Stem Cells and Potential Therapeutic Targets. Stem Cells *30*, 2100–2113.

Lupia, A., Peppicelli, S., Witort, E., Bianchini, F., Carloni, V., Pimpinelli, N., Urso, C., Borgognoni, L., Capaccioli, S., Calorini, L., et al. (2014). CD63 tetraspanin is a negative driver of epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma cells. J. Invest. Dermatol. *134*, 2947–2956.

MacDonald, B.T., and He, X. (2012). Frizzled and LRP5/6 Receptors for Wnt/β-Catenin Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol *4*.

Mackenzie Ross, A.D., Cook, M.G., Chong, H., Hossain, M., Pandha, H.S., and Bennett, D.C. (2013). Senescence evasion in melanoma progression: uncoupling of DNA-damage signaling from p53 activation and p21 expression. Pigment Cell Melanoma Res *26*, 226–235.

Madhunapantula, S.V., and Robertson, G.P. (2009). The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma. Pigment Cell Melanoma Res *22*, 400–419.

Maelandsmo, G.M., Holm, R., Nesland, J.M., Fodstad, Ø., and Florenes, V.A. (2003). Reduced beta-catenin expression in the cytoplasm of advanced-stage superficial spreading malignant melanoma. Clin. Cancer Res. *9*, 3383–3388.

Marasigan, V., Morren, M.-A., Lambert, J., Medaer, K., Fieuws, S., Nijsten, T., and Garmyn, M. (2016). Inverse Association Between Atopy and Melanoma: A Case-control Study. Acta Derm. Venereol.

Marcel, V., Dichtel-Danjoy, M.-L., Sagne, C., Hafsi, H., Ma, D., Ortiz-Cuaran, S., Olivier, M., Hall, J., Mollereau, B., Hainaut, P., et al. (2011). Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. Cell Death Differ. *18*, 1815–1824.

Marreiros, A., Czolij, R., Yardley, G., Crossley, M., and Jackson, P. (2003). Identification of regulatory regions within the KAI1 promoter: a role for binding of AP1, AP2 and p53. Gene *302*, 155–164.

Marreiros, A., Dudgeon, K., Dao, V., Grimm, M.-O., Czolij, R., Crossley, M., and Jackson, P. (2005). KAI1 promoter activity is dependent on p53, junB and AP2: evidence for a possible mechanism underlying loss of KAI1 expression in cancer cells. Oncogene *24*, 637–649.

Masciopinto, F., Campagnoli, S., Abrignani, S., Uematsu, Y., and Pileri, P. (2001). The small extracellular loop of CD81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative HCV receptor. Virus Res. *80*, 1–10.

Mashimo, T., Watabe, M., Hirota, S., Hosobe, S., Miura, K., Tegtmeyer, P.J., Rinker-Shaeffer, C.W., and Watabe, K. (1998). The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *95*, 11307–11311.

Masse, I., Agaësse, G., and Berthier-Vergnes, O. (2016). [Tetraspanins in cutaneous physiopathology]. Med Sci (Paris) *32*, 267–273.

Maturana, J.L., Niechi, I., Silva, E., Huerta, H., Cataldo, R., Härtel, S., Barros, L.F., Galindo, M., and Tapia, J.C. (2015). Transactivation activity and nucleocytoplasmic transport of β-catenin are independently regulated by its C-terminal end. Gene *573*, 115–122.

Mavila, N., James, D., Utley, S., Cu, N., Coblens, O., Mak, K., Rountree, C.B., Kahn, M., and Wang, K.S. (2012). Fibroblast growth factor receptor-mediated activation of AKT-β-catenin-CBP pathway regulates survival and proliferation of murine hepatoblasts and hepatic tumor initiating stem cells. PLoS ONE *7*, e50401.

Mekky, R.Y., El-Ekiaby, N.M., Hamza, M.T., Elemam, N.M., El-Sayed, M., Esmat, G., and Abdelaziz, A.I. (2015). Mir-194 is a hepatocyte gate keeper hindering HCV entry through targeting CD81 receptor. J. Infect. *70*, 78–87.

Meyer, K.D., Lin, S.-C., Bernecky, C., Gao, Y., and Taatjes, D.J. (2010). p53 activates transcription by directing structural shifts in Mediator. Nat. Struct. Mol. Biol. *17*, 753–760.

Millet, A., Martin, A.R., Ronco, C., Rocchi, S., and Benhida, R. (2016). Metastatic Melanoma: Insights Into the Evolution of the Treatments and Future Challenges. Med Res Rev.

Minner, S., De Silva, C., Rink, M., Dahlem, R., Chun, F., Fisch, M., Höppner, W., Wagner, W., Bokemeyer, C., Terracciano, L., et al. (2012). Reduced CD151 expression is related to advanced tumour stage in urothelial bladder cancer. Pathology *44*, 448–452.

Miravet, S., Piedra, J., Castaño, J., Raurell, I., Francí, C., Duñach, M., and García de Herreros, A. (2003). Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription. Mol. Cell. Biol. *23*, 7391–7402.

Miyake, M., Nakano, K., Itoi, S.I., Koh, T., and Taki, T. (1996). Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. Cancer Res. *56*, 1244–1249.

Mori, M., Mimori, K., Shiraishi, T., Haraguchi, M., Ueo, H., Barnard, G.F., and Akiyoshi, T. (1998). Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression in colon cancer. Clin. Cancer Res. *4*, 1507–1510.

Mosig, R.A., Lin, L., Senturk, E., Shah, H., Huang, F., Schlosshauer, P., Cohen, S., Fruscio, R., Marchini, S., D'Incalci, M., et al. (2012). Application of RNA-Seq transcriptome analysis: CD151 is an Invasion/Migration target in all stages of epithelial ovarian cancer. J Ovarian Res *5*, 4.

Mottaghi-Dastjerdi, N., Soltany-Rezaee-Rad, M., Sepehrizadeh, Z., Roshandel, G., Ebrahimifard, F., and Setayesh, N. (2015). Identification of novel genes involved in gastric carcinogenesis by suppression subtractive hybridization. Hum Exp Toxicol *34*, 3–11.

Murakami, H., and Arnheiter, H. (2005). Sumoylation modulates transcriptional activity of MITF in a promoter-specific manner. Pigment Cell Res. *18*, 265–277.

