



N°d'ordre NNT :

2020LYSE1255

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED 340
BIOLOGIE MOLÉCULAIRE INTÉGRATIVE ET CELLULAIRE

Spécialité de doctorat : Cancérologie

Soutenue publiquement le 07/12/2020, par :
Maud PLASCHKA (LIGIER)

Rôle du facteur de transcription ZEB1 dans l'échappement au système immunitaire et la résistance aux traitements dans le mélanome

Devant le jury composé de :

Mme Andrieu-Abadie Nathalie, DR INSERM,
Centre de Recherche en cancérologie de Toulouse
Rapporteure

M Chouaib Salem, DR INSERM, Institut Gustave Roussy
Rapporteur

Mme Aspod Caroline, CR EFS/AuRA, EFS R&D Laboratory
Examinatrice

M Dalle Stéphane, PUPH, Université Claude Bernard Lyon 1
Examineur

M Marie Julien, DR INSERM, Centre de Recherche en cancérologie de Lyon
Examineur

Mme Caramel Julie, CR INSERM, Centre de Recherche en cancérologie de Lyon
Directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

| | |
|---|-------------------------|
| Administrateur provisoire de l'Université | M. Frédéric FLEURY |
| Président du Conseil Académique | M. Hamda BEN HADID |
| Vice-Président du Conseil d'Administration | M. Didier REVEL |
| Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire | M. Philippe CHEVALLIER |
| Vice-Président de la Commission de Recherche | M. Jean-François MORNEX |
| Directeur Général des Services | M. Pierre ROLLAND |

COMPOSANTES SANTE

| | |
|---|--|
| Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine | Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT |
| Faculté d'Odontologie | Doyenne : Mme Dominique SEUX |
| Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux | Doyenne : Mme Carole BURILLON |
| Faculté de Médecine Lyon-Est | Doyen : M. Gilles RODE |
| Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR) | Directeur : M. Xavier PERROT |
| Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP) | Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA |

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

| | |
|---|---|
| Département Génie Electrique et des Procédés (GEP) | Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO |
| Département Informatique | Directeur : M. Behzad SHARIAT |
| Département Mécanique | Directeur M. Marc BUFFAT |
| Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon) | Directeur : Gérard PIGNAULT |
| Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA) | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE |
| Institut National du Professorat et de l'Education | Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON |
| Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1 | Directeur : M. Christophe VITON |
| Observatoire de Lyon | Directrice : Mme Isabelle DANIEL |
| Polytechnique Lyon | Directeur : Emmanuel PERRIN |
| UFR Biosciences | Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER |
| UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Directeur : M. Yannick VANPOULLE |
| UFR Faculté des Sciences | Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI |



Thèse effectuée sous la direction du Dr Julie CAMEL

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
INSERM1052 – CNRS 5286
Plasticité tumorale des mélanome
Centre Léon Bérard – 28 rue Laënnec
69008 Lyon

Thèse financée par la région Auvergne Rhône-Alpes (3 ans) ainsi que par la fondation ARC pour la Recherche contre le Cancer.



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour l'évaluation de mes travaux de thèse. Je remercie tout particulièrement mes rapporteurs, Dr Andrieu-Abadie Nathalie et Dr Chouaib Salem pour la relecture de mon manuscrit. Je suis consciente du temps que cela représente et je vous en remercie. Enfin, merci à Dr. Asporod Caroline et Dr. Marie Julien d'également prendre sur leur temps précieux pour évaluer mes travaux lors de ma soutenance. Je suis honorée d'avoir la chance de vous présenter mes travaux et je suis sûre que la discussion qui en résultera sera très enrichissante, c'est pourquoi je me permets de vous remercier par avance.

Je souhaite également remercier tout particulièrement les membres de mon comité de suivi de thèse, Dr. Marie Julien et Dr. Davidson Irwin. Votre écoute et vos conseils avec bienveillance m'ont toujours été d'une grande aide. Merci pour les propositions extrêmement intéressantes, qui m'ont permis de murir et de m'approprier de nombreuses problématiques reliées à mon projet. De manière pragmatique, la présence de nombreuses de ces propositions dans l'article 2 et/ou la discussion de mon manuscrit de thèse témoigne de l'intérêt que nous y avons apportés. Pour tout cela, un grand merci. Dr Marie, je tiens aussi à vous remercier pour votre aide au quotidien, dans la réalisation des expériences, avec notamment le don de modèles murins appropriés, dépannage d'anticorps ou autre. Enfin, un immense merci pour la lecture attentive de mon chapitre 2 en tant que spécialiste d'immunologie.

Bien évidemment, merci Julie pour ton accompagnement au cours de cette belle aventure en tant que directrice de thèse. Merci pour ta bienveillance, pour ton soutien au quotidien. Je réalise la chance immense que j'ai eu de faire ma thèse dans ton équipe. Merci pour ta rigueur et ton excellence scientifique. J'espère avoir pu en acquérir un petit peu en travaillant avec toi ces dernières années. Merci de m'avoir fait confiance et laissé le temps de murir ma curiosité scientifique et mon projet de thèse. Merci aussi de m'avoir donné la possibilité de découvrir un large panel de technique et de m'avoir donné le temps et les moyens de me former. Merci d'avoir mis les moyens humains, techniques et financiers dans mon projet qui font ce qu'il est aujourd'hui. Je t'en suis sincèrement reconnaissante. Enfin, au-delà de la thèse, merci d'avoir été attentive et présente à mes projets plus personnels.

Un immense merci à toute la Mélanoma Team, toujours grandissante. Je suis fière d'avoir fait partie de cette belle équipe où il fait bon venir travailler. Un remerciement tout particuliers à Maxime pour ton soutien au quotidien, à la palliase et animalerie mais pas que. Merci aussi pour ton soutien 'mental' tout au cours de ma thèse, et les moments plus détente. Les conditions sanitaires ne sont plus très favorables, mais merci pour l'organisation des Team Building qui ont notamment bien participé à la bonne entente de l'équipe. Merci à Valentin pour ton aide sur la fin de mon projet. Je suis sereine de savoir que tu prendras la suite, je sais le projet entre de bonnes mains. Bien sûr, merci à Stéphane pour l'accueil au sein de ton équipe et l'attention que tu as toujours pu porter au projet. Enfin, n'oublions pas les anciens membres, un immense merci

à Marie-Ambre, toi qui a eu la lourde tâche de former une jeune stagiaire sur son premier stage en biologie.

Au-delà de la Mélanoma Team, merci à chacun du 2^{ème} étage. Merci à Alain, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour mon stage de master et soutenue pour que je puisse effectuer ma thèse avec Julie. Merci également Caroline, merci de m'avoir fait confiance et ouvert les portes du master malgré un parcours différent. Merci aussi de m'avoir présentée à Julie, sans quoi je n'aurais peut-être bien jamais franchi les portes du laboratoire ! Merci à mes copains de thèses, Mélanie et Hadrien. On n'a en quelque sorte un peu grandi ensemble et je vous souhaite le meilleur pour la suite ! Merci à Freddy, Christelle, Anne-Pierre, Agnès pour votre soutien, votre écoute et vos conseils.

Enfin, au-delà des étages et même des Cheney, un immense merci à chacun de ceux que j'ai embêté plus au moins souvent et qui m'ont soutenue. Je pense notamment à toute l'équipe de Christophe Caux, également pour leur expertise en onco-immunologie. Un remerciement tout particuliers à Amélien, pour avoir pris le temps de me former correctement à la cytométrie en flux, sans quoi je n'aurais jamais pu détecter un seul CD8 qui fait pourtant la force de mes travaux aujourd'hui ! On en rigole maintenant, mais ce n'était quand même pas gagné... Merci aussi à Alexandra, pour tes dépannages réguliers, les astuces et aussi et surtout les bons moments autour d'un petit café.

Merci également à toutes les plateformes, cytométrie, anapath, animalerie, bioinfo qui ont été indispensables à la bonne réalisation de mon projet. Merci à Roxane, Janice et Laurie de la plateforme de bioinfo pour votre soutien, suivi, transmission de connaissances et expertise. Sachez que j'ai profité de chaque moment que vous m'avez consacré, j'ai appris énormément et ai développé une compétence nouvelle qui me servira dans un futur proche. Merci pour tout.

Mes remerciements les plus sincères vont également aux associations de patients. Merci à la Fondation ARC pour la recherche contre le cancer de m'avoir soutenue en finançant ma 4^{ème} année de thèse. Merci à la Ligue contre le cancer, et particulièrement au comité de l'Ain pour soutenir l'équipe et nous permettre de fonctionner, nous donner les moyens financiers nécessaires à l'avancée de nos travaux. Merci à la délégation de Montrevel, pour l'accueil chaleureux que vous m'avez offert à deux reprises. Au-delà des moyens financiers, vos histoires respectives, votre détermination, votre force et votre sympathie nous donne à nous, jeunes chercheurs, une raison concrète de persévérer avec nos pipettes et nos microscopes. Dans ce sens, mes pensées et mes remerciements vont aussi à l'association MelArnaud. Une douce pensée également à tous les petits guerriers de l'IHOPE (et d'ailleurs) et les Petits Génies du Mercredi. Merci pour votre joie de vivre et votre force. Chaque moment avec vous est une belle leçon de vie. Vous nous faites grandir bien plus que ce que tout ce que nous pouvons vous enseigner.

Enfin, je tiens à sincèrement remercier ma famille, mes proches et amis pour leur soutien au quotidien au cours de cette aventure qui peut vous paraître bien loufoque. Merci à mes parents, mais aussi grands-parents pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mes études.

Merci à mon frère et mes sœurs, et bien sûr mes adorables nièces, pour tous les bons moments partagés. Merci également aux Gônes et à mes chères copines des Mines Elise et Julie, pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble et ceux à venir. Merci pour votre soutien, votre présence et aussi votre compréhension lors de mes absences en cas de 'rush'. Merci à Mémie, pour ton soutien sans faille, notamment pour garder Poupette en cas de besoin, mais pas que...

Enfin, merci à toi Niko, pour ton amour et soutien inconditionnel. Tu t'es retrouvé embarqué malgré toi dans cette aventure de thèse et tu n'as pas lâché, merci.

Pour ma fille, mon petit rayon de soleil au quotidien,

Ces pages sont longues, et pourtant si courtes par rapport à tout ce que je vous dois. Merci.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| Remerciements | 7 |
| Table des matières | 11 |
| Table des illustrations | 13 |
| Introduction générale | 17 |
| Chapitre 1 : Mélanome | 19 |
| 1. Des mélanocytes au mélanome | 19 |
| 1.1. Les mélanocytes | 19 |
| 1.2. Facteurs de risque de transformation des mélanocytes | 23 |
| 1.3. Classification des mélanomes | 23 |
| 1.4. Altérations génétiques et mélanomagenèse | 26 |
| 1.5. Altérations phénotypiques et progression tumorale | 31 |
| 2. Thérapies des mélanomes métastatiques | 34 |
| 2.1. Thérapies ciblées pour les patients BRAFV600: avancées et mécanismes de résistance | 34 |
| 2.2. Immunothérapies : avancées et mécanismes de résistance | 37 |
| 3. Modèles d'études des mélanomes | 40 |
| 3.1. Culture en monocouche de cellules de mélanome adhérentes - <i>in vitro</i> 2D | 40 |
| 3.2. Culture en trois dimensions - <i>in vitro</i> 3D | 42 |
| 3.3. Xénogreffes dérivées de patient (pdx) | 43 |
| 3.4. Modèles murins de transplantation syngénique | 45 |
| 3.5. Modèles transgéniques murins | 46 |
| 3.6. Données de bioinformatique accessibles publiquement | 50 |
| Chapitre 2 : Microenvironnement immunitaire | 55 |
| 1. Le microenvironnement immunitaire des mélanomes : modèle d'immunoédition | 55 |
| 1.1. La phase d'élimination | 55 |
| 1.2. La phase d'équilibre | 58 |
| 1.3. La phase d'échappement | 59 |
| 2. Les lymphocytes T : acteurs majeurs de la réponse anti-tumorale | 60 |
| 2.1. Genèse des lymphocytes T | 60 |
| 2.2. Mise en place de la réponse T | 62 |
| 2.3. Régulation de l'activité des T Cytotoxiques : Les points de contrôle du système immunitaire | 70 |
| 3. Les mécanismes d'échappement médiés par la cellule tumorale | 75 |
| 3.1. Altération de la présentation antigénique | 75 |
| 3.2. Les ligands des points de contrôle du système immunitaire | 78 |
| 3.3. Rôles des facteurs solubles sur l'attraction, la répulsion et la différenciation des populations immunes | 80 |
| 4. Mécanismes de résistance à l'immunothérapie | 86 |
| 4.1. Mécanismes d'origine immunitaire | 86 |
| 4.2. Les mécanismes de résistance intrinsèques à la cellule tumorale | 88 |
| Chapitre 3 : Les facteurs de transcription inducteurs d'EMT, les EMT-TFs, des régulateurs de la plasticité des cellules cancéreuses | 94 |
| 1. Plasticité cellulaire des cellules cancéreuses | 94 |
| 2. La transition épithélio-mésenchymateuse | 94 |
| 2.1. Définition de la transition épithélio-mésenchymateuse | 94 |
| 2.2. EMT et développement embryonnaire | 95 |
| 2.3. L'EMT partielle : source d'hétérogénéité phénotypique | 97 |
| 2.4. Les voies de signalisation régulant l'EMT | 98 |
| 3. Présentation des principaux EMT-TFs | 104 |
| 3.1. Les protéines à doigts de zinc et homéo-domaine de la famille ZEB | 106 |

| | | |
|--|---|------------|
| 3.2. | La famille SNAIL | 111 |
| 3.3. | Les bHLH TWIST | 112 |
| 4. | Fonctions oncogéniques des EMT-TFs dans les carcinomes | 114 |
| 4.1. | EMT et dissémination métastatique..... | 114 |
| 4.2. | Les EMT-TFs favorisent l'échappement aux systèmes de sauvegarde permettant la transformation. | 117 |
| 4.3. | Les EMT-TFs favorisent l'acquisition de propriétés souches et la génération de cellules souches cancéreuses | 119 |
| 4.4. | Les EMT-TFs dans la résistance aux traitements | 120 |
| 4.5. | Les EMT-TFs dans l'échappement au système immunitaire..... | 121 |
| 4.6. | Dérégulation de l'expression des ligands des points de contrôle du système immunitaire | 124 |
| 4.7. | EMT et recrutement d'un microenvironnement pro-tumoral | 125 |
| 5. | Mélanome et pseudo-EMT | 126 |
| 5.1. | Expression et fonction des EMT-TFs dans le lignage mélanocytaire dérivé de la crête neurale | 126 |
| 5.2. | Le « switch » d'expression des EMT-TFs au cours de la mélanomagenèse | 127 |
| 5.3. | Contrôle de l'expression différentielle des EMT-TFs dans le mélanome | 129 |
| 5.4. | Switch d'expression des EMT-TFs et couplage avec le switch phénotypique dépendant de MITF..... | 130 |
| 5.5. | Fonctions oncogéniques antagonistes des EMT-TFs dans le mélanome | 131 |
| Objectifs de la thèse | | 133 |
| Résultats | | 135 |
| Article 1 | | 137 |
| Article 2 | | 157 |
| Conclusions et perspectives article 2 | | 209 |
| Discussion et perspectives | | 211 |
| 1. | L'activation de ZEB1, un nouveau mécanisme d'exclusion des T CD8 intrinsèque aux cellules de mélanome | 214 |
| 2. | Mécanismes d'action de ZEB1 : dépendance et indépendance vis-à-vis de MITF et de la plasticité phénotypique | 216 |
| 3. | Implication d'autres populations immunitaires ou stromales dans l'échappement au système immunitaire des mélanomes forts en ZEB1 | 219 |
| 3.1. | Les Treg..... | 219 |
| 3.2. | Les macrophages | 220 |
| 3.3. | Mise en évidence d'autres populations..... | 222 |
| 4. | Autres mécanismes d'échappement au système immunitaire médiés par ZEB1 | 225 |
| 4.1. | Présentation antigénique | 225 |
| 4.2. | Régulation de l'expression des ligands des points de contrôle du système immunitaire | 228 |
| 4.3. | Crosstalk avec la voie de l'IFN- γ | 230 |
| 4.4. | Une cible de ZEB1 inattendue : HVEM..... | 231 |
| 5. | Peut-on envisager ZEB1 comme biomarqueur de réponse aux thérapies ou cible thérapeutique? | 235 |
| ANNEXE | | 239 |
| Références | | 247 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|---|----|
| Figure 1 Les différents domaines de la crête neurale et leurs principaux dérivés, adapté de (1; 2) | 20 |
| Figure 2 Développement mélanocytaire (3)..... | 21 |
| Figure 3 Régulation des gènes cibles du facteur de transcription MITF (4)..... | 22 |
| Figure 4 Production de la mélanine, adaptée de Mirosława Cichorek, 2013 | 22 |
| Figure 5 Classification des mélanomes et lésions pré-malignes par Boris Bastian (11)..... | 24 |
| Figure 6 Classification des mélanomes de l'OMS 2018..... | 25 |
| Figure 7 Evolution génétique au cours de la progression des mélanomes (13)..... | 26 |
| Figure 8 Voie des MAPKinases et PI3Kinases (18) | 28 |
| Figure 9 Transcription et voie de signalisation en aval de CDKN2A, contrôlant l'apoptose via p53 et l'arrêt du cycle cellulaire via Rb (20) | 30 |
| Figure 10 Niveau d'expression des signatures d'invasion et de prolifération au cours de la progression des mélanomes (28)..... | 32 |
| Figure 11 Model de rhéostat de MITF version 2019, proposé par Florian Rambow (37)..... | 34 |
| Figure 12 Sélection de clones résistants aux thérapies ciblées par reprogrammation phénotypique..... | 36 |
| Figure 13 Heatmap des gènes des signatures mélanocytaire, transitoire, crête neurale et dédifférenciée (42). | 37 |
| Figure 14 Courbes de Kaplan Mayer représentant la survie sans progression et la survie globale pour les patients traités par la combinaison ipilimumab/nivolumab, nivolumab seul et ipilimumab seul..... | 39 |
| Figure 15 Potentiel des xénogreffes dérivées de tumeurs de patients dans la mise en place de la thérapie personnalisée (58)..... | 44 |
| Figure 16 Souris transgénique Tyr::N-RasQ61K (Ackermann et al., 2005)..... | 47 |
| Figure 17 adaptée de (65) Phénotype des souris <i>BrafV600E/Cre ERT2</i> | 48 |
| Figure 18 Répartition des sites tumoraux des mélanomes du TCGA..... | 50 |
| Figure 19 Estimations de la part des infiltrats stromal et immunitaire des mélanomes du TCGA par l'algorithme ESTIMATE | 51 |
| Figure 20 Heatmap représentant les expressions relatives des signatures définies par analyses à l'échelle de la cellule unique pour les type cellulaires lymphocytes T et B, macrophages, cellules endothéliales et fibroblastes associés à la tumeur pour les 471 mélanomes du TCGA (35) | 52 |
| Figure 21 Répartition de la localisation des échantillons séquencés. Répartition du nombre de cellules dans chaque type cellulaire par patient. | 52 |
| Figure 22 Schéma représentant l'établissement de l'algorithme de déconvolution CIBERSORTx | 53 |
| Figure 23 Analyse en composantes principales (ACP) des profils d'expressions des données en bulk du TCGA, annotées en haut à gauche par les sous-types prédictifs | 54 |
| Figure 24 L'immunoédition en trois étapes : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (76) | 55 |
| Figure 25 Anatomie et composition de la peau. | 56 |
| Figure 26 Modèle d'étude de la détection innée de signaux tumoraux aboutissant à la mise en place d'une réponse T anti-tumorale (99). | 63 |
| Figure 27 Mise en place de la réponse immunitaire anti-tumorale par un réseau de chémokines (102).. | 64 |
| Figure 28 Initiation d'une réponse adaptative par les cellules dendritiques. Adapté à partir de (89) | 65 |
| Figure 29 Fonctions des cellules dendritiques conventionnelles cDC1 à gauche et cDC2 à droite. Adapté de (108) | 65 |
| Figure 30 Signaux d'activation ou de « priming » des lymphocytes T naïfs (89). | 66 |
| Figure 31 Présentation du « ménage à trois » (109)..... | 67 |