Murayama, Y., Shinomura, Y., Oritani, K., Miyagawa, J.-I., Yoshida, H., Nishida, M., Katsube, F., Shiraga, M., Miyazaki, T., Nakamoto, T., et al. (2008). The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. J. Cell. Physiol. *216*, 135–143.

Murayama, Y., Oritani, K., and Tsutsui, S. (2015). Novel CD9-targeted therapies in gastric cancer. World J. Gastroenterol. *21*, 3206–3213.

Murray, H.C., Maltby, V.E., Smith, D.W., and Bowden, N.A. (2015). Nucleotide excision repair deficiency in melanoma in response to UVA. Exp Hematol Oncol *5*, 6.

Murray-Zmijewski, F., Lane, D.P., and Bourdon, J.-C. (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. Cell Death Differ. *13*, 962–972.

Naughton, R., Quiney, C., Turner, S.D., and Cotter, T.G. (2009). Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. Leukemia *23*, 1432–1440.

Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., Preissner, K.T., and Zöller, M. (2010). Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. Cancer Res. *70*, 1668–1678.

van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., and Raposo, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. Dev. Cell *21*, 708–721.

Nieset, J.E., Redfield, A.R., Jin, F., Knudsen, K.A., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (1997). Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. J. Cell. Sci. *110 (Pt 8)*, 1013–1022.

Nishida, H., Yamazaki, H., Yamada, T., Iwata, S., Dang, N.H., Inukai, T., Sugita, K., Ikeda, Y., and Morimoto, C. (2009). CD9 correlates with cancer stem cell potentials in human B-acute lymphoblastic leukemia cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *382*, 57–62.

Nishimori, H., Yasoshima, T., Denno, R., Shishido, T., Hata, F., Honma, T., Ura, H., Yamaguchi, K., Yagihashi, A., Tanaka, H., et al. (2001). A new peritoneal dissemination model established from the human pancreatic cancer cell line. Pancreas *22*, 348–356.

Novak, M., Leonard, M.K., Yang, X.H., Kowluru, A., Belkin, A.M., and Kaetzel, D.M. (2015). Metastasis suppressor NME1 regulates melanoma cell morphology, self-adhesion and motility via induction of fibronectin expression. Exp. Dermatol. *24*, 455–461.

Odintsova, E., Sugiura, T., and Berditchevski, F. (2000). Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. Curr. Biol. *10*, 1009–1012.

Odintsova, E., Butters, T.D., Monti, E., Sprong, H., van Meer, G., and Berditchevski, F. (2006). Gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains. Biochem. J. *400*, 315–325.

Odintsova, E., van Niel, G., Conjeaud, H., Raposo, G., Iwamoto, R., Mekada, E., and Berditchevski, F. (2013). Metastasis suppressor tetraspanin CD82/KAI1 regulates ubiquitylation of epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. *288*, 26323–26334.

Olsson, A., Manzl, C., Strasser, A., and Villunger, A. (2007). How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? Cell Death Differ. *14*, 1561–1575.

Omholt, K., Platz, A., Ringborg, U., and Hansson, J. (2001). Cytoplasmic and nuclear accumulation of beta-catenin is rarely caused by CTNNB1 exon 3 mutations in cutaneous malignant melanoma. Int. J. Cancer *92*, 839–842.

Osawa, M. (2008). Melanocyte stem cells. In StemBook, (Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute), p.

Otomo, R., Otsubo, C., Matsushima-Hibiya, Y., Miyazaki, M., Tashiro, F., Ichikawa, H., Kohno, T., Ochiya, T., Yokota, J., Nakagama, H., et al. (2014). TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *111*, 18691–18696.

Ozola, A., and Pjanova, D. (2015). The lack of E318K MITF germline mutation in Latvian melanoma patients. Cancer Genet *208*, 355–356.

Paillerets, B.B., Lesueur, F., and Bertolotto, C. (2014). A germline oncogenic MITF mutation and tumor susceptibility. Eur. J. Cell Biol. *93*, 71–75.

Pan, L., Ma, X., Wen, B., Su, Z., Zheng, X., Liu, Y., Li, H., Chen, Y., Wang, J., Lu, F., et al. (2015a). Microphthalmia-associated transcription factor/T-box factor-2 axis acts through Cyclin D1 to regulate melanocyte proliferation. Cell Prolif. *48*, 631–642.

Pan, S.-J., Wu, Y.-B., Cai, S., Pan, Y.-X., Liu, W., Bian, L.-G., Sun, B., and Sun, Q.-F. (2015b). Over-expression of tetraspanin 8 in malignant glioma regulates tumor cell progression. Biochemical and Biophysical Research Communications *458*, 476–482.

Pan, S.-J., Zhan, S.-K., Pan, Y.-X., Liu, W., Bian, L.-G., Sun, B., and Sun, Q.-F. (2015c). Tetraspanin 8-rictor-integrin α3 complex is required for glioma cell migration. Int J Mol Sci *16*, 5363–5374.

Pap, M., and Cooper, G.M. (1998). Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. J. Biol. Chem. *273*, 19929–19932.

Paraiso, K.H.T., Xiang, Y., Rebecca, V.W., Abel, E.V., Chen, Y.A., Munko, A.C., Wood, E., Fedorenko, I.V., Sondak, V.K., Anderson, A.R.A., et al. (2011). PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. Cancer Res. *71*, 2750–2760.

Park, C.S., Kim, T.-K., Kim, H.G., Kim, Y.-J., Jeoung, M.H., Lee, W.R., Go, N.K., Heo, K., and Lee, S. (2016). Therapeutic targeting of tetraspanin8 in epithelial ovarian cancer invasion and metastasis. Oncogene *35*, 4540–4548.

Park, K.R., Inoue, T., Ueda, M., Hirano, T., Higuchi, T., Konishi, I., Fujiwara, H., and Fujii, S. (2000). Anti-CD9 monoclonal antibody-stimulated invasion of endometrial cancer cell lines in vitro: possible inhibitory effect of CD9 in endometrial cancer invasion. Mol. Hum. Reprod. *6*, 719–725.

Paszkowska-Szczur, K., Scott, R.J., Serrano-Fernandez, P., Mirecka, A., Gapska, P., Górski, B., Cybulski, C., Maleszka, R., Sulikowski, M., Nagay, L., et al. (2013). Xeroderma pigmentosum genes and melanoma risk. Int. J. Cancer *133*, 1094–1100.

Pedeux, R., Sengupta, S., Shen, J.C., Demidov, O.N., Saito, S. 'ichi, Onogi, H., Kumamoto, K., Wincovitch, S., Garfield, S.H., McMenamin, M., et al. (2005). ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. Mol. Cell. Biol. *25*, 6639–6648.

Peifer, M., and Wieschaus, E. (1990). The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin. Cell *63*, 1167–1176.

Pérez-Alea, M., Vivancos, A., Caratú, G., Matito, J., Ferrer, B., Hernandez-Losa, J., Cortés, J., Muñoz, E., Garcia-Patos, V., and Recio, J.A. (2016). Genetic profile of GNAQ-mutated blue melanocytic neoplasms reveals mutations in genes linked to genomic instability and the PI3K pathway. Oncotarget *7*, 28086–28095.

Pérez-Losada, J., Sánchez-Martín, M., Rodríguez-García, A., Sánchez, M.L., Orfao, A., Flores, T., and Sánchez-García, I. (2002). Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. Blood *100*, 1274–1286.

Perrotta, C., Buonanno, F., Zecchini, S., Giavazzi, A., Proietti Serafini, F., Catalani, E., Guerra, L., Belardinelli, M.C., Picchietti, S., Fausto, A.M., et al. (2016). Climacostol reduces tumour progression in a mouse model of melanoma via the p53-dependent intrinsic apoptotic programme. Sci Rep *6*, 27281.

Persad, S., Troussard, A.A., McPhee, T.R., Mulholland, D.J., and Dedhar, S. (2001). Tumor suppressor PTEN inhibits nuclear accumulation of beta-catenin and T cell/lymphoid enhancer factor 1-mediated transcriptional activation. J. Cell Biol. *153*, 1161–1174.

Persson, F., Olofsson, A., Sjögren, H., Chebbo, N., Nilsson, B., Stenman, G., and Aman, P. (2008). Characterization of the 12q amplicons by high-resolution, oligonucleotide array CGH and expression analyses of a novel liposarcoma cell line. Cancer Lett. *260*, 37–47.

Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., and Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum. Mutat. *28*, 622–629.

Plaschka, C., Larivière, L., Wenzeck, L., Seizl, M., Hemann, M., Tegunov, D., Petrotchenko, E.V., Borchers, C.H., Baumeister, W., Herzog, F., et al. (2015). Architecture of the RNA polymerase II-Mediator core initiation complex. Nature *518*, 376–380.

Playford, M.P., Bicknell, D., Bodmer, W.F., and Macaulay, V.M. (2000). Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 12103–12108.

Pokutta, S., and Weis, W.I. (2007). Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *23*, 237–261.

Pollock, P.M., and Hayward, N. (2002). Mutations in exon 3 of the beta-catenin gene are rare in melanoma cell lines. Melanoma Res. *12*, 183–186.

Powner, D., Kopp, P.M., Monkley, S.J., Critchley, D.R., and Berditchevski, F. (2011). Tetraspanin CD9 in cell migration. Biochem. Soc. Trans. *39*, 563–567.

Qi, J., Chen, N., Wang, J., and Siu, C.-H. (2005). Transendothelial Migration of Melanoma Cells Involves N-Cadherin-mediated Adhesion and Activation of the β-Catenin Signaling Pathway. Mol Biol Cell *16*, 4386–4397.

Radford, K.J., Mallesch, J., and Hersey, P. (1995). Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). Int. J. Cancer *62*, 631–635.

Radford, K.J., Thorne, R.F., and Hersey, P. (1996). CD63 associates with transmembrane 4 superfamily members, CD9 and CD81, and with beta 1 integrins in human melanoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. *222*, 13–18.

Radford, K.J., Thorne, R.F., and Hersey, P. (1997). Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. J. Immunol. *158*, 3353–3358.

Rana, S., and Zöller, M. (2011). Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis. Biochem. Soc. Trans. *39*, 559–562.

Rangaswami, H., Bulbule, A., and Kundu, G.C. (2004). Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. J. Biol. Chem. *279*, 38921–38935.

Ray, P.S., Grover, R., and Das, S. (2006). Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. EMBO Rep. *7*, 404–410.

Rebocho, A.P., and Marais, R. (2013). ARAF acts as a scaffold to stabilize BRAF:CRAF heterodimers. Oncogene *32*, 3207–3212.

Reifenberger, J., Knobbe, C.B., Wolter, M., Blaschke, B., Schulte, K.W., Pietsch, T., Ruzicka, T., and Reifenberger, G. (2002). Molecular genetic analysis of malignant melanomas for aberrations of the WNT signaling pathway genes CTNNB1, APC, ICAT and BTRC. Int. J. Cancer *100*, 549–556.

Reisman, D., Takahashi, P., Polson, A., and Boggs, K. (2012). Transcriptional Regulation of the p53 Tumor Suppressor Gene in S-Phase of the Cell-Cycle and the Cellular Response to DNA Damage. Biochem Res Int *2012*, 808934.

Ribas, A., Puzanov, I., Dummer, R., Schadendorf, D., Hamid, O., Robert, C., Hodi, F.S., Schachter, J., Pavlick, A.C., Lewis, K.D., et al. (2015). Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. The Lancet Oncology *16*, 908–918.

Ricca, T.I., Liang, G., Suenaga, A.P.M., Han, S.W., Jones, P.A., and Jasiulionis, M.G. (2009). Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression associated with gene demethylation confers anoikis resistance in early phases of melanocyte malignant transformation. Transl Oncol *2*, 329–340.

Robert, C., Karaszewska, B., Schachter, J., Rutkowski, P., Mackiewicz, A., Stroiakovski, D., Lichinitser, M., Dummer, R., Grange, F., Mortier, L., et al. (2015). Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. New England Journal of Medicine *372*, 30–39.

Rodeck, U., Becker, D., and Herlyn, M. (1991). Basic fibroblast growth factor in human melanoma. Cancer Cells *3*, 308–311.