| | |
|---|-----|
| Figure 32 Induction de l'apoptose dans la cellule cible par la voie des perforine/granzymes, adapté de (89) | 69 |
| Figure 33 Balance entre les signaux activateurs et inhibiteur des lymphocytes T effecteurs. Adapté de (117) | 71 |
| Figure 34 Représentation schématique du mécanisme d'action des deux inhibiteurs des points de contrôle du système immunitaire utilisés en clinique dans le cas de traitement des mélanomes..... | 72 |
| Figure 35 Mécanismes d'échappement au système immunitaire des cellules tumorales. Adaptée de (132) | 75 |
| Figure 36 Présentation antigénique par la voie du CMH-I, adapté de (134). | 78 |
| Figure 37 Mécanismes de régulation de PD-L1 (141)..... | 79 |
| Figure 38 Recrutement de populations immunosuppressive par un réseau de chémokines (102) | 81 |
| Figure 39 Rôles des macrophages associés à la tumeur et marqueurs correspondants au phénotype associé (163) | 85 |
| Figure 40 Composition du microenvironnement immunitaire des tumeurs chaudes et froides..... | 87 |
| Figure 41 Mécanismes de résistance aux immunothérapies intrinsèques à la cellule tumorale (172). | 89 |
| Figure 42 Fréquences des altérations génétiques des voies β -caténine et PTEN entre les tumeurs chaudes et tumeurs froides (174)..... | 91 |
| Figure 43 Schéma caractéristique de la transition épithélio-mésenchymateuse EMT et de la transition inverse MET..... | 95 |
| Figure 44 Gastrulation et devenir des cellules (185)..... | 96 |
| Figure 45 Délamination et devenir des cellules (185)..... | 96 |
| Figure 46 Comparaison des programmes d'EMT mis en place au cours de la gastrulation et de la délamination des cellules de la crête neurale (185). | 97 |
| Figure 47 Transition entre les différents états au cours du processus d'EMT (186)..... | 98 |
| Figure 48 Voies de signalisation inductrices d'EMT (Samy Lamouille, 2014)..... | 99 |
| Figure 49 Réseaux de contrôle de l'EMT (195)..... | 104 |
| Figure 50 Classification des EMT-TFs en répresseur directs de la E-cadhérine et indirects (195)..... | 105 |
| Figure 51 Représentation des facteurs de transcriptions ZEB1 et ZEB2. | 107 |
| Figure 52 Exemples de mécanismes d'action du facteur de transcription ZEB1 (Waltraut Lehmann, 2016). | 108 |
| Figure 53 Représentation schématique des expressions de ZEB1 et ZEB2 au stade embryonnaire E8.5 (224). | 109 |
| Figure 54 Représentation des facteurs de transcriptions SNAIL et SLUG (232)..... | 111 |
| Figure 55 Représentation des facteurs de transcriptions TWIST1 et TWIST2 (232) | 113 |
| Figure 56 Fonctions Oncogéniques de ZEB1 | 117 |
| Figure 57 Rôle de l'EMT dans les interactions entre les cellules tumorales et cellules immunes (271)... | 122 |
| Figure 58 Expression des EMT-TFs au cours de la formation du lignage mélanocytaire à partir de cellules embryonnaire de la crête neurale et à l'âge adulte (288)..... | 127 |
| Figure 59 Exemples représentatifs de marquage IHC des EMT-TFs respectivement de gauche à droite SNAIL2, ZEB2, ZEB1 et TWIST1 à la superficie et en profondeur de mélanomes primaires. Représentation schématique de la balance d'expression des EMT-TFs au cours du développement des mélanomes (287). | 129 |
| Figure 60 Les EMT-TFs orchestrent la transition phénotypique réversible entre les états différenciés forts en MITF et invasifs, faibles en MITF des cellules de mélanome (288)..... | 131 |

| | |
|---|-----|
| Figure 61 Mécanismes intrinsèques à la cellule tumorale d'exclusion des T CD8 connus avant et après la réalisation de ma thèse. | 215 |
| Figure 62 Analyses des données de RNA-Seq à l'échelle de la cellule unique | 222 |
| Figure 63 Analyse combinée d'immunofluorescence et de RNA-Seq à partir d'une cohorte de 35 mélanomes cutanés. | 223 |
| Figure 64 Présentation antigénique. | 226 |
| Figure 65 Régulation de l'expression de PD-L1 par ZEB1. | 230 |
| Figure 66 Corrélacion inverse entre ZEB1 et HVEM. | 231 |
| Figure 67 Analyses des données de RNA-Seq à l'échelle de la cellule unique | 233 |
| Figure 68 Exemples des principales stratégies thérapeutiques en cours d'évaluation permettant de cibler la plasticité cellulaire dépendante de l'EMT dans les cancers. | 238 |



INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1 : MELANOME

1. Des mélanocytes au mélanome

1.1. Les mélanocytes

Le mélanome provient de la transformation des mélanocytes, localisés à la jonction dermo-épidermique de la peau, soit dans la couche basale de l'épiderme, soit au sein d'un follicule pileux. L'épiderme et le derme sont les deux compartiments principaux de la peau humaine. L'épiderme est la couche externe qui se divise en quatre couches. Au plus profond, la couche basale assure le renouvellement constant des cellules de l'épiderme. Cette couche ne contient qu'une rangée de cellules épidermiques dédifférenciées appelées kératinocytes basaux. Les mélanocytes se trouvent au sein de cette fine couche basale, au ratio d'un mélanocyte pour dix kératinocytes. Après division, les kératinocytes se différencient et migrent vers les couches supérieures en commençant par la couche épineuse, la couche granuleuse puis la couche cornée. En migrant à travers chaque couche, les kératinocytes deviennent de plus en plus matures, remplissant les fonctions propres à chaque sous couche avec notamment la production de kératines adaptées. Les cornéocytes composants la couche cornée la plus externe, sont des cellules dérivées de kératinocytes morts, dépourvus d'organelles. Ils composent la première barrière contre les toxiques. Les kératinocytes représentent plus de 90 pourcent des cellules de l'épiderme. Les mélanocytes proviennent de cellules de la crête neurale. Suite à l'invagination de la plaque neurale, le tube neural se forme de la partie antérieure de l'embryon, où se trouvera sa future tête, jusqu'à la partie postérieure de ce dernier, situé en bas de son futur dos. Les cellules de la crête neurale se séparent de la partie dorsale du tube neural et commencent à migrer suivant un processus appelé délamination. Ce processus est finement régulé par la transition épithélio-mésenchymateuse que nous détaillerons au troisième chapitre. Ces cellules au fort potentiel migratoire vont donner naissance à de multiples structures spécialisées après migration, prolifération et différenciation. Le devenir des cellules de la crête neurale est défini par leur position initiale dans le tube neural. On distingue ainsi différents domaines sur cet axe: le domaine du crâne, celui du cœur, du tronc et les domaines vagues et sacrés (Figure 1).

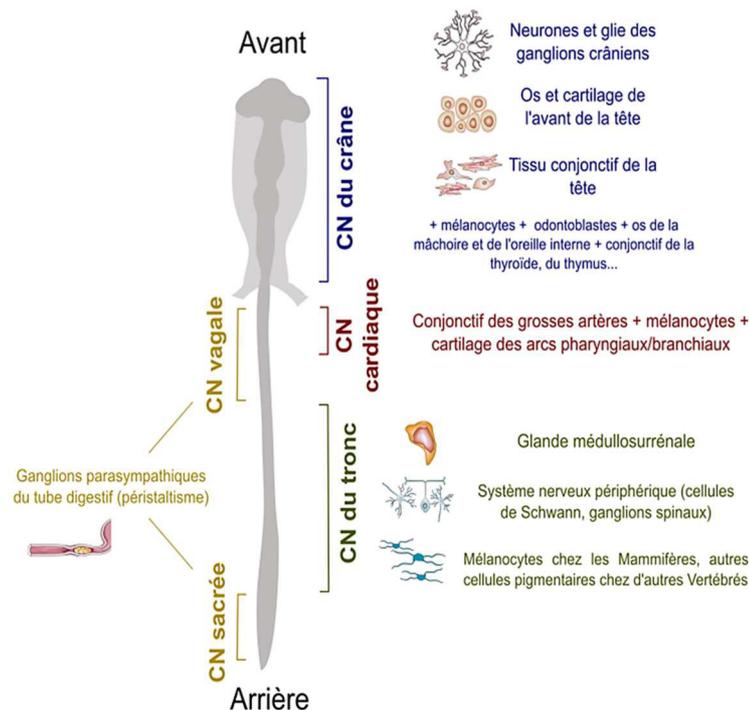


Figure 1 Les différents domaines de la crête neurale et leurs principaux dérivés, adapté de (1; 2)

Ce sont les cellules du tronc qui donneront entre autre les mélanoblastes, les cellules gliales et les neurones. La migration ventrale précoce des cellules de crête neurale du tronc permet la formation de neurones alors que les mélanoblastes résultent d'une migration dorso-latérale plus tardive. Cependant, la possibilité d'une transdifférentiation de cellules de Schwann provenant d'une migration ventrale en mélanoblastes a été démontrée *in vitro*, décrivant une deuxième origine possible des mélanocytes (3). La localisation n'est pas la seule responsable du devenir des cellules de la crête neurale. Des signaux moléculaires sont envoyés à travers les protéines BMP (Bone Morphogenic Protein), Wnt et les facteurs de croissance fibroblastiques FGF, activant l'expression de facteurs de transcription spécifiques de la crête neurale tels que SOX10. Les mélanoblastes acquièrent ensuite l'expression de facteurs propres au lignage tels que le facteur clé de différenciation mélanocytaire, le facteur de transcription associé à la microphthalmie MITF jusqu'à différenciation finale en mélanocyte (Figure 2) (4). En régulant l'expression de gènes associés à la pigmentation tels que la *tyrosinase*, *TRP1* et *TRP2/DCT*, et à la formation de mélanosomes tel que le prémélanosome *Pmel*, MITF permet la différenciation mélanocytaire. MITF régule également l'expression d'un large panel de gènes fondamentaux au maintien de l'homéostasie cellulaire comme la prolifération avec la régulation du cycle cellulaire via notamment CDK2, la suppression des dommages à l'ADN avec la transcription par exemple de BRCA1 et RAD54, la mort cellulaire via l'anti-apoptotique BCL2 (Figure 3). Des niveaux finement

régulés d'expression de MITF sont associés à une ou plusieurs fonctions biologiques. On parle du modèle de rhéostat, que nous aborderons plus loin. Des mutations pertes de fonction de MITF sont responsables du syndrome de Waardenburg de type IIA, induisant une dépigmentation due à la perte des mélanocytes (5). De manière intéressante, il a été montré que MITF est capable de réguler d'autres facteurs de transcription, dont le facteur de transcription lié à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT-TF) ZEB1.

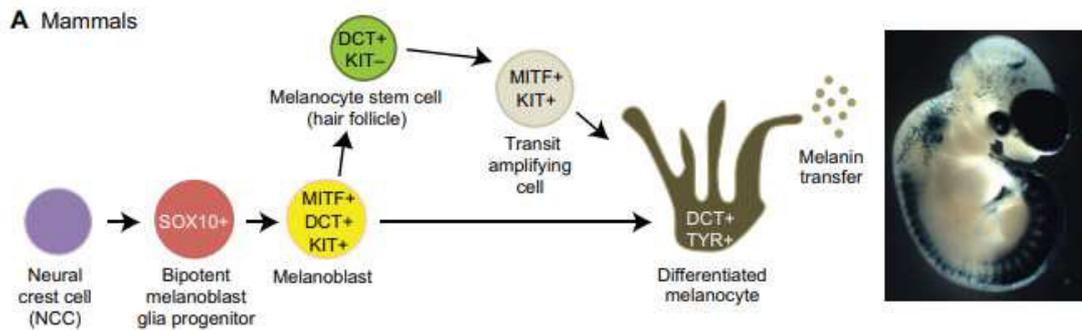


Figure 2 Développement mélanocytaire. A gauche, représentation schématique du devenir des cellules de crête neural se différenciant en mélanoblastes. L'image à droite représente un embryon de souris transgénique exprimant lacZ sous le contrôle du promoteur Dct. Le marquage X-Gal révèle en bleu les mélanoblastes, en particulier proches des cervicales et sur la tête. Le cerveau, le ganglion rachidien et l'épithélium pigmenté rétinien apparaissent également marqués (3).

Après maturation, les mélanocytes sont capables de synthétiser la mélanine dans des organelles spécialisés appelés les mélanophores. La mélanine est un polymère irrégulier contenant des indoles, ce qui permet notamment l'absorption et la dispersion de la lumière UV, la neutralisation de radicaux libres via des réactions d'oxydoréduction et le stockage d'ions. L'oxydation de la tyrosine par l'enzyme tyrosinase est l'étape clé de la synthèse de la mélanine. Chez les vertébrés, la tyrosinase n'est active que dans des organelles spécialisées des mélanocytes et des épithéliums pigmentaires de la rétine (6). Il existe deux types de mélanine : l'eumélanine et la phéomélanine. L'eumélanine est responsable d'une pigmentation brune-noire alors que la phéomélanine donne une pigmentation dans les tons de jaune-rouge (7). L'accessibilité en composé organique dirige la production d'eu- ou de phéo-mélanine. En l'absence de thiols, c'est notamment l'eumélanine qui sera produite (Figure 4) (8). Ainsi, en plus du facteur clé de différenciation mélanocytaire MITF (4) on identifie à l'échelle moléculaire les mélanocytes grâce à des protéines spécifiques du lignage comme la tyrosinase (TYR) et les protéines associées à la tyrosinase 1 et 2, aussi connues sous les noms respectifs de DHICA oxidase et dopachrome tautomerase (TRP1 et TRP2/DCT).