Rodia, M.T., Ugolini, G., Mattei, G., Montroni, I., Zattoni, D., Ghignone, F., Veronese, G., Marisi, G., Lauriola, M., Strippoli, P., et al. (2016). Systematic large-scale meta-analysis identifies a panel of two mRNAs as blood biomarkers for colorectal cancer detection. Oncotarget *7*, 30295–30306.

Romanska, H.M., Potemski, P., Krakowska, M., Mieszkowska, M., Chaudhri, S., Kordek, R., Kubiak, R., Speirs, V., Hanby, A.M., Sadej, R., et al. (2015). Lack of CD151/integrin α3β1 complex is predictive of poor outcome in node-negative lobular breast carcinoma: opposing roles of CD151 in invasive lobular and ductal breast cancers. Br. J. Cancer *113*, 1350–1357.

Roselli, S., Kahl, R.G.S., Copeland, B.T., Naylor, M.J., Weidenhofer, J., Muller, W.J., and Ashman, L.K. (2014). Deletion of Cd151 reduces mammary tumorigenesis in the MMTV/PyMT mouse model. BMC Cancer *14*, 509.

Rosenberg, S.A. (2014). IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. J. Immunol. *192*, 5451–5458.

Roth, I., Campbell, H., Rubio, C., Vennin, C., Wilson, M., Wiles, A., Williams, G., Woolley, A., Timpson, P., Berridge, M.V., et al. (2016). The Δ133p53 isoform and its mouse analogue Δ122p53 promote invasion and metastasis involving pro-inflammatory molecules interleukin-6 and CCL2. Oncogene *35*, 4981–4989.

Rous, B.A., Reaves, B.J., Ihrke, G., Briggs, J.A.G., Gray, S.R., Stephens, D.J., Banting, G., and Luzio, J.P. (2002). Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. Mol. Biol. Cell *13*, 1071–1082.

Roy, M., Li, Z., and Sacks, D.B. (2004). IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. J. Biol. Chem. *279*, 17329–17337.

Roy, M., Li, Z., and Sacks, D.B. (2005). IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. Mol. Cell. Biol. *25*, 7940–7952.

Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., and Polakis, P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. Science *275*, 1790–1792.

Ruptier, C., De Gaspéris, A., Ansieau, S., Granjon, A., Tanière, P., Lafosse, I., Shi, H., Petitjean, A., Taranchon-Clermont, E., Tribollet, V., et al. (2011). TP63 P2 promoter functional analysis identifies β-catenin as a key regulator of ΔNp63 expression. Oncogene *30*, 4656–4665.

Sadej, R., Romanska, H., Baldwin, G., Gkirtzimanaki, K., Novitskaya, V., Filer, A.D., Krcova, Z., Kusinska, R., Ehrmann, J., Buckley, C.D., et al. (2009). CD151 regulates tumorigenesis by modulating the communication between tumor cells and endothelium. Mol. Cancer Res. *7*, 787–798.

Sadej, R., Grudowska, A., Turczyk, L., Kordek, R., and Romanska, H.M. (2014). CD151 in cancer progression and metastasis: a complex scenario. Lab. Invest. *94*, 41–51.

Sadot, E., Geiger, B., Oren, M., and Ben-Ze'ev, A. (2001). Down-regulation of beta-catenin by activated p53. Mol. Cell. Biol. *21*, 6768–6781.

Saito, N., Hamada, J., Furukawa, H., Tsutsumida, A., Oyama, A., Funayama, E., Saito, A., Tsuji, T., Tada, M., Moriuchi, T., et al. (2009). Laminin-421 produced by lymphatic endothelial cells induces chemotaxis for human melanoma cells. Pigment Cell Melanoma Res *22*, 601–610.

Satyamoorthy, K., Li, G., Vaidya, B., Patel, D., and Herlyn, M. (2001). Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. Cancer Res. *61*, 7318–7324.

Satyamoorthy, K., Li, G., Gerrero, M.R., Brose, M.S., Volpe, P., Weber, B.L., Van Belle, P., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. Cancer Res. *63*, 756–759.

Schartl, M., Wilde, B., Laisney, J.A.G.C., Taniguchi, Y., Takeda, S., and Meierjohann, S. (2010). A mutated EGFR is sufficient to induce malignant melanoma with genetic background-dependent histopathologies. J. Invest. Dermatol. *130*, 249–258.

Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., et al. (2008). Identification of cells initiating human melanomas. Nature *451*, 345–349.

Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. Nature *372*, 786–791.

Schmidt, D.-S., Klingbeil, P., Schnölzer, M., and Zöller, M. (2004). CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM. Exp. Cell Res. *297*, 329–347.

Scholz, C.-J., Sauer, G., and Deissler, H. (2009). Glycosylation of tetraspanin Tspan-1 at four distinct sites promotes its transition through the endoplasmic reticulum. Protein Pept. Lett. *16*, 1244–1248.

Seigneuret, M., Delaguillaumie, A., Lagaudrière-Gesbert, C., and Conjeaud, H. (2001). Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. J. Biol. Chem. *276*, 40055–40064.

Sela, B.A., Steplewski, Z., and Koprowski, H. (1989). Colon carcinoma-associated glycoproteins recognized by monoclonal antibodies CO-029 and GA22-2. Hybridoma *8*, 481–491.

Serru, V., Le Naour, F., Billard, M., Azorsa, D.O., Lanza, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (1999). Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. Biochem. J. *340 (Pt 1)*, 103–111.

Shao, H., Kirkwood, J.M., and Wells, A. (2015). Tenascin-C Signaling in melanoma. Cell Adh Migr *9*, 125–130.

Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. Cell *161*, 205–214.

Sharma, M., Jamieson, C., Johnson, M., Molloy, M.P., and Henderson, B.R. (2012). Specific armadillo repeat sequences facilitate β-catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. J. Biol. Chem. *287*, 819–831.

Sheridan, C., Brumatti, G., and Martin, S.J. (2008). Oncogenic B-RafV600E inhibits apoptosis and promotes ERK-dependent inactivation of Bad and Bim. J. Biol. Chem. *283*, 22128–22135.

Shoham, T., Rajapaksa, R., Boucheix, C., Rubinstein, E., Poe, J.C., Tedder, T.F., and Levy, S. (2003). The tetraspanin CD81 regulates the expression of CD19 during B cell development in a postendoplasmic reticulum compartment. J. Immunol. *171*, 4062–4072.