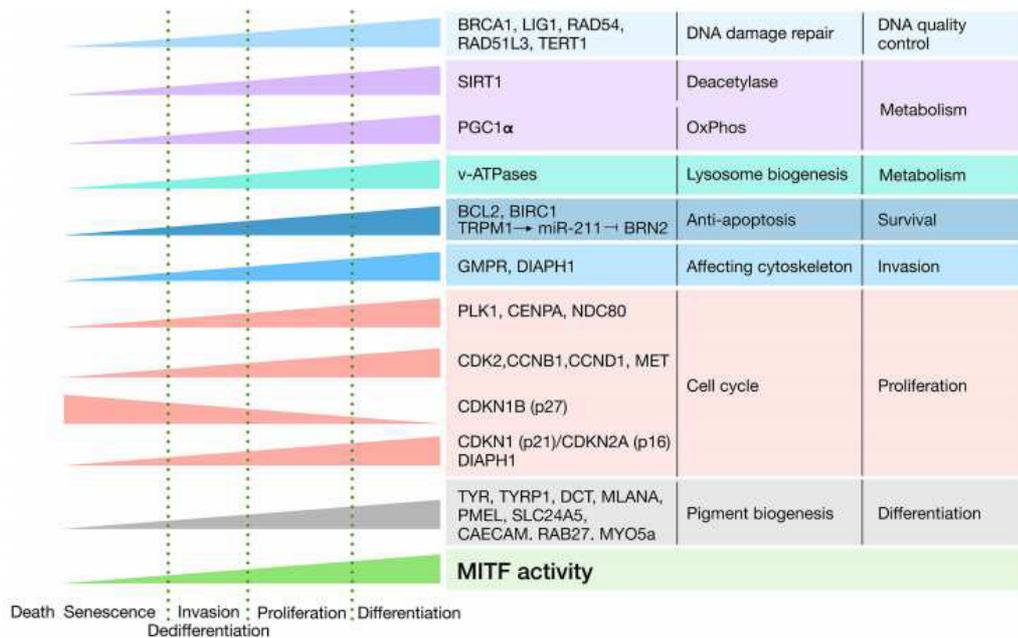


Figure 3 Régulation des gènes cibles du facteur de transcription MITF et fonctions biologiques principales associées à savoir de haut en bas : réparation des dommages à l'ADN, déacétylation, biogenèse de lysosome, anti-apoptose, relatif au cytosquelette, cycle cellulaire et biogenèse de la pigmentation (4).

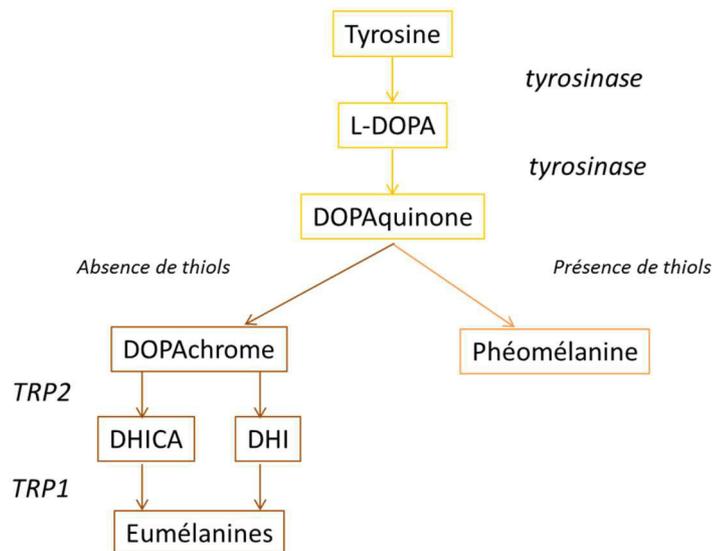


Figure 4 Production de la mélanine, adaptée de Mirosława Cichorek, 2013

Nous reviendrons plus en détails sur les facteurs de transcription liés à la transition épithélio-mésenchymateuse dans le troisième chapitre, mais je souhaiterais évoquer ici l'implication des EMT-TFs dans la mélanogénèse. L'EMT-TF SNAIL2 joue un rôle important dans le linéage mélanocytaire et la migration des mélanoblastes. Aussi, les souris déficientes pour *Snai2* présentent des défauts de pigmentation. Des délétions homozygotes de *SNAIL2* ont été reportées chez des patients atteints du syndrome de Waardenburg. L'EMT-TF ZEB2 a été reporté pour avoir

non seulement un impact sur la migration des mélanoblastes mais aussi sur la différenciation mélanocytaire. L'équipe du professeur Geert Berx a étudié la fonction de ZEB2 en utilisant une approche perte de fonction spécifiquement dans le lignage mélanocytaire. Dans ce contexte, la perte de ZEB2 induit non seulement un défaut de migration des mélanoblastes mais aussi une diminution d'expression de MITF et autres marqueurs de différenciation mélanocytaire. En parallèle, l'EMT-TF ZEB1 est surexprimé. Ainsi, ces travaux mettent en évidence l'importance du réseau ZEB2-MITF-ZEB1 dans le lignage mélanocytaire, où ZEB2 induit l'expression et activité de MITF, lui-même responsable de la répression de ZEB1 (9). Nous reviendrons plus en détail dans le troisième chapitre sur ce réseau ZEB2-MITF-ZEB1 au cœur de la mélanomagenèse et de la progression tumorale (10).

1.2. Facteurs de risque de transformation des mélanocytes

Le mélanome est le cancer de la peau le plus agressif, dont l'incidence n'a cessé d'augmenter du fait des habitudes comportementales (exposition au soleil). En effet, le premier facteur de risque est l'exposition aux ultraviolets naturels ou artificiels comme l'exposition au soleil aux heures chaudes, notamment dans l'enfance, et l'utilisation de cabines à UV. Certains patients atteints de mélanome n'ont cependant ni un phototype les sensibilisant au soleil, ni de mauvaises habitudes d'exposition aux radiations UV. Dans ce cas, une prédisposition génétique familiale peut être à l'origine du mélanome. On estime à 10% la proportion des patients atteints de mélanome à cause de prédisposition familiale. Les deux gènes de prédisposition majeurs les plus connus sont la kinase cycline-dépendante *Cdk4* et son inhibiteur associé, le suppresseur de tumeur *Cdkn2a (p16-Ink4a)* qui contrôlent tous deux l'entrée du cycle cellulaire. Nous détaillerons leur rôle dans la section « altérations génétiques et mélanomagenèse ». Des amplifications ou mutations spécifiques de *MITF* ont également été reportées comme événement oncogénique de certains mélanomes familiaux (5). La taille et le nombre de nævus sont aussi un facteur de risque de développement du mélanome. Dans ce cas, un examen clinique régulier est suffisant afin de détecter de manière précoce la transformation d'un ou plusieurs nævus en mélanome(s) (11).

1.3. Classification des mélanomes

La classification actuelle des mélanomes de l'organisation mondiale de la santé (OMS) s'appuie sur une classification proposée il y a plus de 30 ans et constamment en évolution depuis. Ainsi, en 1986, le professeur Clark définissait 4 sous-types de mélanomes sur la base de leur localisation et aspects morphologiques croissance précoce : le mélanome superficiel extensif

(SSM, Superficial Spreading Melanoma), le mélanome acro-lentigineux (ALM, Acral Lentiginous Melanoma), le mélanome de Dubreuilh (LMM, Lentigo Malignant Melanoma) et le mélanome nodulaire. Les mélanomes SSM sont d'origine épidermique. Ils ont généralement une phase de croissance radiale importante avant de croître verticalement et d'envahir le derme (12). Comme ce sont les plus fréquents (70%), je me suis concentrée sur les mélanomes cutanés de type SSM pour mes travaux de thèse. Plus récemment, le professeur Boris Bastian a proposé une classification plus détaillée, intégrant les altérations génétiques précoces, des caractéristiques cliniques et histologiques, des caractéristiques propres au patient tel que son âge, son type de peau, ainsi que l'impact des radiations UV, identifiant 10 classes de mélanomes (Figure 5). Aussi, la classification de l'OMS, en constante évolution, a intégré ces dernières données décrivant 9 classes principales de mélanomes. Les mélanomes SSM qui m'ont intéressée au cours de ma thèse sont des mélanomes dits non-CSD sur peau exposées au soleil sans dommage cumulatif induit par le soleil. Ils proviennent de la transformation de nævus bénin, plus connu sous le nom de grain de beauté (Figure 6).

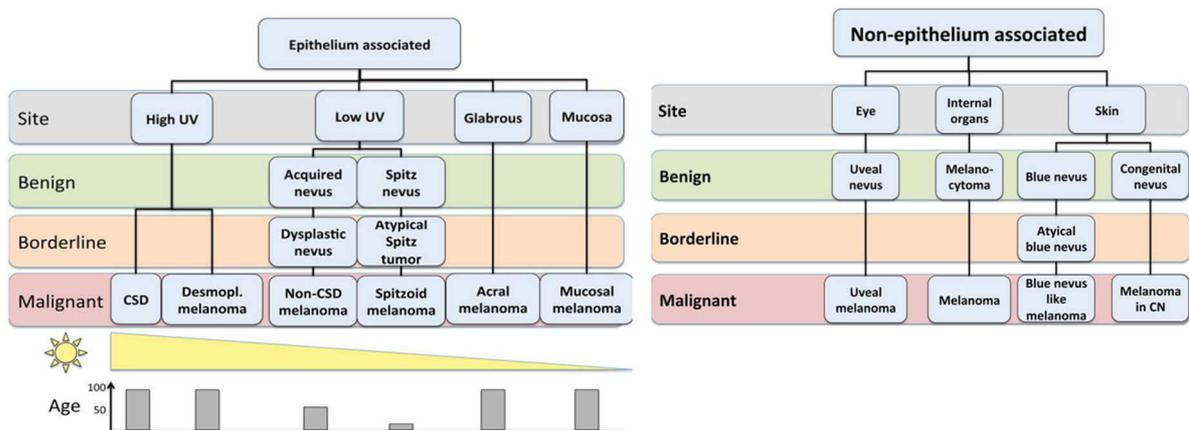


Figure 5 Classification des mélanomes et lésions pré-malignes par Boris Bastian (11)

| | Low UV radiation exposure /CSD | | | | High UV radiation exposure /CSD | |
|--|--|--|--|---|--|---|
| Pathway | I | | | | II | III |
| Endpoint of pathway | Low-CSD melanoma /SSM | | | | High-CSD melanoma /LMM | Desmoplastic melanoma |
| Benign neoplasms (naevi) | Naevus | | | | ? IMP | ? IMP |
| Intermediate / low-grade dysplasias and melanocytomas | Low-grade dysplasia | BIN | DPN | | ? IAMP/dysplasia | ? IAMP/dysplasia |
| Intermediate / high-grade dysplasias and melanocytomas | High-grade dysplasia /MIS | BAP1-inactivated melanocytoma / MELTUMP | Deep penetrating melanocytoma / MELTUMP | PEM /MELTUMP | Lentigo maligna (MIS) | MIS |
| Malignant neoplasms | Low-CSD melanoma /SSM (VGP) | Melanoma in BIN (rare) | Melanoma in DPN (rare) | Melanoma in PEM (rare) | LMM (VGP) | Desmoplastic melanoma |
| Common mutations ^{a,b} | BRAF p.V600E or NRAS <i>TERT;</i> <i>CDKN2A; TP53;</i> <i>PTEN</i> | BRAF or NRAS + BAP1 | BRAF, MAP2K1, or NRAS + CTNNB1 or APC | BRAF + PRKAR1A or PRKCA | NRAS; BRAF (non-p.V600E); KIT; or NF1 <i>TERT;</i> <i>CDKN2A; TP53;</i> <i>PTEN;</i> RAC1 | NF1; ERBB2; MAP2K1; MAP3K1; BRAF; EGFR; MET <i>TERT; NFKBIE;</i> NRAS; PIK3CA; PTPN11 |

BIN, BAP1-inactivated naevus; **BN**, blue naevus; **CBN**, cellular blue naevus; **CN**, congenital naevus; **CSD**, cumulative sun damage; **DPN**, deep penetrating naevus; **IAMP**, intraepidermal atypical melanocytic proliferation; **IAMPUS**, intraepidermal atypical melanocytic proliferation of uncertain significance; **IMP**, intraepidermal melanocytic proliferation without atypia; **LMM**, lentigo maligna melanoma; low/high-CSD melanoma, melanoma in skin with a low/high degree of cumulative sun damage; **MELTUMP**, melanocytic tumour of uncertain malignant potential; **MIS**, melanoma in situ; **PEM**, pigmented epithelioid melanocytoma; **SSM**, superficial spreading melanoma; **STUMP**, spitzoid tumour of uncertain malignant potential; **UV**, ultraviolet; **VGP**, vertical growth phase (tumorigenic and/or mitogenic melanoma).

| Low to no (or variable/incidental) UV radiation exposure /CSD | | | | | |
|---|--|--|---|--|---|
| IV | V | VI | VII | VIII | IX |
| Malignant Spitz tumour/ Spitz melanoma | Acral melanoma | Mucosal melanoma | Melanoma in CN | Melanoma in BN | Uveal melanoma |
| Spitz naevus | ? Acral naevus | ? Melanosis | CN | Blue naevus | ? Naevus |
| Atypical Spitz tumour (melanocytoma) | IAMP /dysplasia | Atypical melanosis/ dysplasia /IAMPUS | Nodule in CN (melanocytoma) | (Atypical) CBN (melanocytoma) | ? |
| STUMP /MELTUMP | Acral MIS | Mucosal MIS | MIS in CN | Atypical CBN | ? |
| Malignant Spitz tumour/ Spitz melanoma (tumorigenic) | Acral melanoma (VGP) | Mucosal lentiginous melanoma (VGP) | Melanoma in CN (tumorigenic) | Melanoma in blue naevus (tumorigenic) | Uveal melanoma |
| HRAS; ALK; ROS1; RET; NTRK1; NTRK3; BRAF; or MET <i>CDKN2A</i> | KIT; NRAS; BRAF; HRAS; KRAS; NTRK3; ALK; or NF1 <i>CDKN2A;</i> <i>TERT;</i> CCND1; GAB2 | KIT, NRAS, KRAS, or BRAF NF1; <i>CDKN2A;</i> <i>SF3B1;</i> CCND1; CDK4; MDM2 | NRAS; BRAF p.V600E (small lesions); or BRAF | GNAQ; GNA11; or CYSLTR2 <i>BAP1;</i> <i>EIF1AX; SF3B1</i> | GNAQ, GNA11, CYSLTR2, or PLCB4 <i>BAP1;</i> <i>SF3B1; EIF1AX</i> |

Definitions: *Melanocytoma* is a tumorigenic neoplasm of melanocytes that generally has increased cellularity and/or atypia (compared with a common naevus) and an increased (although generally still low) probability of neoplastic progression; *tumorigenic* means forming a mass of neoplastic cells.

^a Common mutations in each pathway are listed; mutations already identified in benign or borderline low lesions are shown in bold.
^b Blue, loss-of-function mutation; red, gain-of-function mutation; green, change-of-function mutation; orange, amplification; purple, rearrangement; grey, promoter mutation.

Figure 6 Classification des mélanomes de l'OMS 2018

1.4. Altérations génétiques et mélanomagenèse

Les altérations génomiques participant à l'évolution des mélanomes depuis les étapes précoces de transformation de lésions pré-malignes ont récemment été rigoureusement étudiées par l'équipe du professeur Bastian. La chronologie d'apparition des altérations a pu être obtenue par séquençage ADN et ARN de 82 mélanomes primaires et de zones adjacentes saines ainsi que des métastases associées. Aussi, interviennent dans l'ordre d'évolution des mélanomes : les altérations somatiques inductrices de la voie des MAPKineses, la surexpression de la télomérase, les modifications de la chromatine, le bypass du contrôle du cycle cellulaire et l'arrêt en phase G1, la perturbation de la voie p53 et l'activation de la voie PI3K/AKT (13) (Figure 7).