Shull, A.Y., Latham-Schwark, A., Ramasamy, P., Leskoske, K., Oroian, D., Birtwistle, M.R., and Buckhaults, P.J. (2012). Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. PLoS ONE *7*, e43369.

Sikora, L.K., Pinto, A., Demetrick, D.J., Dixon, W.T., Urbanski, S.J., Temple, W., and Jerry, L.M. (1987). Characterization of a novel neuroglandular antigen (NGA) expressed on abnormal human melanocytes. Int. J. Cancer *39*, 138–145.

Simon, J.D., Peles, D., Wakamatsu, K., and Ito, S. (2009). Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. Pigment Cell Melanoma Res *22*, 563–579.

Sinnberg, T., Menzel, M., Ewerth, D., Sauer, B., Schwarz, M., Schaller, M., Garbe, C., and Schittek, B. (2011). β-Catenin signaling increases during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance. PLoS ONE *6*, e23429.

Smalley, K.S.M., and Herlyn, M. (2009). Integrating tumor-initiating cells into the paradigm for melanoma targeted therapy. Int. J. Cancer *124*, 1245–1250.

Soyuer, S., Soyuer, I., Unal, D., Ucar, K., Yildiz, O.G., and Orhan, O. (2010). Prognostic significance of CD9 expression in locally advanced gastric cancer treated with surgery and adjuvant chemoradiotherapy. Pathol. Res. Pract. *206*, 607–610.

Staal, F.J.T., Noort, M. van, Strous, G.J., and Clevers, H.C. (2002). Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated β-catenin. EMBO Reports *3*, 63–68.

Stahl, J.M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J.Q., Bosenberg, M.W., Kester, M., Sandirasegarane, L., and Robertson, G.P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. Cancer Res. *64*, 7002–7010.

Steder, M., Alla, V., Meier, C., Spitschak, A., Pahnke, J., Fürst, K., Kowtharapu, B.S., Engelmann, D., Petigk, J., Egberts, F., et al. (2013). DNp73 exerts function in metastasis initiation by disconnecting the inhibitory role of EPLIN on IGF1R-AKT/STAT3 signaling. Cancer Cell *24*, 512–527.

Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Kempf, R.C., Long, J., Laidler, P., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Stivala, F., Mazzarino, M.C., et al. (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. Aging (Albany NY) *3*, 192–222.

Stewart, A.L., Mhashilkar, A.M., Yang, X.H., Ekmekcioglu, S., Saito, Y., Sieger, K., Schrock, R., Onishi, E., Swanson, X., Mumm, J.B., et al. (2002). PI3 kinase blockade by Ad-PTEN inhibits invasion and induces apoptosis in RGP and metastatic melanoma cells. Mol. Med. *8*, 451–461.

Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E. (2001). EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. J. Biol. Chem. *276*, 40545–40554.

Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E. (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. Trends Biochem. Sci. *28*, 106–112.

Sugimoto, M., Gromley, A., and Sherr, C.J. (2006). Hzf, a p53-responsive gene, regulates maintenance of the G2 phase checkpoint induced by DNA damage. Mol. Cell. Biol. *26*, 502–512.

Sullivan, A., and Lu, X. (2007). ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes. Br. J. Cancer *96*, 196–200.

Sun, M., Jiang, R., Li, J.-D., Luo, S.-L., Gao, H.-W., Jin, C.-Y., Shi, D.-L., Wang, C.-G., Wang, B., and Zhang, X.-Y. (2011). MED19 promotes proliferation and tumorigenesis of lung cancer. Mol. Cell. Biochem. *355*, 27–33.

Szala, S., Kasai, Y., Steplewski, Z., Rodeck, U., Koprowski, H., and Linnenbach, A.J. (1990). Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *87*, 6833–6837.

Szöllósi, J., Horejsí, V., Bene, L., Angelisová, P., and Damjanovich, S. (1996). Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. J. Immunol. *157*, 2939–2946.

Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., Adachi, S., Ohwada, S., Morishita, Y., Shibuya, H., et al. (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. Genes Dev. *14*, 1741–1749.

Takaoka, A., Hinoda, Y., Sato, S., Itoh, F., Adachi, M., Hareyama, M., and Imai, K. (1998). Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. Jpn. J. Cancer Res. *89*, 397–404.

Takeda, T., Hattori, N., Tokuhara, T., Nishimura, Y., Yokoyama, M., and Miyake, M. (2007). Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model. Cancer Res. *67*, 1744–1749.

Takeda, Y., Li, Q., Kazarov, A.R., Epardaud, M., Elpek, K., Turley, S.J., and Hemler, M.E. (2011). Diminished metastasis in tetraspanin CD151-knockout mice. Blood *118*, 464–472.

Tanaka, F., Hori, N., and Sato, K. (2002). Identification of differentially expressed genes in rat hepatoma cell lines using subtraction and microarray. J. Biochem. *131*, 39–44.

Tang, M., Yin, G., Wang, F., Liu, H., Zhou, S., Ni, J., Chen, C., Zhou, Y., and Zhao, Y. (2015a). Downregulation of CD9 promotes pancreatic cancer growth and metastasis through upregulation of epidermal growth factor on the cell surface. Oncol. Rep. *34*, 350–358.

Tang, Y., Cheng, Y., Martinka, M., Ong, C.J., and Li, G. (2014). Prognostic significance of KAI1/CD82 in human melanoma and its role in cell migration and invasion through the regulation of ING4. Carcinogenesis *35*, 86–95.

Tang, Y., Bhandaru, M., Cheng, Y., Lu, J., Li, G., and Ong, C.J. (2015b). The role of the metastasis suppressor gene KAI1 in melanoma angiogenesis. Pigment Cell Melanoma Res *28*, 696–706.

Terzian, T., Torchia, E.C., Dai, D., Robinson, S.E., Murao, K., Stiegmann, R.A., Gonzalez, V., Boyle, G.M., Powell, M.B., Pollock, P.M., et al. (2010). p53 prevents progression of nevi to melanoma predominantly through cell cycle regulation. Pigment Cell Melanoma Res *23*, 781–794.

Thangasamy, T., Sittadjody, S., Mitchell, G.C., Mendoza, E.E., Radhakrishnan, V.M., Limesand, K.H., and Burd, R. (2010). Quercetin abrogates chemoresistance in melanoma cells by modulating deltaNp73. BMC Cancer *10*, 282.