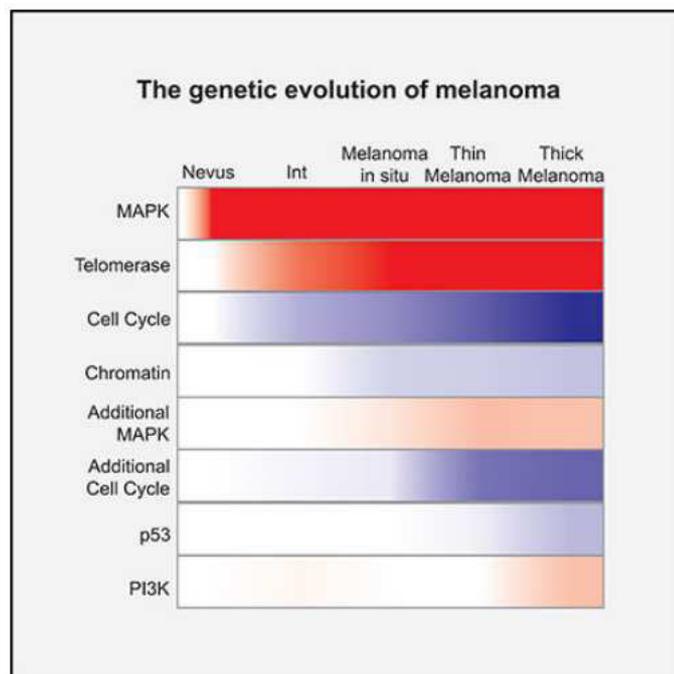


Figure 7 Evolution génétique au cours de la progression des mélanomes (13) En rouge, activation de la voie associée, en bleu inactivation ou dérégulation négative de la voie associée

L'activation oncogénique est le premier événement au cours de la mélanomagenèse, nécessaire mais non suffisant. En effet, l'activation de l'oncogène peut induire un néoplasme bénin, appelé nævus mélanocytaire, plus communément connu sous le nom de grain de beauté. De manière générale, l'événement le plus précoce dans la transformation mélanocytaire est l'activation de la voie des MAPK (Figure 7) (13). En particulier, des mutations activatrices de l'oncogène *BRAF* sont fréquemment retrouvées dans des nævus mélanocytaires. Ces nævus apparaissent principalement au cours des 20 premières années de vie sur des zones exposées au soleil comme le tronc et les extrémités, suggérant la forte contribution des radiations UV sur cette première étape de transformation (14). Concernant les mélanomes SSM, la moitié présente une

mutation activatrice de la protéine kinase BRAF (*BRAFV600E*), 20 pourcent ont une mutation sur la GTPase NRAS (*NRASQ61R*) et environ 10 pourcent présentent une mutation de *NF1* (15). BRAF et NRAS sont tous deux des composants clés de la voie des MAPKinase (Mitogen Activated Protein Kinase), exprimés de manière aberrante dans approximativement un tiers des cancers chez l'homme, tous types confondus (16). Le signal émane de l'activation par trans-phosphorylation de récepteurs à tyrosine kinase à la surface cellulaire. L'activation de la GTPase RAS est suivie par une série de phosphorylations en commençant par les dimères de sérine-thréonine tyrosine kinase RAF, puis MEK1/2 et ERK1/2 (Figure 8). Cette voie contrôle non seulement la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, mais aussi la transformation phénotypique et l'acquisition de propriétés souches. En plus d'une activation précoce via des mutations activatrices, la voie des MAPKinases est encore activée à de plus forts niveaux au cours de la progression tumorale (Figure 7) et l'intensité de la signature transcriptionnelle associée corrèle avec le stade de progression des mélanomes (13). Dans le cas des mutations activatrices de la GTPase NRAS, la voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) est également activée de manière constitutive favorisant la croissance, prolifération et survie cellulaire ainsi que l'acquisition de propriétés souches. L'activation de PI3K permet la phosphorylation et création d'un second messenger phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate (PIP3) à la membrane plasmique. Ce dernier permet le recrutement et l'ancrage à la membrane plasmique de la sérine/thréonine kinase AKT, favorisant ainsi son activation complète par double phosphorylation par mTORC2 et la protéine kinase 3-phosphoinositide dépendante PDK1 (17). La voie des PI3K peut également être activée dans des mélanomes BRAF-mutés via une mutation inactivatrice ou via la délétion de la tyrosine phosphatase PTEN. En jouant un rôle antagoniste à la kinase PI3K, PTEN empêche la phosphorylation d'AKT et bloque ainsi la signalisation PI3K (Figure 8). L'inactivation de PTEN est retrouvée dans environ 20 pourcent des mélanomes BRAF-mutés invasifs (15) et est rare dans les néoplasmes mélanocytaires et mélanomes localisés, suggérant un rôle plus tardif dans la progression tumorale (Figure 7) (13).

Au cours de ma thèse, je me suis principalement concentrée sur les mélanomes BRAF-mutés.

L'activation oncogénique n'est pas suffisante à la transformation. En effet, la prolifération des mélanocytes au sein des nævus bénins est contrôlée par une multitude de facteurs incluant les points de contrôle du cycle cellulaire, la longueur des télomères et le système immunitaire.

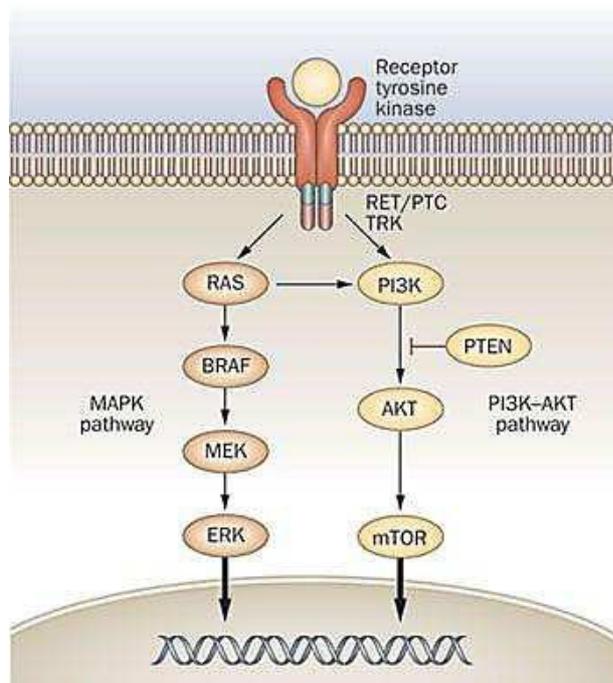


Figure 8 Voie des MAPkinases (MAPK pathway, à gauche) et PI3Kinases (PI3K-AKT pathway, à droite) (18)

Le contrôle de la longueur des télomères fait partie des mécanismes suppresseurs de tumeur. A chaque fois qu'une cellule se divise, les extrémités de ses chromosomes appelées télomères se raccourcissent jusqu'à atteindre une taille limite. La crise télomérique induit alors la sénescence des cellules aux télomères trop courts, limitant le risque de transformation de cellules ayant une division anarchique et rapide. A l'inverse, en s'opposant au processus de raccourcissement des télomères, la télomérase permet la division continue et anarchique des cellules transformées. Des mutations activatrices de la télomérase ont été rapportées comme favorisant la transformation des mélanocytes et la progression tumorale. Des mutations dans le promoteur de la télomérase transcriptase inverse (TERT) ont été rapportées dans la quasi-totalité des mélanomes et une grande majorité de néoplasmes intermédiaires. Aucune altération de ce type n'a été reportée dans les nævus (13), mettant en évidence son rôle clé dans la transformation du nævus bénin en mélanome. De manière intéressante, des zones de régression sont fréquemment observées sur des mélanomes primaires. La crise télomérique pourrait être à l'origine de ces régressions et l'activation de la télomérase serait nécessaire au développement des mélanomes (19).

La sénescence induite par un oncogène est une réponse immédiate à l'activation excessive non-physiologique d'une voie de signalisation clé telle que la voie des MAP-kinases. Le stress

provoqué induit alors un arrêt permanent en phase G1 évitant la prolifération de cellules en cours de transformation. Des altérations somatiques inactivatrices de gènes impliqués dans le contrôle de l'arrêt en phase G1 ont été observées de manière hétérogène dès les stades intermédiaires de néoplasmes mélanocytaires et de mélanomes localisés. A ces stades de progression tumorale, les mutations somatiques ne touchent généralement qu'un allèle alors qu'elles sont souvent bialléliques à des stades plus avancés (13) (Figure 7). Les mutations les plus communes touchent le gène *CDKN2A*, impliqués dans les voies de signalisation Rb et p53 via les intermédiaires protéiques p16Ink4a et p14ARF (Figure 9). Des mutations germinales de *CDKN2A* sont également connues pour prédisposer au mélanome avec une forte pénétrance. De manière intéressante, le suppresseur de tumeur p16Ink4a joue un rôle prédominant dans la transformation des mélanomes. En inhibant la cycline CDK4, p16INK4a lève l'inhibition sur la protéine du rétinoblastome Rb, aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'entrée en sénescence (Figure 9). La démonstration de rôle clé de p16Ink4a dans la transformation a été faite chez la souris et est la base de nombreux modèles murins de mélanome. Je les présenterai dans la partie 3 de ce chapitre dédiée aux modèles d'étude du mélanome.

Les mutations associées à une défaillance de la voie p53 sont rares dans les phases précoces de mélanomagenèse. Seulement un quart des mélanomes invasifs (i.e. d'épaisseur supérieure à 1mm) présentent un défaut de la voie p53, suggérant que de telles altérations permettent une sélection positive des cellules de mélanome tardive (Figure 7) (13). Il est intéressant de noter que la grande majorité (90 pourcent) des mélanomes BRAF-mutés n'ont pas d'altération du gène *p53* en lui-même (15).

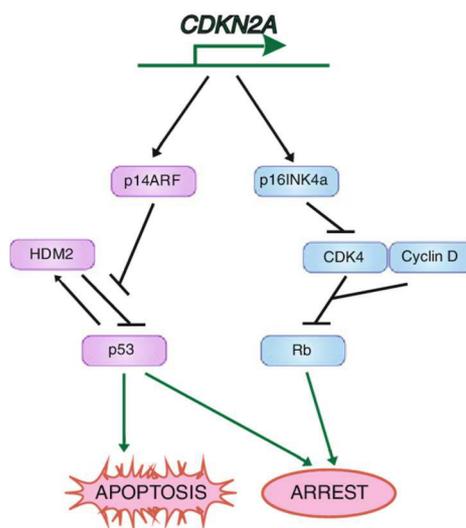


Figure 9 Transcription et voie de signalisation en aval de CDKN2A, contrôlant l'apoptose via p53 et l'arrêt du cycle cellulaire via Rb (20)

Des altérations épigénétiques ont également été reportées dans un nombre significatif de mélanomes. Des hypo- et hyper-méthylations de promoteurs spécifiques sont caractéristiques du mélanome en comparaison avec le niveau basal dans les mélanocytes. Des mutations récurrentes du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF ont été observées. Ce complexe est composé d'une douzaine de protéines dont certaines sont constantes et ubiquitaires, en particulier SMARCB1 et SMARCA4. Dans le mélanome, on retrouve en majorité des mutations inactivatrices d'*ARID2* et plus rarement des mutations touchant *ARID1A*, *ARID1B*, *PBRM1* et *SMARCA4* (15). Le complexe SWI/SNF est l'antagoniste du complexe polycombe répresseur 2 PRC2. PRC2 a une activité histone-méthyltransférase permettant l'extinction de la transcription par triméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 27 (H3K27me3). L'enzyme de méthylation d'histone SETDB1 (21) et l'histone méthyltransférase EZH2 (22) sont plus fortement exprimées dans les mélanomes que dans les nævus mélanocytaires. Ces données sont en faveur d'une balance d'expression de l'activité de remodelage de la chromatine avec la perte de l'activité du complexe SWI/SNF en faveur du complexe PRC2 au cours de la progression des mélanomes. Les altérations somatiques inactivatrices de SWI/SNF ou activatrices de PRC2 sont détectables dans certains mélanomes localisés et leurs fréquences augmentent dans les stades plus avancés (Figure 7) (13).

Le système immunitaire joue un rôle indéniable dans le contrôle de la prolifération de nævus partiellement transformés et mélanomes précoces. Les nævus sont souvent infiltrés par les lymphocytes T et leur taille diminue dans un contexte inflammatoire. Souvent, une dépigmentation localisée accompagne même la zone entourant le nævus. Les macrophages

jouent aussi un rôle important dans l'élimination de mélanocytes pré-malin. Lorsqu'ils sont chargés en pigments de mélanine, ces macrophages de la peau sont alors appelé mélanophages (11). Le rôle du système immunitaire dans le contrôle de la progression tumorale sera détaillé dans le chapitre 2.

1.5. Altérations phénotypiques et progression tumorale

Les mélanomes ont la particularité d'avoir une plasticité phénotypique exacerbée, permettant la présence simultanée de multiples sous-populations phénotypique au sein d'une même tumeur. Contrairement aux variations génétiques irréversibles, la plasticité phénotypique permet aux cellules tumorales de s'adapter de manière réversible face à la pression imposée par le microenvironnement tumoral en constante évolution. Ainsi, à un moment donné, une cellule de mélanome peut avoir un phénotype différencié, prolifératif ou encore invasif, lui permettant d'être extrêmement adaptative face au microenvironnement changeant. Cette plasticité exacerbée implique que la majorité des cellules de mélanome a le potentiel d'adopter des capacités de cellules souches (23). Le dogme que les cellules souches ne représentent qu'une rare population au sein de la tumeur n'est pas valable dans le mélanome. En effet, au moins une cellule sur quatre prise au hasard d'une xénogreffe ou de biopsie de patient est capable d'initier une nouvelle tumeur une fois injectée dans différentes souris immunodéprimées telles que les souris NOD ou SCID (24). Le facteur de croissance neurale NGFR/p75 est un marqueur de cellules souches de crête neurale (25). Le tri des cellules positives pour NGFR avant xénogreffe en cellule unique permet l'obtention d'une tumeur dans 70 pourcent des cas (26). Cette particularité des mélanomes vient du fait que la division asymétrique d'une cellule souche n'est pas la voie principale pour former la population de cellules initiatrice de tumeur. En principe, la simple régulation négative de MITF permet à une cellule en prolifération d'entrer en quiescence et d'adopter un phénotype apparenté au phénotype souche. A l'inverse, la restauration de l'expression de MITF permet de relancer la division cellulaire. Hoek et Goding ont décrit cette plasticité phénotypique sous le nom de switch de phénotype (23). Ainsi, la variation continue entre les états prolifératif / fort en MITF et invasif / faible en MITF permet à la tumeur de proliférer, s'adapter aux signaux du microenvironnement, devenir invasive, disséminer et proliférer de nouveau afin de former une métastase (Figure 10). Un large panel de stress cellulaires auxquels les cellules de mélanome sont exposées sont connus pour réguler négativement MITF,

comme l'hypoxie, des signaux inflammatoires (TGF- β , TNF- α) ou de faibles concentrations en glucose ou acides aminés (27).

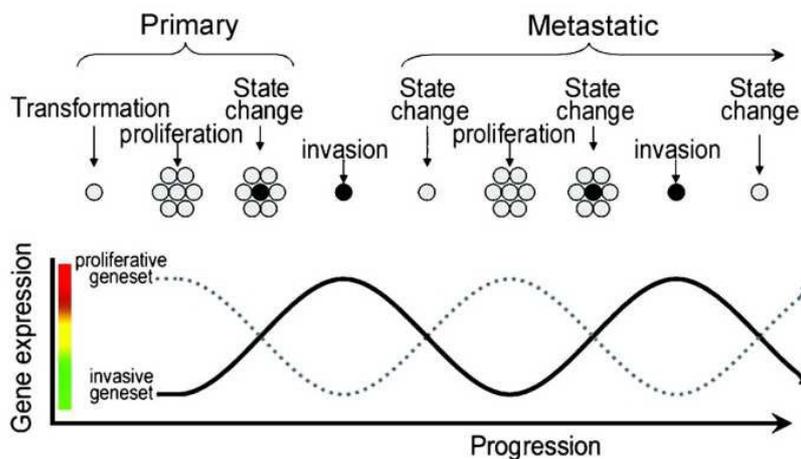


Figure 10 Niveau d'expression des signatures d'invasion et de prolifération au cours de la progression des mélanomes (28)

Depuis, cette notion de switch phénotypique a été largement reprise et implémentée, notamment avec des acteurs clés du phénotype invasif/souche. Les cellules exprimant le récepteur à tyrosine kinase AXL (29) et WNT5a (30) ont des capacités d'invasion augmentées. Les facteurs de transcription TEAD/AP1 (31) induisent aussi une signature invasive qui se chevauche à près de 70 pourcent avec la signature d'invasion initialement décrite. Ce phénotype peut être induit par le TNF- α qui inhibe l'expression de MITF et induit l'expression de JUN, une sous unité du facteur de transcription AP1 (32). Les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire ont aussi la capacité d'induire un changement phénotypique des cellules de mélanome. En l'absence de TGF- β , le complexe YAP-PAX3 induit l'expression de MITF mais en présence de TGF- β le recrutement de YAP par TEAD est favorisé, supprimant l'expression de MITF. Dans ce contexte, YAP est donc un acteur clé de régulation phénotypique entre les états transcriptionnels induits par MITF ou TEAD (33). L'implication de la plasticité phénotypique dans l'initiation et la progression des mélanomes a été élégamment démontrée grâce à un modèle murin possédant un système d'induction de NGFR. La diminution de prolifération associée au phénotype invasif induit par l'expression forcée de NGFR est restaurée dès que l'induction du récepteur NGFR est levée (25).

Le développement d'analyses à l'échelle de la cellule unique est dans ce contexte un outil clé pour l'étude de l'hétérogénéité intratumorale. En analysant les niveaux d'expression de 114 gènes permettant la discrimination entre les états prolifératifs et invasifs, l'équipe d'Irwin

Davidson a mis en évidence la coexistence des différents états *in vitro*, en culture 2D. On trouve en effet quelques cellules aux faibles niveaux d'expression de MITF au sein de la lignée de mélanome 501Mel aux forts niveaux d'expression de MITF, très peu invasive et tumorigénique (34). De manière intéressante, ces travaux ont montré que l'hétérogénéité est augmentée lorsque les cellules sont cultivées en 3D ou *in vivo* dans des xénogreffes tumorales. Aussi, les travaux de Tirosh et al. sont une avancée majeure dans l'étude des mélanomes. 4645 cellules isolées à partir de tumeurs fraîches de 19 patients atteints de mélanome ont été séquencées à l'échelle de la cellule unique, permettant d'analyser pour la première fois l'hétérogénéité intratumorale de mélanomes humains frais (35). Toutes les tumeurs analysées contiennent des cellules tumorales de chacun des deux états au niveau d'expression élevé de MITF ou au niveau d'expression faible de MITF et fort niveau d'expression de la kinase AXL. Enfin, deux études récentes à l'échelle de la cellule unique montrent que les cellules de mélanomes sont capables de transition entre non pas deux mais une multitude d'états au cours de la progression tumorale, en réponse aux signaux du microenvironnement et sous exposition aux agents thérapeutiques (36). Ces différents états stables peuvent être classés suivant le niveau d'activité de MITF depuis l'état hyper-différencié, l'état mélanocytaire, l'état intermédiaire, l'état de privation, l'état apparenté à l'état de cellule souche de la crête neurale et enfin l'état dédifférencié. Les états mélanocytaires, intermédiaires et de privation ont des capacités prolifératives et les états intermédiaires, de privation, apparentés cellules souche de la crête neurale et dédifférenciés sont capables d'invasion. Aussi dans ce modèle, la coexistence des deux états de prolifération et d'invasion est possible (Figure 11).

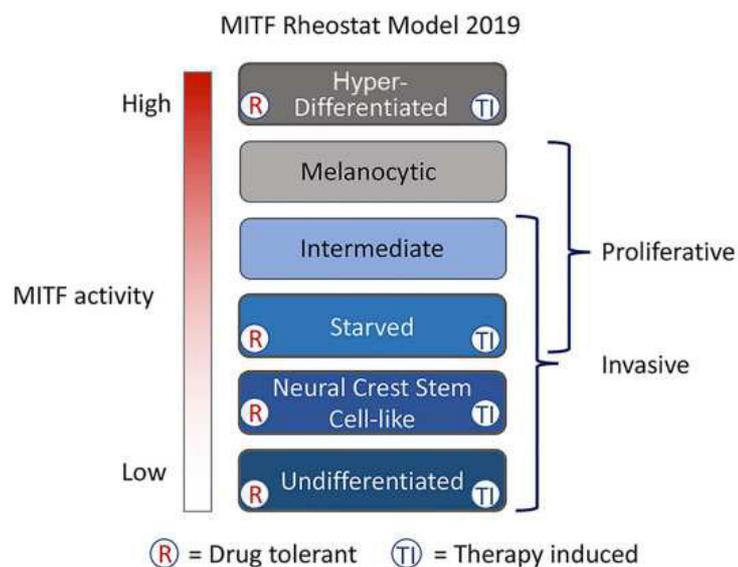


Figure 11 Model de rhéostat de MITF version 2019, proposé par Florian Rambow (37) A gauche, de rouge à blanc un gradient d'expression de MITF et à droite les états prolifératifs et invasifs tels que décrits par Hoek et Goding. Au centre, les six nouveaux états supposés classés en fonction de leur niveau d'expression de MITF à savoir de haut en bas : l'état hyper-différencié, l'état mélanocytaire, l'état intermédiaire, l'état de privation l'état souche, crête neurale et enfin l'état dédifférencié.

2. Thérapies des mélanomes métastatiques

Aujourd'hui, les mélanomes non invasifs sont pris en charge par simple exérèse. Le diagnostic précoce des mélanomes est donc primordial. Dès qu'il a envahi le derme, le traitement du mélanome est plus complexe. Jusqu'en 2010, aucune solution thérapeutique efficace n'existait et le taux de survie à 5 ans était dramatiquement faible. Nous allons voir ci-dessous les avancées thérapeutiques majeures dont bénéficient les patients atteints de mélanome.

2.1. Thérapies ciblées pour les patients BRAFV600: avancées et mécanismes de résistance

Alors que le traitement des mélanomes métastatiques était dépourvu de solution thérapeutique efficace pendant des décennies, la découverte de la mutation activatrice *BRAFV600E* (38) a lancé la révolution des thérapies ciblées. Depuis maintenant dix ans, deux inhibiteurs ATP compétitifs de la kinase BRAF mutée, le vémurafénib et le dabrafénib, sont utilisés en clinique pour les patients présentant la mutation *BRAFV600E*. Les inhibiteurs de BRAF étaient premièrement administrés seuls et sont maintenant couramment combinés à un inhibiteur de MEK, le trametinib ou le cobimetinib (39; 40). La moitié des patients mutés pour *BRAF* montrent

un réel bénéfice des thérapies ciblées avec une régression tumorale rapide et drastique dans les semaines qui suivent la mise sous traitement. Cependant, quasiment tous les patients rechutent peu de temps après et le taux de survie à cinq ans est dramatiquement faible. Les principaux mécanismes de résistance sont liés à une réactivation de la voie des MAPKinase par des mutations activatrices des oncogènes *NRAS* ou *KRAS*, *MEK1/2* ou *ERK1/2*, l'amplification de *BRAF* ou épissage alternatif du transcrite de *BRAF*, la perte de l'inhibiteur de kinase *CDKN2A* ou encore la réactivation de la voie PI3K/AKT par la perte de *PTEN* ou encore l'amplification d'*AKT*. Cependant, aucune altération génétique claire ne peut être identifiée dans 40 pourcent des cas de rechute suggérant l'implication d'altérations transcriptomiques. (41). Sous la pression des inhibiteurs de MAPK, les cellules de mélanome s'adaptent rapidement grâce à leur plasticité phénotypique exacerbée. Le traitement par inhibiteur de BRAF induit une augmentation d'expression de multiples marqueurs d'invasion tels qu'EGFR, AXL, NGFR, TEAD et YAP. Ces cellules invasives semblent programmées pour résister aux inhibiteurs de BRAF. La dédifférenciation est un mécanisme de réponse fréquente aux inhibiteurs de MAPK, permettant à quelques cellules résiduelles de mélanome de persister jusqu'à l'acquisition de mutations permettant la résistance aux traitements. On parle alors de phase de tolérance. Une étude récente d'analyse en cellules uniques à partir d'une cohorte de xénogreffe dérivées de patient (PDX), greffées chez la souris et traitées par inhibiteurs de MAPK détaille cette phase de tolérance et l'hétérogénéité phénotypique qui lui est associée. Le profil transcriptomique des tumeurs PDX avant, pendant et après traitements par inhibiteurs de BRAF/MEK a permis la distinction de quatre états de tolérance des cellules résiduelles. Un des états se distingue par une forte diminution des signatures métaboliques et possède des caractéristiques communes aux cellules privées de nutriments. Cet état est donc qualifié d'état de privation (SMC – Starved Melanoma Cell). Cet état SMC montre des niveaux d'expressions intermédiaires de MITF et possède des capacités prolifératives et invasives. A partir de cet état de privation, deux trajectoires principales sont possibles : l'hyperdifférenciation ou la dédifférenciation. En plus du phénotype dédifférencié MITF faible / AXL fort, cette étude a permis l'identification du rôle majeur du récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque RXR dans la formation de la sous-population au phénotype associé à un phénotype de cellule de crête neurale. L'identification et la caractérisation précise des phénotypes tolérants aux inhibiteurs de BRAF/MEK suggèrent de nouvelles pistes de combinaisons thérapeutiques permettant de cibler et d'éliminer les cellules résiduelles, prévenant ainsi l'apparition de résistance (Figure 12) (37).

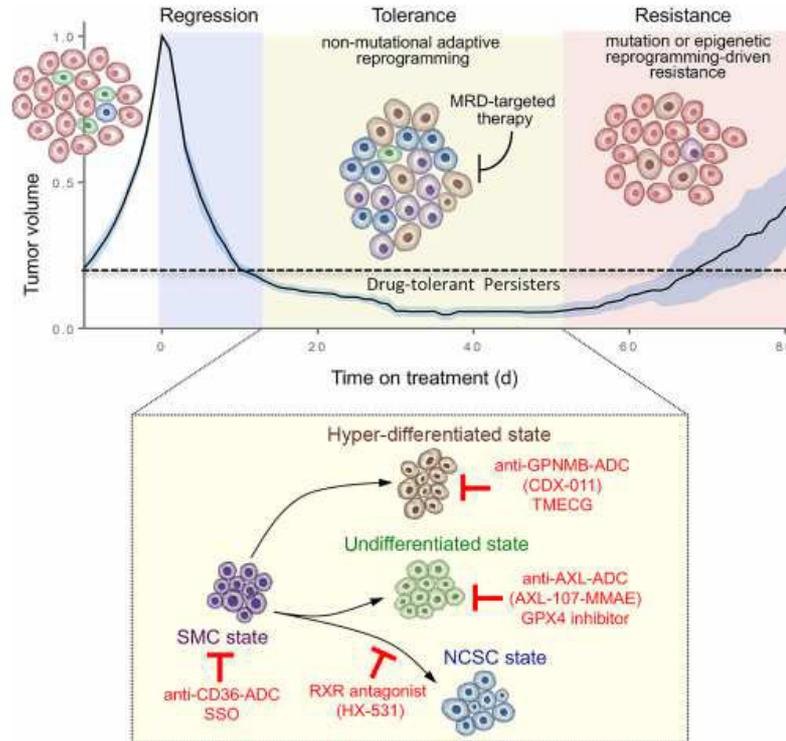


Figure 12 Sélection de clones résistants aux thérapies ciblées par reprogrammation phénotypique. En haut : schématisation de la réponse aux thérapies ciblées avec une première phase de régression drastique suivie d’une phase de tolérance où coexistent les clones ayant résisté au traitement par adaptation phénotypique jusqu’à émergence d’un ou plusieurs clones capables de proliférer malgré la pression thérapeutique. En bas : potentielles vulnérabilités thérapeutiques des populations tolérantes à la thérapie.

Tsoi et al. ont comparé les trajectoires prises par les cellules de mélanome en réponse au vémurafénib (inhibiteur de BRAF) ou à un signal inflammatoire (TNF- α , IFN- γ) avec les états de différenciation progressive depuis la cellule souche embryonnaire vers le mélanocyte différencié en passant par les états de cellule de crête neurale et mélanoblaste (42). Aussi, quatre états ont pu être identifiés, de l’état le plus différencié vers un état de dédifférenciation extrême : l’état mélanocytaire, l’état transitoire, l’état associé à la crête neurale et l’état dédifférencié. La description de ces nouveaux états ne remet pas en cause le modèle de plasticité phénotypique décrite par Hoek et Goding. En effet, l’analyse des niveaux d’expression des marqueurs des états prolifératifs et invasifs indique que les états mélanocytaires et transitoires de Tsoi s’apparentent à l’état prolifératif, fort en MITF alors que les états de crête neurale et dédifférenciés sont associés à l’état invasif, faible en MITF et au fort niveau d’expression d’AXL (Figure 13). Ces deux études ont permis à Rambow et al. d’actualiser le modèle du rhéostat de MITF version 2019 (Figure 11).

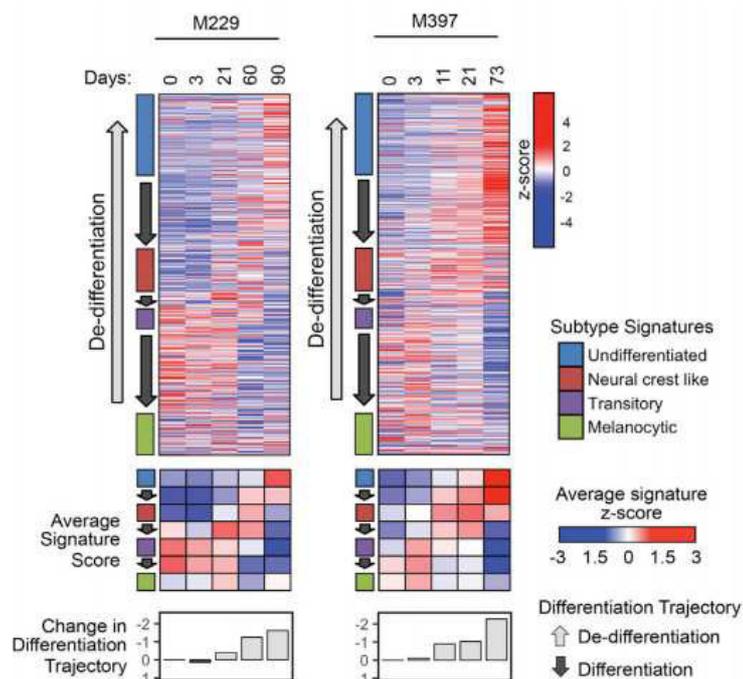


Figure 13 Heatmap des gènes des signatures mélanocytaire (vert), transitoire (violet), crête neurale (rouge) et dédifférenciée (bleue) et de leur moyenne (Z score) pour les lignées de mélanome M229 et M397 sous exposition chronique au vémurafénib pendant 90 jours (42).

Concernant les patients présentant une mutation de l'oncogène NRAS, l'utilisation des thérapies ciblées offre de très faibles opportunités thérapeutiques. Des combinaisons de traitements sont en cours d'investigation. Les immunothérapies sont également un espoir thérapeutique pour tous les patients atteints de mélanome, quelle que soit leur statut mutationnel *BRAF* et *NRAS*.

2.2. Immunothérapies : avancées et mécanismes de résistance

Les immunothérapies constituent la deuxième révolution thérapeutique développée en parallèle des thérapies ciblées. Les immunothérapies sont principalement basée sur le contrôle physiologique du système immunitaire par les points de contrôle du système immunitaire (ICP, Immune Checkpoint) et leurs ligands (ICPL, Immune Checkpoint Ligand). Je décrirai ce mécanisme de contrôle du système immunitaire dans le deuxième chapitre et resterai plus clinique ici. Les immunothérapies présentent deux intérêts principaux. Elles peuvent être administrées quel que soit le fond mutationnel du mélanome. Elles sont donc une opportunité thérapeutique importante pour les patients ne présentant pas la mutation *BRAFV600E*. De plus, alors que les thérapies ciblées offrent des réponses rapides mais de courte durée, l'espoir des immunothérapies réside dans leur capacité à induire des réponses durables (43; 44).

L'ipilimumab, un anticorps anti CTLA-4 (Anti-Cytotoxique T-Lymphocyte Antigen-4) fut la première thérapie à anticorps à montrer un bénéfice clinique, avant l'approbation en 2015 par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) de deux nouveaux couples d'anticorps ciblant un nouveau point de contrôle du système immunitaire PD-1 (récepteur de mort programmée) et son ligand PDL-1 (45). Deux anticorps anti-PD-1, le nivolumab (Opdivo®) et le pembrolizumab (Keytruda®), sont autorisés en France pour le traitement des mélanomes avancés (non résecables ou métastatiques) avec une autorisation de mise sur le marché en 2015 en France. Initialement, les immunothérapies étaient indiquées en première ligne pour les patients ne présentant pas la mutation *BRAV600E* et en deuxième ligne après les thérapies ciblées dans le cas des mélanomes BRAF-mutés. L'ordre et la combinaison des deux approches pour les mélanomes BRAF-mutés ont ensuite été débattus et étudiés. Plus tard, des extensions d'indications ont permis d'élargir l'utilisation des anti-PD-1 aux cancers bronchiques non à petites cellules, aux carcinomes à cellules rénales, aux lymphomes de Hodgkin classique, aux carcinomes urothéliaux et aux cancers épidermoïdes de la tête et du cou. Des études récentes dans le mélanome démontrent l'efficacité de la combinaison nivolumab/ipilimumab sur la survie avec un suivi sur plus de 5 ans (Figure 14). Après 60 mois d'étude, la survie moyenne globale des patients traités par la combinaison ipilimumab/nivolumab n'était pas atteinte, alors qu'elle était de 36.9 mois dans le groupe ayant reçu le nivolumab et 19.9 mois dans le groupe traité par ipilimumab monothérapie (44). De plus, la combinaison ipilimumab/nivolumab a une efficacité clinique sur les métastases cérébrales (46). Malheureusement en France, l'arrêté du 20 novembre 2017 a radié l'ipilimumab des prestations prises en charges par l'assurance maladie, privant les patients français atteints de mélanome des bénéfices de la bi-thérapie ipilimumab/nivolumab. D'autre part, l'utilisation d'immunothérapies anti-PD-1 en thérapie adjuvante est une avancée majeure de ces dernières années dans la prise en charge des mélanomes de stade 3 ou 4 après résection chirurgicale de la lésion, permettant d'allonger la survie sans récurrence du mélanome et de diminuer son grade en cas de réapparition (47; 48). En France, l'utilisation des anti-PD-1 en traitement adjuvant en monothérapie chez les patients atteints de mélanomes de stade 3 ou 4 après résection complète est également indiquée depuis 2018.