Théry, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat. Rev. Immunol. *2*, 569–579.

Todeschini, A.R., Dos Santos, J.N., Handa, K., and Hakomori, S. (2007). Ganglioside GM2-tetraspanin CD82 complex inhibits met and its cross-talk with integrins, providing a basis for control of cell motility through glycosynapse. J. Biol. Chem. *282*, 8123–8133.

Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. Nat. Rev. Cancer *6*, 909–923.

Toricelli, M., Melo, F.H.M., Peres, G.B., Silva, D.C.P., and Jasiulionis, M.G. (2013). Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation. Mol. Cancer *12*, 22.

Toschi, E., Rota, R., Antonini, A., Melillo, G., and Capogrossi, M.C. (2000). Wild-type p53 gene transfer inhibits invasion and reduces matrix metalloproteinase-2 levels in p53-mutated human melanoma cells. J. Invest. Dermatol. *114*, 1188–1194.

Tsai, Y.C., and Weissman, A.M. (2011). Dissecting the diverse functions of the metastasis suppressor CD82/KAI1. FEBS Lett. *585*, 3166–3173.

Turenne, G.A., and Price, B.D. (2001). Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. BMC Cell Biol. *2*, 12.

Vaid, M., Prasad, R., Sun, Q., and Katiyar, S.K. (2011). Silymarin Targets β-Catenin Signaling in Blocking Migration/Invasion of Human Melanoma Cells. PLoS One *6*.

Vajdic, C.M., van Leeuwen, M.T., Webster, A.C., McCredie, M.R.E., Stewart, J.H., Chapman, J.R., Amin, J., McDonald, S.P., and Grulich, A.E. (2009). Cutaneous melanoma is related to immune suppression in kidney transplant recipients. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. *18*, 2297–2303.

Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012). The many faces and functions of β-catenin. EMBO J. *31*, 2714–2736.

Vaseva, A.V., Marchenko, N.D., Ji, K., Tsirka, S.E., Holzmann, S., and Moll, U.M. (2012). p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. Cell *149*, 1536–1548.

Vennepureddy, A., Thumallapally, N., Motilal Nehru, V., Atallah, J.-P., and Terjanian, T. (2016). Novel Drugs and Combination Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma. J Clin Med Res *8*, 63–75.

Verhaegen, M., Checinska, A., Riblett, M.B., Wang, S., and Soengas, M.S. (2012). E2F1-dependent oncogenic addiction of melanoma cells to MDM2. Oncogene *31*, 828–841.

Videira, I.F. dos S., Moura, D.F.L., and Magina, S. (2013). Mechanisms regulating melanogenesis. An Bras Dermatol *88*, 76–83.

Vleminckx, K., Kemler, R., and Hecht, A. (1999). The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/beta-catenin complex in Xenopus laevis. Mech. Dev. *81*, 65–74.

Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. Cell *137*, 413–431.

Wan, P.T.C., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., et al. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell *116*, 855–867.

Wang, B., Xiao, Z., and Ren, E.C. (2009a). Redefining the p53 response element. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 14373–14378.

Wang, B., Xiao, Z., Ko, H.L., and Ren, E.C. (2010). The p53 response element and transcriptional repression. Cell Cycle *9*, 870–879.

Wang, F., Vandepoele, K., and Van Lijsebettens, M. (2012). Tetraspanin genes in plants. Plant Sci. *190*, 9–15.

Wang, H., Rana, S., Giese, N., Büchler, M.W., and Zöller, M. (2013). Tspan8, CD44v6 and alpha6beta4 are biomarkers of migrating pancreatic cancer-initiating cells. Int. J. Cancer *133*, 416–426.

Wang, H.-X., Sharma, C., Knoblich, K., Granter, S.R., and Hemler, M.E. (2015). EWI-2 negatively regulates TGF-β signaling leading to altered melanoma growth and metastasis. Cell Res. *25*, 370–385.

Wang, T., Hao, L., Feng, Y., Wang, G., Qin, D., and Gu, G. (2011). Knockdown of MED19 by lentivirus-mediated shRNA in human osteosarcoma cells inhibits cell proliferation by inducing cell cycle arrest in the G0/G1 phase. Oncol. Res. *19*, 193–201.

Wang, X., Yu, H., Lu, X., Zhang, P., Wang, M., and Hu, Y. (2014). MiR-22 suppresses the proliferation and invasion of gastric cancer cells by inhibiting CD151. Biochem. Biophys. Res. Commun. *445*, 175–179.

Wang, Y., Digiovanna, J.J., Stern, J.B., Hornyak, T.J., Raffeld, M., Khan, S.G., Oh, K.-S., Hollander, M.C., Dennis, P.A., and Kraemer, K.H. (2009b). Evidence of ultraviolet type mutations in xeroderma pigmentosum melanomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 6279–6284.

Wang, Y.F., Jiang, C.C., Kiejda, K.A., Gillespie, S., Zhang, X.D., and Hersey, P. (2007). Apoptosis induction in human melanoma cells by inhibition of MEK is caspase-independent and mediated by the Bcl-2 family members PUMA, Bim, and Mcl-1. Clin. Cancer Res. *13*, 4934–4942.

Watcharasit, P., Bijur, G.N., Zmijewski, J.W., Song, L., Zmijewska, A., Chen, X., Johnson, G.V.W., and Jope, R.S. (2002). Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 7951–7955.

Watcharasit, P., Bijur, G.N., Song, L., Zhu, J., Chen, X., and Jope, R.S. (2003). Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53. J. Biol. Chem. *278*, 48872–48879.

Webster, M.R., Kugel, C.H., and Weeraratna, A.T. (2015a). The Wnts of change: How Wnts regulate phenotype switching in melanoma. Biochim. Biophys. Acta *1856*, 244–251.

Webster, M.R., Xu, M., Kinzler, K.A., Kaur, A., Appleton, J., O'Connell, M.P., Marchbank, K., Valiga, A., Dang, V.M., Perego, M., et al. (2015b). Wnt5A promotes an adaptive, senescent-like stress response, while continuing to drive invasion in melanoma cells. Pigment Cell Melanoma Res *28*, 184–195.