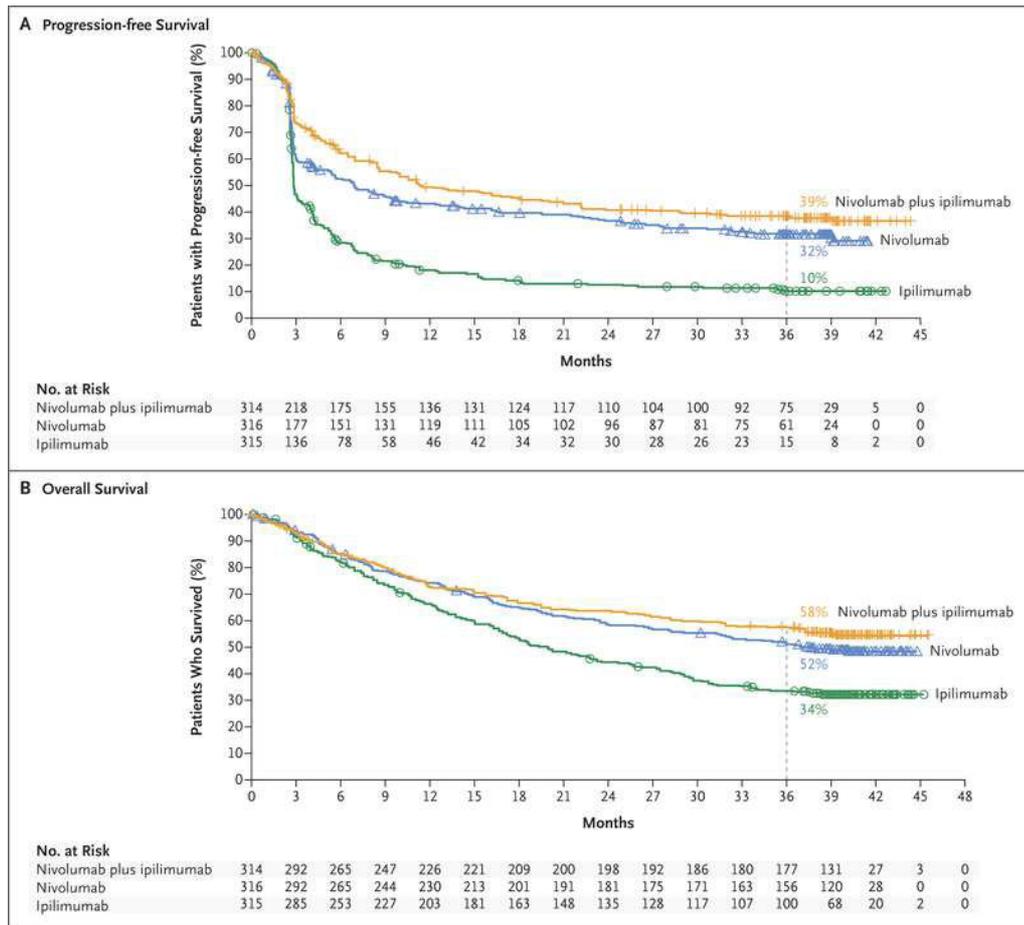


Figure 14 Courbes de Kaplan Mayer représentant en A la survie sans progression et en B la survie globale pour les patients traités par la combinaison ipilimumab/nivolumab (trait jaune), nivolumab seul (triangles bleus) et ipilimumab seul (rond verts).

Malgré le bénéfice certains des immunothérapies, 60 pourcent des patients traités par anticorps anti-PD-1 présentent une résistance acquise ou innée. Actuellement, les mécanismes de résistance sont en cours d’investigation. La présence du ligand PDL-1 n’est pas un marqueur de réponse aux immunothérapies par anti-PD-1 dans le mélanome (à la différence du poumon par exemple). Seulement un sous-groupe de patients exprimant le ligand PDL-1 montre une réponse clinique sous anti-PD-1. A l’inverse, certains patients n’exprimant pas PDL-1 ont un réel bénéfice clinique sous anti-PD1 (49). Des facteurs additionnels modulent donc la réponse clinique. Quelques événements génétiques ont été associés à la résistance innée aux immunothérapies et de manière similaire à la résistance aux thérapies ciblées, la plasticité phénotypique semble jouer un rôle clé dans la résistance aux immunothérapies. L’équipe de Roger Lo a identifié pour la première fois une signature transcriptomique de résistance innée aux anti-PD-1 (IPRES) qui possède des similarités avec les signatures de résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK, incluant l’expression d’AXL, ROR2 et WNT5A (50). L’étude n’a cependant pas inclus que des patients traités en première ligne par les immunothérapies mais certains patients ont été évalués après

acquisition de résistance aux inhibiteurs de BRAF/MEK, pouvant biaiser l'établissement de la signature. Cependant, il est intéressant dans le cadre de ma thèse de retenir ce concept. Je détaillerai dans le deuxième chapitre les mécanismes de résistance démontrés depuis, après avoir décrit tous les concepts nécessaires à leur compréhension.

3. Modèles d'études des mélanomes

Le choix des modèles d'étude doit être orienté par la compréhension globale des avantages et inconvénients relatifs à chaque modèle. Les conclusions doivent toujours être relativisées en connaissances des limites intrinsèques au modèle utilisé et la combinaison de différentes approches lorsque cela est possible renforce rigoureusement les travaux. J'ai choisi ici de recenser l'ensemble des modèles existants pour l'étude des mélanomes en insistant sur leurs avantages et limites. Je détaillerai particulièrement les modèles permettant l'étude du microenvironnement immunitaire, au cœur de mes travaux.

3.1. Culture en monocouche de cellules de mélanome adhérentes - *in vitro* 2D

Il existe un nombre conséquent de lignées de mélanome humaines disponibles grâce à la collection américaine ATCC. Les cellules de mélanome sont des cellules adhérentes qui se cultivent facilement en 2D. Les tests en deux dimensions ont permis et permettent encore la caractérisation de la biologie cellulaire des mélanomes et les premiers essais de thérapies *in vitro*. Les cultures cellulaires ont l'avantage d'être « pures » en cellules de mélanomes, c'est à dire exemptes de toute contamination par un autre type cellulaire, ce qui est très important pour les caractérisations au niveau ADN, ARN et protéines. Je reviendrai sur cette notion clé de pureté lorsque je détaillerai les données de bioinformatique disponibles. A l'inverse, les monocultures peuvent faire défaut étant donné l'influence de certains signaux du microenvironnement sur les niveaux d'expression ARN et protéiques de certaines voies de signalisation. Dans ce cas, des expériences de co-culture sont très intéressantes, permettant de détailler les interactions cellulaires. Par exemple, la prolifération aberrante des mélanocytes cultivés en monoculture est résolue lorsque les mélanocytes sont cultivés avec des kératinocytes (51).

La limitation majeure des lignées cellulaires de mélanome est leur établissement et maintien en culture sous des conditions non-physiologiques, ce qui induit inévitablement une sélection de clones qui ne reflète pas l'hétérogénéité intra-tumorale de la tumeur d'origine. La caractérisation

transcriptomique de 86 lignées de mélanome a montré que les cellules en culture s'équilibrent dans un état soit de prolifération, soit d'invasion (52). Une fois injecté *in vivo* chez la souris, chaque type cellulaire est capable de former des tumeurs hétérogènes, mettant en évidence l'importance du switch phénotypique *in vivo* et des signaux du microenvironnement (28). Certaines molécules comme le TGF- β perturbent l'état d'équilibre *in vitro* et permettent l'induction de la transition phénotypique (52). Cependant, certains mécanismes épigénétiques, semblent être verrouillés dans des lignées établies depuis des années. C'est ce que révèle l'étude du laboratoire de JC Marine, qui montre entre autre la relevance et l'intérêt des cultures à court terme (31). Les cultures à court terme sont établies à partir de biopsies de patient et n'ont subi qu'un faible nombre de passage. Il est rare d'obtenir des biopsies cutanées, de mélanome primaire ou de métastase, étant donné leur taille souvent petite et la priorité évidente placée sur leur utilisation pour le diagnostic. Une voie majeure d'obtention de lignées de mélanome dérivées de patients est l'utilisation des métastases liquides, principalement ascites et épanchements pleuraux. Les épanchements pleuraux sont dus à une production excessive de liquide séreux en réponse à l'implantation de nodules cancéreux sur la surface séreuse de la plèvre. Les ascites sont une accumulation de liquide dans la cavité péritonéale. Ces excès de liquide, de parfois plusieurs litres, doivent être ponctionnés afin de soulager le patient. Ces ponctions contiennent entre autre des cellules de mélanome qui peuvent être mises en culture ainsi que des cellules immunes. Les cultures à court terme s'insèrent bien dans le modèle de switch phénotypique et sont tout à fait adaptées à l'étude des états prolifératifs et invasifs. Alors qu'une signature de 97 gènes avait été identifiée pour définir les états prolifératifs et invasifs à partir de lignées établies de mélanome, l'analyse transcriptionnelle de cultures à court terme a permis de considérablement élargir la liste des gènes impliqués dans les deux états avec respectivement 643 et 772 gènes caractéristiques des états invasifs et prolifératifs, tout en incluant intégralement la signature initiale. De plus, alors que les régulateurs clés du phénotype prolifératif MITF et SOX10 avaient déjà été bien identifiés, la régulation du phénotype invasif était encore floue. L'analyse combinée du transcriptome et de l'architecture de la chromatine de dix cultures à court terme a permis d'identifier des milliers de régions régulatrices contrôlant les états prolifératifs et invasifs, confirmant non seulement le rôle majeur des facteurs de transcription SOX10 et MITF et identifiant le nouveau réseau de facteurs de transcription AP-1/TEAD comme majeur régulateur de l'état invasif (31). Cette étude suggère que la culture prolongée de lignées établies verrouille la chromatine dans une conformation empêchant l'observation de certains mécanismes transcriptionnels. Avec un faible nombre de

passages, les lignées à court terme sont moins figées. De plus, les métastases liquides étant malheureusement associées à des mélanomes en progression rapide, il est parfois possible d'avoir des prélèvements avant/après mise sous traitement ou après acquisition de résistance, permettant la génération de couples de modèles sensibles/résistants physiologiques.

Il est également possible d'induire la résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPKinases par exposition chronique à des doses de plus en plus fortes. Cette méthode, très utile afin d'étudier l'acquisition de résistance aux traitements n'est cependant pas physiologique.

3.2. Culture en trois dimensions - *in vitro* 3D

Bien que les cultures cellulaires en deux dimensions soient très satisfaisantes pour les études de biologie moléculaire, elles ne prennent pas en considération la croissance orientée en trois dimensions des mélanomes, en interaction constante avec son microenvironnement. Il a été montré que la croissance en trois dimensions favorisait la résistance aux traitements des mélanomes. Par exemple, la simple culture en trois dimensions des cellules de mélanome HBL altère la reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques effecteurs spécifiques, qui est intacte dans le cas de la culture en deux dimensions (53). Les cultures en trois dimensions peuvent être donc un bon compromis entre le manque absolu de microenvironnement des cultures en deux dimensions et la complexité des modèles animaux. Ces structures en trois dimensions s'attachent à recréer un environnement proche d'une tumeur *in vivo* en reproduisant notamment les zones de nécrose, les difficultés d'accès à l'oxygène et aux nutriments ou encore aux molécules thérapeutiques. Parmi les structures en trois dimensions, les organoïdes sont une approche particulièrement intéressante. Initialement, les organoïdes étaient établis à partir de cellules souches embryonnaires ou adultes. De manière remarquable, leur structure en trois dimensions reflète bien le tissu d'origine (54). Ces dernières années, des organoïdes dérivés de biopsies de patients ont été développés dans le but de mimer au plus proche la tumeur d'origine et son microenvironnement. Neal et al. ont développé un système de culture d'organoïdes dérivés de biopsies de patient à l'interface air-liquide incluant les cellules stromales et immunes. Les organoïdes développés à partir de différents types tumoraux conservent l'architecture histologique du microenvironnement tumoral. De manière remarquable, les lymphocytes T infiltrants sont pleinement fonctionnels et leur répertoire de TCR est conservé, ce qui ouvre des perspectives sur l'utilisation des immunothérapies anti-PD-1 (55).

D'autres approches sont en cours de développement afin d'étudier la tumeur humaine dans son environnement complet. Une première approche vise à reconstruire la peau en trois dimensions, afin d'y cultiver les cellules tumorales. Cultivés sur le derme, les kératinocytes se différencient afin de former les différentes couches de l'épiderme. La culture de cellules de mélanome au sein de ces structures permet de prendre en compte la structure et composition de la peau dans l'évolution des mélanomes. Il serait possible de greffer des cellules immunes dans ces peaux.

Une autre approche vise à maintenir en culture *ex vivo* des biopsies de patients intactes après retrait chirurgical. En gardant intacte la biopsie, l'architecture tumorale ainsi que les relations spatiales et interactions entre les cellules tumorales et stromales ou immunes sont conservées. L'avantage majeur est la conservation de l'infiltrat immunitaire au sein de la biopsie. Cette approche est encore en développement mais a été utilisée dans le cas des cancers colorectaux où le traitement de biopsies de patients *ex vivo* s'est avéré prédictif de la réponse à l'inhibiteur de MEK1/2 selumetinib (56).

3.3. Xénogreffes dérivées de patient (pdx)

Afin de suivre l'évolution de la tumeur dans un environnement plus physiologique, les lignées de mélanome ou prélèvements de tumeurs de patients peuvent être greffés chez l'animal, en général chez des souris immunodéprimées telles que les souris Swiss nude, *Rag* Knock-out, les NOD/SCID ou les NSG. Les souris nude n'ont pas ou peu de lymphocytes T à cause d'une aplasie thymique. Les souris *Rag-KO* n'ont pas de lymphocytes B et T matures. Les souris NOD/SCID (Non-Obese Diabetic Severe Combined ImmunoDeficiency) n'ont ni lymphocytes B ni T suite à une mutation du gène *Prkdc* dans un contexte NOD lié à une défaillance de l'activité des macrophages et Natural Killer. Une mutation supplémentaire invalidante pour le gène codant pour la chaîne commune du récepteur à l'interleukine 2 donne la souche NSG (pour NOD/SCID γ).

La croissance en PDX permet les interactions directes entre les cellules de mélanome humaines et le stroma murin, incluant les vaisseaux lymphatiques et sanguins. Fréquemment, les cellules sont injectées en sous-cutané ou en intradermique. Les xénogreffes sont adaptées à l'étude de l'impact de thérapies anticancéreuses telles que les thérapies ciblées dans le mélanome (37). Les xénogreffes ont l'avantage de permettre un test relativement rapide des différentes stratégies thérapeutiques à partir de cellules humaines dans un environnement presque complet (57) (Figure 15).

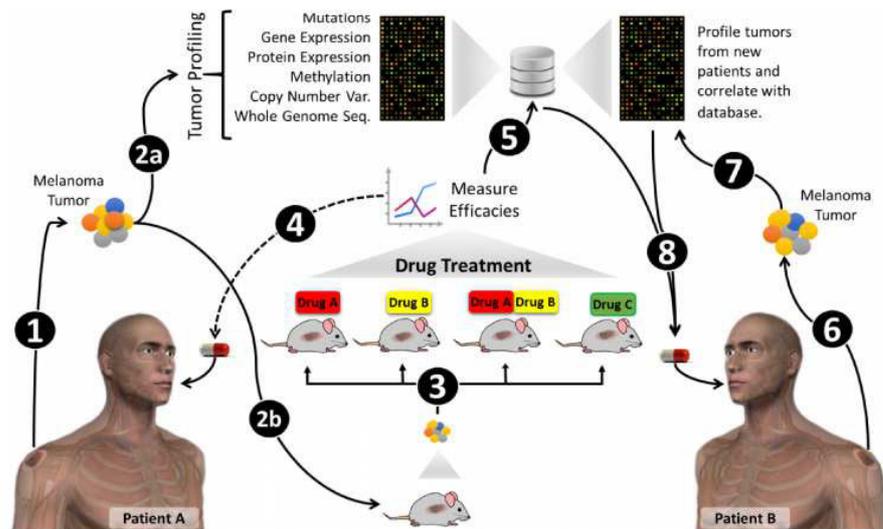


Figure 15 Potentiel des xénogreffes dérivées de tumeurs de patients dans la mise en place de la thérapie personnalisée. La tumeur extraite par chirurgie (1) est séquencée afin d'obtenir ses profils mutationnels, transcriptionnels, etc. et transplantée en parallèle chez la souris pour le développement de PDTX (2b). L'amplification du modèle PDTX permet le test de différentes opportunités thérapeutiques (3) permettant de sélectionner la meilleure stratégie thérapeutique pour le patient (4). Si le traitement s'avère efficace, il pourra être rapidement étendu aux patients ayant un profil tumoral semblable (6-8) (58).

La principale limitation des modèles de PDX est l'absence de système immunitaire nécessaire à la croissance de tumeurs humaines chez la souris, malgré le développement de modèles murins humanisés dans lesquels est également greffée une sélection de cellules immunitaires. Des lymphocytes et des cellules souches hématopoïétiques CD34+ purifiées à partir de moelle osseuse, sang de cordon ombilical ou tissus thymique peuvent être transférées dans des souris immunodéprimées et modèles PDX. Idéalement, les cellules proviennent du même patient, ce qui évite les réactions immunes contre la tumeur greffée (59). Les lymphocytes T et B développés à partir du transfert de cellules souches hématopoïétiques ont subi la sélection négative au cours de leur différenciation chez la souris et sont donc tolérants aux cellules murines de l'hôte. Cependant, le manque de cytokines humaines ne permet pas la croissance et différenciation de toutes les populations immunes à partir de cellules souches hématopoïétiques. De plus, les biopsies de moelle osseuse ne sont pas toujours souhaitables ou réalisables pour le patient. L'utilisation de tissus fœtaux quant à elle pose des problèmes éthiques. Enfin, des modèles utilisant les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) du patient sont en cours de développement. Dans ce cas, les lymphocytes transférés sont déjà matures, permettant l'analyse des fonctions immunitaires des cellules du patient, l'analyse de réponse antigénique ou de réponse aux immunothérapies. Cependant, la maturité des lymphocytes provoque de fréquentes

réactions contre l'hôte pouvant entraîner la mort de l'animal. Les études sont donc généralement limitées à quatre semaines (60).