Weeraratna, A.T. (2005). A Wnt-er wonderland--the complexity of Wnt signaling in melanoma. Cancer Metastasis Rev. *24*, 237–250.

Wei, L., Li, Y., and Suo, Z. (2015). TSPAN8 promotes gastric cancer growth and metastasis via ERK MAPK pathway. Int J Clin Exp Med *8*, 8599–8607.

Wei, Q., Zhang, F., Richardson, M.M., Roy, N.H., Rodgers, W., Liu, Y., Zhao, W., Fu, C., Ding, Y., Huang, C., et al. (2014). CD82 restrains pathological angiogenesis by altering lipid raft clustering and CD44 trafficking in endothelial cells. Circulation *130*, 1493–1504.

Weinstein, I.B., and Joe, A. (2008). Oncogene addiction. Cancer Res. *68*, 3077–3080; discussion 3080.

Weiss, M.B., Abel, E.V., Mayberry, M.M., Basile, K.J., Berger, A.C., and Aplin, A.E. (2012). TWIST1 is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells. Cancer Res. *72*, 6382–6392.

Wellbrock, C., and Arozarena, I. (2015). Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. Pigment Cell Melanoma Res *28*, 390–406.

Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 875–885.

Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., and Marais, R. (2008). Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. PLoS ONE *3*, e2734.

Wen, H., Feng, C., Ding, G., Meng, D., Ding, Q., Fang, Z., Xia, G., Xu, G., and Jiang, H. (2013). Med19 promotes bone metastasis and invasiveness of bladder urothelial carcinoma via bone morphogenetic protein 2. Ann Diagn Pathol *17*, 259–264.

White, C.D., Brown, M.D., and Sacks, D.B. (2009). IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. FEBS Lett. *583*, 1817–1824.

Whiteman, D.C., Baade, P.D., and Olsen, C.M. (2015). More people die from thin melanomas (⩽1 mm) than from thick melanomas (>4 mm) in Queensland, Australia. J. Invest. Dermatol. *135*, 1190–1193.

Widlund, H.R., and Fisher, D.E. (2003). Microphthalamia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. Oncogene *22*, 3035–3041.

Wolchok, J.D., Thomas, L., Bondarenko, I.N., O'Day, S., Weber, J.S., Garbe, C., Francis, S., Ibrahim, R.A., Hoos, A., and Robert, C. (2011). Phase III randomized study of ipilimumab (IPI) plus dacarbazine (DTIC) versus DTIC alone as first-line treatment in patients with unresectable stage III or IV melanoma. J. Clin. Oncol. *29: 2011 (suppl; abstr LBA5)*.

Worm, J., Christensen, C., Grønbaek, K., Tulchinsky, E., and Guldberg, P. (2004). Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. Oncogene *23*, 5215–5226.

Wu, J., Peng, X., Zhou, A., Qiao, M., Wu, H., Xiao, H., Liu, G., Zheng, X., Zhang, S., and Mei, S. (2014). MiR-506 inhibits PRRSV replication in MARC-145 cells via CD151. Mol. Cell. Biochem. *394*, 275–281.

Wu, M., Hemesath, T.J., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Price, E.R., Fisher, D.Z., and Fisher, D.E. (2000). c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. Genes Dev. *14*, 301–312.

Wu, S., Cho, E., Li, W.-Q., Weinstock, M.A., Han, J., and Qureshi, A.A. (2016). History of Severe Sunburn and Risk of Skin Cancer Among Women and Men in 2 Prospective Cohort Studies. Am. J. Epidemiol. *183*, 824–833.

Xing, F., Persaud, Y., Pratilas, C.A., Taylor, B.S., Janakiraman, M., She, Q.-B., Gallardo, H., Liu, C., Merghoub, T., Hefter, B., et al. (2012). Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF. Oncogene *31*, 446–457.

Xing, Y., Takemaru, K.-I., Liu, J., Berndt, J.D., Zheng, J.J., Moon, R.T., and Xu, W. (2008). Crystal structure of a full-length beta-catenin. Structure *16*, 478–487.

Xu, D., Sharma, C., and Hemler, M.E. (2009). Tetraspanin12 regulates ADAM10-dependent cleavage of amyloid precursor protein. FASEB J. *23*, 3674–3681.

Xu, Y., Li, C., Tian, Q., Li, Y., Yang, Z., Liang, Z., and Chen, L. (2012). Suppression of lung cancer metastasis-related protein 1 promotes apoptosis in lung cancer cells. Int. J. Mol. Med. *30*, 1481–1486.

Yamaguchi, Y., and Hearing, V.J. (2009). Physiological factors that regulate skin pigmentation. Biofactors *35*, 193–199.

Yamaguchi, Y., Itami, S., Watabe, H., Yasumoto, K.-I., Abdel-Malek, Z.A., Kubo, T., Rouzaud, F., Tanemura, A., Yoshikawa, K., and Hearing, V.J. (2004). Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. J. Cell Biol. *165*, 275–285.

Yamazaki, H., Xu, C.W., Naito, M., Nishida, H., Okamoto, T., Ghani, F.I., Iwata, S., Inukai, T., Sugita, K., and Morimoto, C. (2011). Regulation of cancer stem cell properties by CD9 in human B-acute lymphoblastic leukemia. Biochem. Biophys. Res. Commun. *409*, 14–21.

Yáñez-Mó, M., Gutiérrez-López, M.D., and Cabañas, C. (2011). Functional interplay between tetraspanins and proteases. Cell. Mol. Life Sci. *68*, 3323–3335.

Yang, D.-Q., Halaby, M.-J., and Zhang, Y. (2006). The identification of an internal ribosomal entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. Oncogene *25*, 4613–4619.

Yang, X., Gu, Q., Lin, L., Li, S., Zhong, S., Li, Q., and Cui, Z. (2015). Nucleoporin 62-like protein activates canonical Wnt signaling through facilitating the nuclear import of β-catenin in zebrafish. Mol. Cell. Biol. *35*, 1110–1124.

Yang, Y., Dang, D., Mogi, S., and Ramos, D.M. (2004). Tenascin-C deposition requires beta3 integrin and Src. Biochem. Biophys. Res. Commun. *322*, 935–942.