Afin d'étudier en profondeurs les interactions entre les cellules tumorales et le système immunitaire, l'utilisation de modèles murins immunocompétents est alors incontournable, bien que les études intégrales chez la souris nous éloignent du patient. Il est important de mentionner les différences histologiques entre l'homme et la souris. La biologie et la localisation des mélanocytes peuvent différer entre l'homme et la souris. Chez la souris, les mélanocytes sont localisés dans les follicules pileux et jouent un rôle majeur dans la pigmentation des poils. Chez l'homme, les mélanocytes ne sont que rarement au sein d'un follicule pileux et délivrent la mélanine aux kératinocytes environnant afin de protéger l'épiderme des dommages induits par les radiations UV. Cette remarque prend tout son sens dans l'étude du microenvironnement immunitaire, dont les populations résidentes diffèrent entre l'épiderme et le derme (confère chapitre 2).

3.4. Modèles murins de transplantation syngénique

Afin de permettre la formation tumorale chez l'animal immunocompétent, il est nécessaire que l'espèce et le fond génétique soient conservés entre la lignée cellulaire injectée et l'animal receveur. On parle alors de greffe syngénique. Dans le cas de lignées établies à partir de mâles, il est même nécessaire de les injecter dans des animaux de sexe masculin afin d'éviter un rejet lié à l'expression du chromosome sexuel Y. De nombreuses études utilisent la lignée cellulaire B16 générée chez la souris C57BL6/6J. Le mélanome spontané initial a été obtenu par induction chimique et des clones ont été sélectionnés par passages *in vivo* successifs incluant les clones B16F1 et B16F10. Le clone B16F1 a un faible potentiel métastatique alors que le variant B16F10 présente un fort potentiel métastatique, notamment vers le poumon. Les B16 sont très différenciées, exprimant de forts niveaux de *tyrosinase* et protéines associées *Trp2*. Ainsi, les B16 sont très pigmentées. Les B16 prolifèrent très rapidement, limitant les temps d'étude à quatre semaines après injection maximum. Regardant le profil mutationnel, les B16 diffèrent des mélanomes majoritaires humains. Bien que l'on retrouve des mutations inactivatrices du gène *Cdkn2a*, l'oncogène *Braf* est intact ainsi que le suppresseur de tumeur *Pten*. Autre point important, les B16 n'expriment que faiblement le complexe majeur d'histocompatibilité 1, les rendant très peu immunogènes (confère chapitre 2). Dans l'ensemble, bien que très souvent

utilisé, la relevance de l'utilisation de ce modèle questionne et nous préférons l'utilisation de lignées établies à partir de modèles transgéniques.

3.5. Modèles transgéniques murins

Les souris sauvages développent rarement des mélanomes spontanément. Des modèles transgéniques ont été développés en activant des oncogènes impliqués dans les mélanomes humains comme *Braf* et *Nras* et/ou en inactivant des gènes suppresseurs de tumeurs connus tels que *Pten* ou *Cdkn2a* au sein du lignage mélanocytaire. Avec un temps de latence plus ou moins long, des mélanomes apparaissent de manière spontanée, souvent au sein de nævus, site d'apparition naturel de mélanome. L'avantage incontournable de ces modèles d'étude est la présence d'un système immunitaire totalement fonctionnel, qui joue un rôle majeur sur la croissance tumorale et la réponse aux thérapies (61).

Un des premiers modèles de mélanome transgénique murin fut établi par l'expression du virus vacuolant SV40 dans le lignage mélanocytaire sous le contrôle du promoteur de la *tyrosinase*. L'expression de la protéine virale mime la perte de *Cdkn2a* en supprimant les voies de signalisation Rb et p53. Des mélanomes oculaires sont d'abord induits puis plus rarement et tardivement, des mélanomes cutanés peuvent apparaître mais sont très souvent bénins (62).

L'importance des mutations de l'oncogène *Ras* dans le développement des mélanomes a été étudiée *in vivo* grâce à l'expression dans le lignage mélanocytaire d'un transgène constitué d'une forme mutée de *NRas* sous le contrôle du promoteur de la *tyrosinase*. La seule expression de la forme mutée *NrasQ61K* dans les mélanocytes permet le développement de tumeurs mais avec une incidence relativement faible de 29 pourcent et une latence très longue de 70 semaines. Le croisement de ces souris avec des souris Knock-Out pour *p16Ink4a/p16ARF* augmente significativement l'incidence et diminue la latence qui passent de 83 pourcent à 65 semaine dans le cas des souris hétérozygotes *Ink4a+/-* et 94 pourcent à 42 semaines de latence pour les homozygotes *Ink4a-/-*. Ces tumeurs sont agressives et métastases dans 30 pourcent des cas vers le ganglion ou d'autres organes (63). Dans ce modèle, la mutation *NrasQ61K* est présente dans les mélanocytes dès le développement embryonnaire, ce qui est rarement le cas physiologiquement. Les bébés ont alors un phénotype bien reconnaissable puisqu'ils sont rapidement bien plus noirs, avec une coloration particulièrement marquée au niveau des pattes, de la queue et des oreilles. Le phénotype de ces souris est délétère. En plus d'induire des

mélanomes, ses souris souffrent d'épaississement et de vieillissement précoce de la peau et de problèmes oculaires tels que la cataracte (Figure 16).

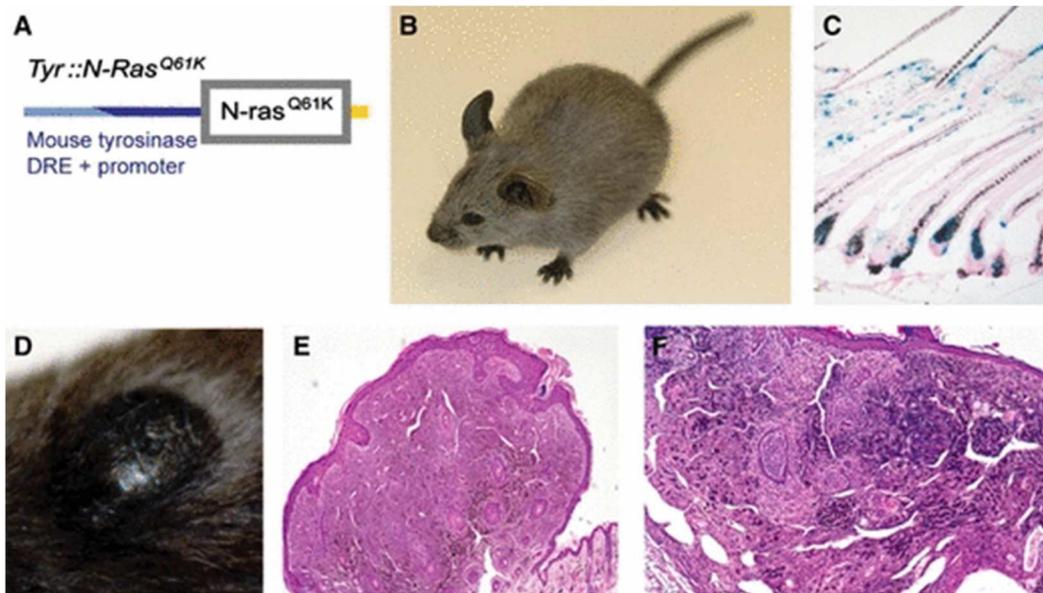


Figure 16 Souris transgénique Tyr::N-RasQ61K (Ackermann et al., 2005). (A) Schéma de la construction Tyr::N-RasQ61K. (B) Hyperpigmentation particulièrement évidente sur les oreilles et pattes. (C) coupe de peau d'une souris bitransgénique Dct::lacZ; Tyr::N-RasQ61K à deux mois. (D) Mélanome apparu sur le dos de la souris (E) coloration H&E (F) Grossissement de (E) montrant l'invasion de cellules de mélanome (64)

L'importance de la mutation *BrafV600E* dans la transformation des mélanocytes et le développement des mélanomes a été étudiée dans un modèle très physiologique induisant l'insertion de la mutation *BrafV600E* au niveau du locus du gène *Braf* endogène grâce à la technologie LoxP/stop/LoxP(LSL)/Cre recombinase. Le réarrangement *LSL-BrafV600E* est régulé par une Cre-recombinase inductible au tamoxifène (*CreERT2*), placée sous le contrôle du promoteur de la *tyrosinase*. Ainsi, le modèle *LSL-BrafV600E;Tyr::CreERT2+/-* (abrégé *BrafV600E/CreERT2*) permet un contrôle précis de l'acquisition somatique de la mutation de *BrafV600E* à l'âge adulte dans les mélanocytes (Figure 17) (65). La seule activation de *BrafV600E* induit le développement de mélanomes cutanés avec une incidence relativement élevée de 54 pourcent à 12 mois. Cependant, toutes les lésions ont en fait des niveaux d'expressions élevés d'*Akt* et de faibles niveaux d'expression de *p16Ink4a*. C'est à partir de ce modèle *BrafV600E/CreERT2* que nous avons généré les lignées de mélanomes murins 16eM3, 25fF4 et 42bM6 utilisées pour mes travaux de thèse (Article 2). La suppression simultanée de *p16Ink4a* augmente la pénétrance à 80 pourcent à 1 an. Rapidement après induction au tamoxifène sur le dos rasé des souris, des tâches pigmentées apparaissent sur la peau de la souris en trois/quatre semaines. Ces lésions pré-malignes se transformeront éventuellement plus tardivement, après un

an environ. Les tumeurs *BrafV600E/CreERT2* ont la particularité d'être très peu différenciées. Elles ne sont pas pigmentées et expriment de très faibles niveaux d'expression de la *tyrosinase* et protéine associée *Trp2*. Elles ne sont pas métastatiques, permettant l'étude de mélanomes primaires et des événements précoces du développement des mélanomes.

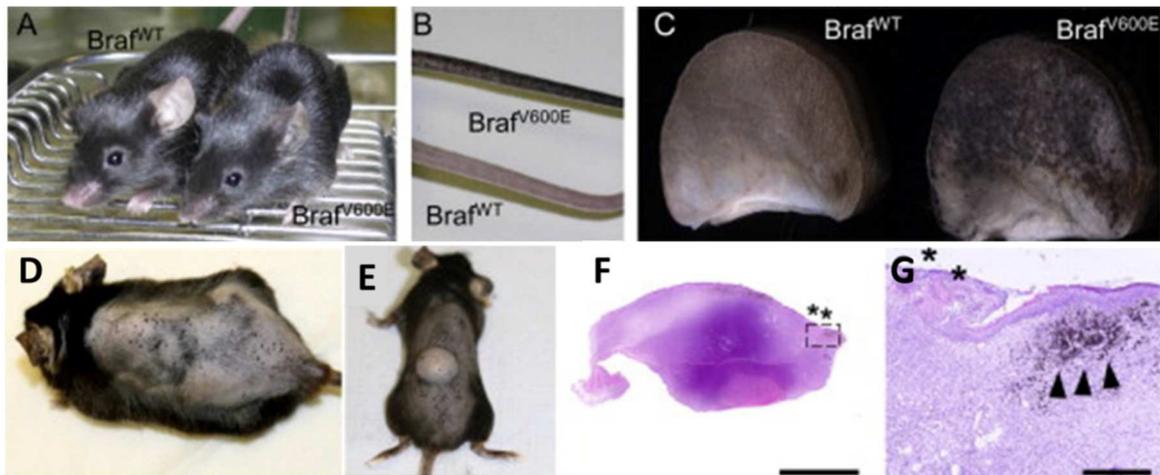


Figure 17 adaptée de (65) Phénotype des souris *BrafV600E/Cre ERT2* (A)(B) et (C), hyperpigmentation des souris *BrafV600E/Cre ERT2*. (D) Apparition des multiples nævi sur la peau rasée des souris *BrafV600E/Cre ERT2* après application du tamoxifène (E)(F) et (G) tumeur de mélanome *BrafV600E/Cre ERT2*

Afin de diminuer la latence d'obtention des mélanomes, la délétion de *Pten* est souvent combinée à l'activation de *Braf*. En effet, dans le modèle *Tyr:Cre-ERT2 BrafCA/+; PTENlox/lox*, les lésions mélanocytaires apparaissent 7 à 10 jours seulement après application du tamoxifène et les souris développent des mélanomes métastatiques agressifs qui arrivent en point limite en seulement 25 à 50 jours (66; 67). La prolifération des cellules de mélanome est si rapide qu'elle apparaît simultanément dans l'épiderme et le derme.

L'équipe de JC Marine a développé un modèle permettant de mieux mimer l'invasion à travers la jonction dermo-épidermique : ils ont ainsi appliqué le tamoxifène non pas sur le dos mais sur la queue des souris. Les mélanocytes dorsaux sont principalement localisés au sein de follicules pileux et contribuent à la pigmentation du pelage. A l'inverse, les mélanocytes de la queue se trouvent à la jonction dermo-épidermique entre les follicules où ils peuvent transférer la mélanine aux kératinocytes voisins. Chez l'homme, la grande majorité des mélanocytes sont interfolliculaires. De plus, la transformation de mélanocytes interfolliculaires matures différenciés est suivie d'une phase de croissance radiale avant l'invasion du derme par croissance verticale (68).

Récemment, un nouveau modèle a été développé permettant également de mieux mimer les phases de croissances radiales dans l'épiderme puis d'invasion verticale du derme observées chez l'homme tout en affinant la question encore ouverte concernant la cellule d'origine du mélanome. Au lieu d'induire la mutation *BrafV600E* et la perte de *Pten* dans tout le lignage mélanocytaire par contrôle du promoteur de la *tyrosinase*, Sun et al. proposent de n'affecter que les potentielles cellules souches mélanocytaires en plaçant la construction *Cre-ERT2 BrafCA/+; PTENlox/lox* sous le contrôle du promoteur de *c-KIT* (69).

Le modèle de surexpression d'*HGF/SF* sous le contrôle du promoteur de la métallothionéine permet également de mimer le développement des mélanomes avec les phases de nævus bénin, croissance radiale puis verticale et dissémination métastatique. En se liant au récepteur à tyrosine kinase MET, HGF/SF active les voies des MAPKinases et PI3Kinases. Les souris HGF/SF ont des mélanocytes dans l'épiderme, le haut du derme et surtout à la jonction épidermo-dermique. Moins d'une souris sur quatre développe spontanément un mélanome dermique avec une latence de 15 mois. Cependant, l'exposition aux radiations UV des jeunes souris permet le développement de mélanome à l'interface épiderme/derme similaires aux mélanomes humains (70). Ce modèle a donc l'avantage d'être physiologique par rapport à son développement, mais ne présente pas une mutation majoritairement observée chez l'homme.

Il existe une multitude d'autres modèles murins, basés sur la technologie RCAS/TVA, le proto-oncogène *Ret*, la mutation du rare sous-type de mélanome *Gnaq* ou encore des inductions chimiques (58). J'ai fait le choix ici de ne détailler que les principaux modèles nécessaires à la compréhension et discussion de mes travaux de thèse. Les tumeurs spontanées peuvent être directement utilisées et analysées pour une étude précise, qui tient alors compte du développement physiologique du mélanome. Cette approche, bien que très rigoureuse, est cependant difficilement généralisable à une étude complète étant donné la difficulté d'obtenir des cohortes homogènes de taille suffisante à cause des temps de latence longs et variables d'apparition de tumeur. Nous avons fait le choix d'établir des lignées cellulaires à partir de modèles spontanés que nous avons ensuite allogreffés chez des souris C57BL6/6J. Cette approche permet la réalisation de tests fiables et répétables à partir d'un nombre significatif d'animaux.

3.6. Données de bioinformatique accessibles publiquement

Je souhaite dans cette partie résumer les données bioinformatiques actuellement disponibles pour l'étude des mélanomes métastatiques. L'objet ici n'est pas de rentrer dans le détail des résultats tirés des différents sets de données mais plutôt de présenter les différentes cohortes qui permettront d'enrichir la discussion. Aussi, de nombreuses pages internet sont développées afin de rendre accessible à tous l'utilisation des outils de bioinformatique. Je vais présenter les principales.

La grande majorité des séquençages de tumeurs a été réalisée à l'échelle de la tumeur entière, c'est-à-dire incluant le microenvironnement tumoral stromal et immun. La cohorte la plus connue est celle du Cancer Genome Atlas TCGA. Elle est établie à partir de 480 biopsies de 471 patients. 109 échantillons sont des mélanomes primaires et 371 sont métastatiques. Une information primordiale est la localisation des biopsies (Figure 18). En effet, les données transcriptomiques à l'échelle de la tumeur entière peuvent être biaisées par les données d'expression d'autres composantes du milieu. Par exemple, les métastases ganglionnaires auront un infiltrat et un profil transcriptionnel bien particulier. Dans la cohorte du TCGA, seules 29 biopsies proviennent du ganglion (6.2%). Outre les données d'expressions transcriptomiques disponibles pour 472 échantillons, des données de méthylation (473), de mutations et d'altérations du nombre de copie (368) et d'expressions protéiques RPPA (355) sont également disponibles.