Yauch, R.L., and Hemler, M.E. (2000). Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. Biochem. J. *351 Pt 3*, 629–637.

Yauch, R.L., Berditchevski, F., Harler, M.B., Reichner, J., and Hemler, M.E. (1998). Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. Mol. Biol. Cell *9*, 2751–2765.

Youlden, D.R., Baade, P.D., Peter Soyer, H., Youl, P.H., Kimlin, M.G., Aitken, J.F., Green, A.C., and Khosrotehrani, K. (2016). Ten-Year Survival after Multiple Invasive Melanomas Is Worse than after a Single Melanoma: a Population-Based Study. J. Invest. Dermatol.

Yu, W., Zhang, Z., Min, D., Yang, Q., Du, X., Tang, L., Lin, F., Sun, Y., Zhao, H., Zheng, S., et al. (2014). Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 19 promotes osteosarcoma growth and metastasis and associates with prognosis. Eur. J. Cancer *50*, 1125–1136.

Yue, G.G.-L., Lee, J.K.-M., Li, L., Chan, K.-M., Wong, E.C.-W., Chan, J.Y.-W., Fung, K.-P., Lui, V.W.Y., Chiu, P.W.-Y., and Lau, C.B.-S. (2015a). Andrographis paniculata elicits anti-invasion activities by suppressing TM4SF3 gene expression and by anoikis-sensitization in esophageal cancer cells. Am J Cancer Res *5*, 3570–3587.

Yue, S., Mu, W., and Zöller, M. (2013). Tspan8 and CD151 promote metastasis by distinct mechanisms. European Journal of Cancer *49*, 2934–2948.

Yue, S., Mu, W., Erb, U., and Zöller, M. (2015b). The tetraspanins CD151 and Tspan8 are essential exosome components for the crosstalk between cancer initiating cells and their surrounding. Oncotarget *6*, 2366–2384.

Zebda, N., Bailly, M., Brown, S., Doré, J.F., and Berthier-Vergnes, O. (1994). Expression of PNA-binding sites on specific glycoproteins by human melanoma cells is associated with a high metastatic potential. J. Cell. Biochem. *54*, 161–173.

Zevian, S., Winterwood, N.E., and Stipp, C.S. (2011). Structure-function analysis of tetraspanin CD151 reveals distinct requirements for tumor cell behaviors mediated by α3β1 versus α6β4 integrin. J. Biol. Chem. *286*, 7496–7506.

Zevian, S.C., Johnson, J.L., Winterwood, N.E., Walters, K.S., Herndon, M.E., Henry, M.D., and Stipp, C.S. (2015). CD151 promotes α3β1 integrin-dependent organization of carcinoma cell junctions and restrains collective cell invasion. Cancer Biol. Ther. *16*, 1626–1640.

Zhai, R., Kan, X., Wang, B., Du, H., Long, Y., Wu, H., Tao, K., Wang, G., Bao, L., Li, F., et al. (2014). miR-152 suppresses gastric cancer cell proliferation and motility by targeting CD151. Tumour Biol. *35*, 11367–11373.

Zhang, D., and Zhang, D.-E. (2011). Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. J. Interferon Cytokine Res. *31*, 119–130.

Zhang, H., Jiang, H., Wang, W., Gong, J., Zhang, L., Chen, Z., and Ding, Q. (2012). Expression of Med19 in bladder cancer tissues and its role on bladder cancer cell growth. Urol. Oncol. *30*, 920–927.

Zhang, M., Zhang, J., Chen, X., Cho, S.-J., and Chen, X. (2013). Glycogen synthase kinase 3 promotes p53 mRNA translation via phosphorylation of RNPC1. Genes Dev. *27*, 2246–2258.

Zhang, P., Feng, S., Liu, G., Wang, H., Fu, A., Zhu, H., Ren, Q., Wang, B., Xu, X., Bai, H., et al. (2016). CD82 suppresses CD44 alternative splicing-dependent melanoma metastasis by mediating U2AF2 ubiquitination and degradation. Oncogene *35*, 5056–5069.

Zhang, X.A., Lane, W.S., Charrin, S., Rubinstein, E., and Liu, L. (2003). EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. Cancer Res. *63*, 2665–2674.

Zhao, Z.-M., Reynolds, A.B., and Gaucher, E.A. (2011). The evolutionary history of the catenin gene family during metazoan evolution. BMC Evol. Biol. *11*, 198.

Zheng, H., Gao, L., Feng, Y., Yuan, L., Zhao, H., and Cornelius, L.A. (2009). Down-regulation of Rap1GAP via promoter hypermethylation promotes melanoma cell proliferation, survival, and migration. Cancer Res. *69*, 449–457.

Zhou, X.P., Gimm, O., Hampel, H., Niemann, T., Walker, M.J., and Eng, C. (2000). Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. Am. J. Pathol. *157*, 1123–1128.

Zhou, Z., Ran, Y.-L., Hu, H., Pan, J., Li, Z.-F., Chen, L.-Z., Sun, L.-C., Peng, L., Zhao, X.-L., Yu, L., et al. (2008). TM4SF3 promotes esophageal carcinoma metastasis via upregulating ADAM12m expression. Clin. Exp. Metastasis *25*, 537–548.

Zhu, H., Wu, Y., Zheng, W., and Lu, S. (2015). CO-029 is overexpressed in gastric cancer and mediates the effects of EGF on gastric cancer cell proliferation and invasion. Int. J. Mol. Med. *35*, 798–802.

Zhu, L.-J., Yan, W.-X., Chen, Z.-W., Chen, Y., Chen, D., Zhang, T.-H., and Liao, G.-Q. (2013). Disruption of mediator complex subunit 19 (Med19) inhibits cell growth and migration in tongue cancer. World J Surg Oncol *11*, 116.

Zijlstra, A., Lewis, J., Degryse, B., Stuhlmann, H., and Quigley, J.P. (2008). The inhibition of tumor cell intravasation and subsequent metastasis via regulation of in vivo tumor cell motility by the tetraspanin CD151. Cancer Cell *13*, 221–234.

Zou, S., Ai, K., Wang, Z., Yuan, Z., Yan, J., and Zheng, Q. (2011). The role of Med19 in the proliferation and tumorigenesis of human hepatocellular carcinoma cells. Acta Pharmacol. Sin. *32*, 354–360.