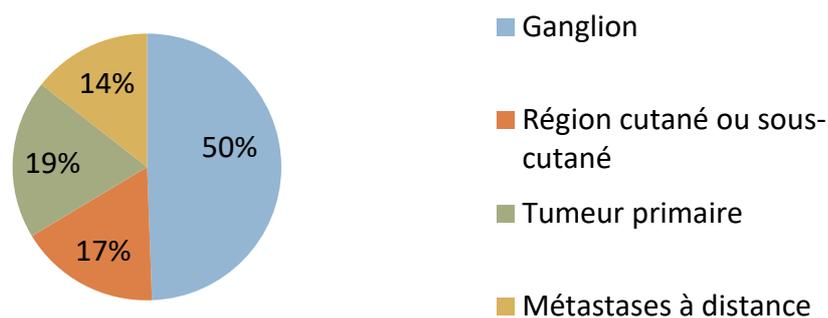


Figure 18 Répartition des sites tumoraux des mélanomes du TCGA, la figure a été réalisée à partir de [cbioPortal.org](https://cbioportal.org)

De nombreux algorithmes ont été développés afin d'estimer la part tumorale et la part non-tumorale incluant le stroma et le microenvironnement immunitaire. Classiquement, les proportions des composantes tumorales, stromales et immunitaires sont estimées grâce à

l'algorithme ESTIMATE développé au MDAnderson (71). Les composantes stromales et immunitaires des biopsies de mélanome du TCGA sont à prendre en compte dans les analyses (Figure 19).

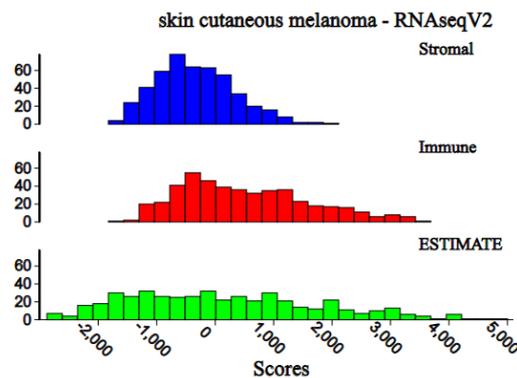


Figure 19 Estimations de la part des infiltrats stromal (en bleu) et immunitaire (en rouge) des mélanomes du TCGA par l'algorithme ESTIMATE. En vert, le score estimate déduit à partir des scores stromal et immunitaire représentant la pureté tumorale. Graphes réalisés à partir de l'outil du MDAnderson <https://bioinformatics.mdanderson.org/estimate/disease.html>

Des algorithmes de déconvolution ont été développés afin de détailler l'ensemble de l'infiltrat population par population. Dans le mélanome, une avancée majeure a été réalisée avec l'établissement de signatures robustes à l'échelle de la cellule unique par l'équipe de Garraway à partir de données établies sur 16 échantillons de patients (Itay Tirosh, 2016). Aussi, la composition des infiltrats immunitaires et du stroma des mélanomes du TCGA a pu être évaluée (Figure 20). La cohorte initiée par Tirosh et al. a été élargie avec l'ajout de 17 échantillons supplémentaires provenant de 16 nouveaux patients (72). Il est intéressant de noter que ces données sont accessibles à tous. Il est cependant important de préciser que plus d'un tiers des échantillons sont des métastases ganglionnaires et que le nombre de cellules par patient séquencé est très variable, et la répartition par type cellulaire est très hétérogène.

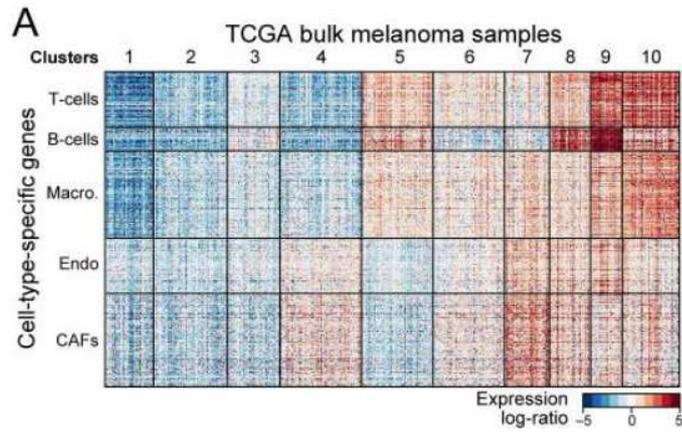


Figure 20 Heatmap représentant les expressions relatives des signatures définies par analyses à l'échelle de la cellule unique pour les type cellulaires lymphocytes T et B, macrophages, cellules endothéliales et fibroblastes associés à la tumeur (axe vertical) pour les 471 mélanomes du TCGA (axe horizontal). Chaque colonne est un patient, répartis en 10 groupes par partitionnement en K-moyenne (35)

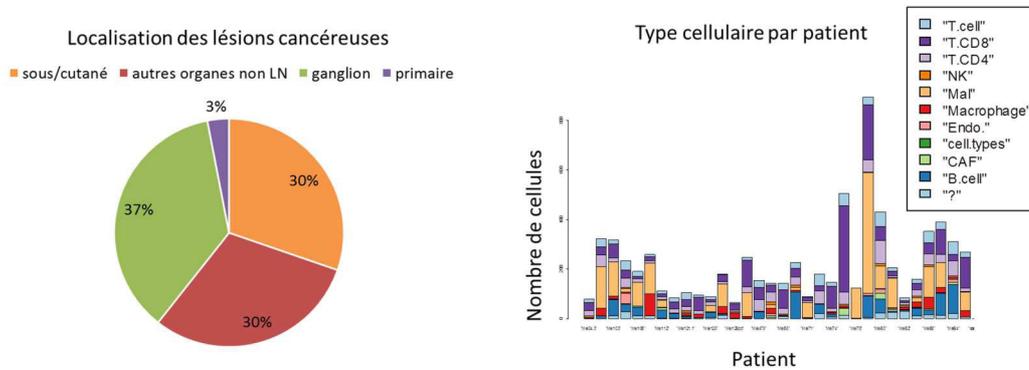


Figure 21 Description de la cohorte (72) à droite : Répartition de la localisation des échantillons séquencés. A gauche : Répartition du nombre de cellules dans chaque type cellulaire par patient.

Récemment, de nouvelles signatures établies à l'échelle de la cellule unique permettent la distinction de phénotypes de cellules hématopoïétiques et l'algorithme de déconvolution associé xCIBERSORT permet d'accéder à la composition du microenvironnement tumoral (Figure 22) (73). Initialement, l'algorithme CIBERSORT développé par Neuman et al. (74) était la référence de déconvolution pan-cancers. CIBERSORT utilise la matrice de signatures LM22 permettant de distinguer 22 phénotypes de cellules hématopoïétiques à partir de 547 gènes. Des variants de l'algorithme CIBERSORT basés à partir de profils de méthylation (MethylCIBERSORT) ou de signatures établies à l'échelle de la cellule unique (xCIBERSORT) ont été développées par la suite. L'intérêt principal des signatures établies à l'échelle de la cellule unique est leur robustesse, enlevant tout biais lié à la contamination. Afin de valider la robustesse de l'algorithme xCIBERSORT dans le mélanome, les auteurs ont comparé les compositions d'infiltrat obtenues par analyse en cellule unique ou par déconvolution des données transcriptomique depuis la tumeur

entière (Figure 22). Les résultats sont très encourageants. L'algorithme est utilisable en ligne via la plateforme <https://cibersortx.stanford.edu/>.

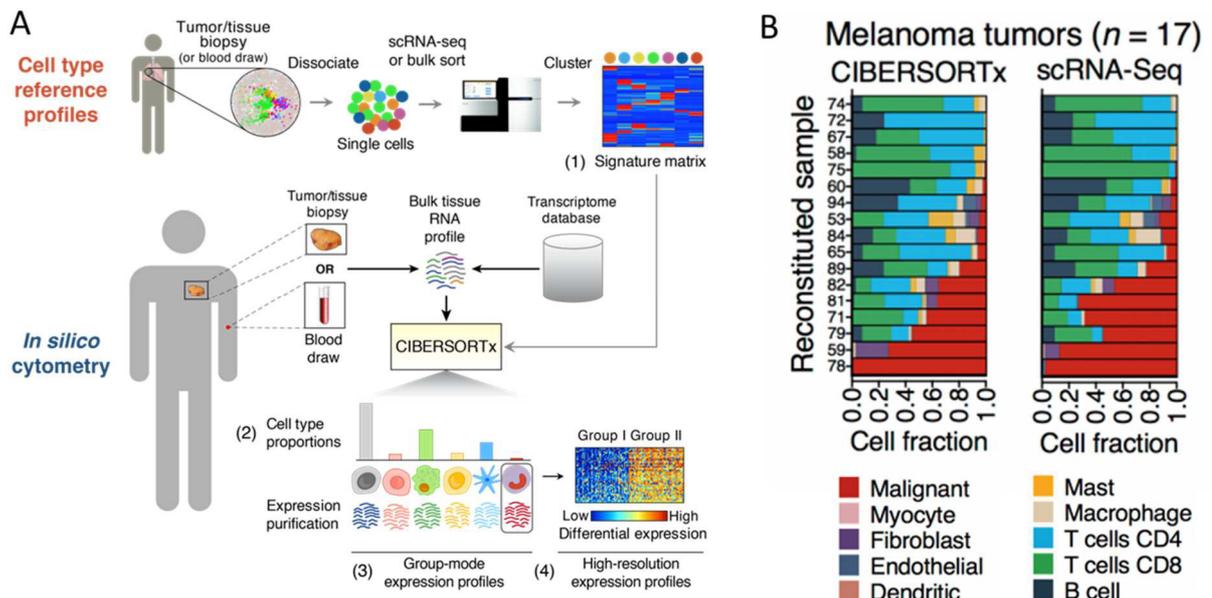


Figure 22 (A) Schéma représentant l'établissement de l'algorithme de déconvolution CIBERSORTx (B) Validation de l'algorithme de déconvolution sur 17 échantillons de mélanome par comparaison de la reconstitution des populations immunes grâce à l'algorithme cibersortx (à gauche) avec une analyse à l'échelle de la cellule unique (à droite).

Enfin, les signatures phénotypiques robustes des cellules tumorales établies à l'échelle de la cellule unique par Tsoi et al. et Rambow et al. sont d'un intérêt majeur afin de caractériser non pas l'infiltrat immunitaire mais les cellules tumorales (37; 42). Ces signatures phénotypiques peuvent en effet être étendues à d'autres analyses transcriptomiques et cohortes telles que la cohorte du TCGA. L'utilisation de signatures établies à partir d'un nombre significatif de gènes permet de gagner en puissance d'analyse sur des données de qualité parfois moindre et d'être plus robuste. En effet, il est possible que l'expression d'un gène soit faussée par la qualité du séquençage, c'est le cas des faux zéros par exemple. Dans ce cas, les corrélations gène à gène peuvent s'avérer décevantes. En se basant sur plusieurs gènes, la probabilité d'être biaisée diminue et celle de mettre en évidence des relations d'expressions augmentent. Par exemple, les états décrits par Tsoi ont été associés aux tumeurs de mélanome du TCGA. Alors qu'en analyse en composantes principales, les seules expressions de MITF, NGFR et SOX10 auraient permis l'attribution d'un état majoritaire à une tumeur, l'expression de SOX9 aurait échoué (Figure 23) (42).

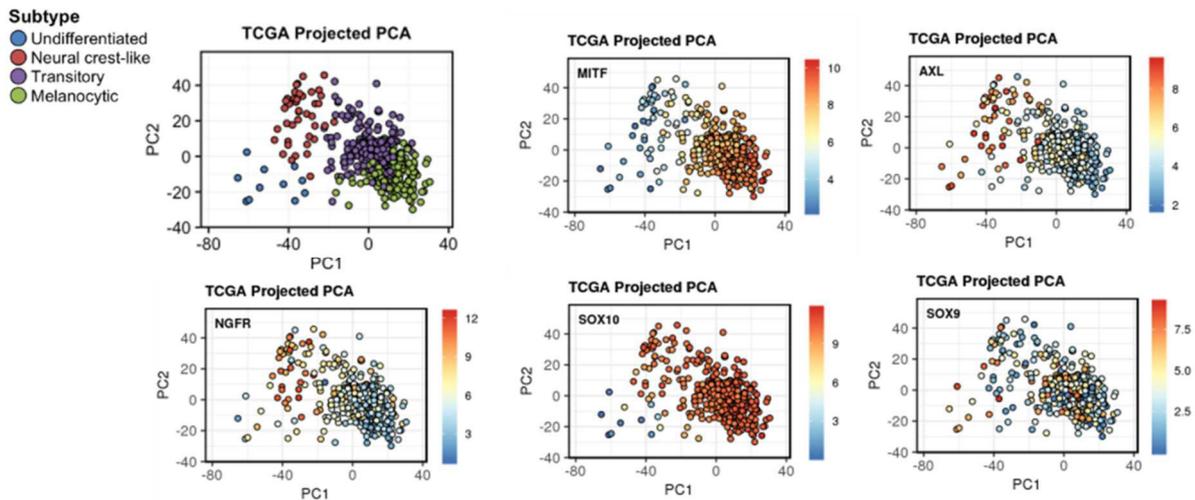


Figure 23 Analyse en composantes principales (ACP) des profils d'expressions des données en bulk du TCGA, annotées en haut à gauche par les sous-types prédictifs (dédié en bleu, crête neurale en rouge, transitoire en violet et mélanocytaire en vert). Les données d'expressions ont été traitées afin de supprimer les facteurs confondants liés au microenvironnement immunitaire et stromal. Les ACP suivantes sont colorées en fonction des niveaux d'expression respectivement de MTF et AXL en haut puis NGFR, SOX10 et SOX9 en bas Ces ACP ont été générées grâce au logiciel en ligne de création de cartographies d'ACP <https://systems.crump.ucla.edu/dediff/index.php>

CHAPITRE 2 : MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE

1. Le microenvironnement immunitaire des mélanomes : modèle d'immunoédition

Le système immunitaire joue un rôle majeur dans le contrôle de la progression tumorale dès les premières phases d'initiation tumorale jusqu'à l'émergence de clones résistants à son contrôle. Le concept d'immunoédition proposé par l'équipe de Robert Schreiber dans les années 2000 décrit les interactions entre le système immunitaire et les cellules tumorales en trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Figure 24) (75).

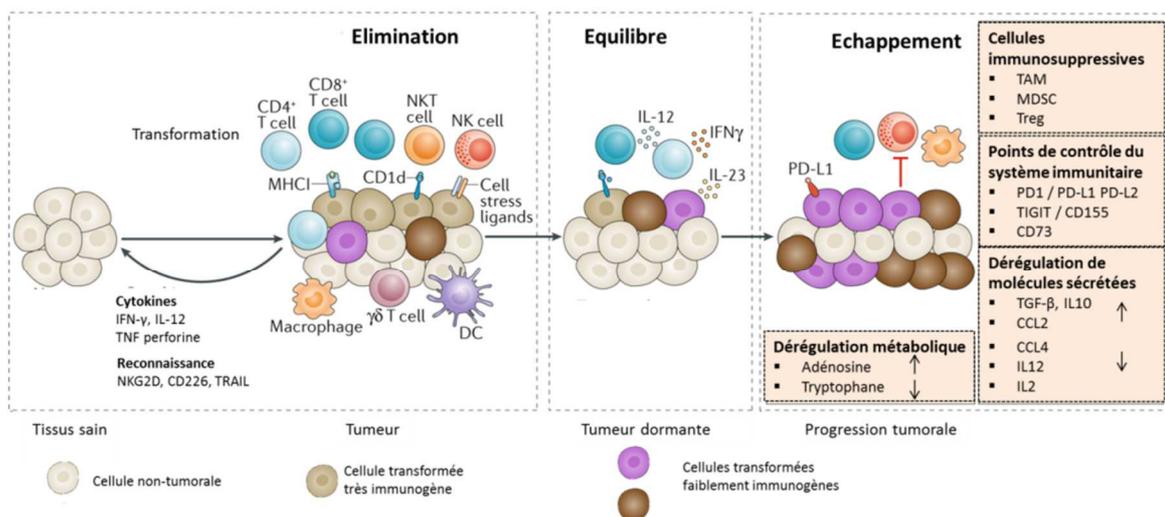


Figure 24 L'immunoédition en trois étapes : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Les cellules tumorales et leurs variants sont représentés respectivement en marron et violet. Les cellules non transformées ou stromales sont représentées en gris. Adapté à partir de (76)

Dans cette partie, j'ai choisi de dresser un tableau général du microenvironnement immunitaire au cours des différentes phases d'immunoédition dans le contexte de la peau. Dans la suite du chapitre, je me focaliserai sur les lymphocytes T cytotoxiques (partie 2), qui sont au cœur de mes travaux de thèse, ainsi que sur le rôle des cellules de mélanome dans l'échappement à la lyse des lymphocytes T cytotoxiques (partie 3).

1.1. La phase d'élimination

Dans la première phase, appelée phase d'élimination, le système immunitaire reconnaît et détruit les cellules transformées en activant des mécanismes immunitaires innés et adaptatifs. La peau représente une vaste barrière avec le monde extérieur. Il est donc crucial pour cet organe d'enclencher une réponse immune efficace et rapide face aux menaces constantes de

l'environnement extérieur telles que l'invasion par des pathogènes, une blessure ou des dommages associés à l'exposition aux radiations ultraviolettes. Tous ces processus physiologiques font intervenir le système immunitaire. De plus, il existe système de communication efficace entre le système immunitaire et la peau permettant de maintenir l'homéostasie tissulaire (77). Aussi, la peau normale a été décrite comme un organe immunocompétent peuplé d'une grande variété de cellules immunes myéloïdes et lymphoïdes (Figure 25) en communication permanente avec la circulation sanguine et les ganglions lymphatiques (78). Dans ce contexte, l'initiation tumorale peut être rapidement détectée et la croissance contrôlée par le système immunitaire de la peau.

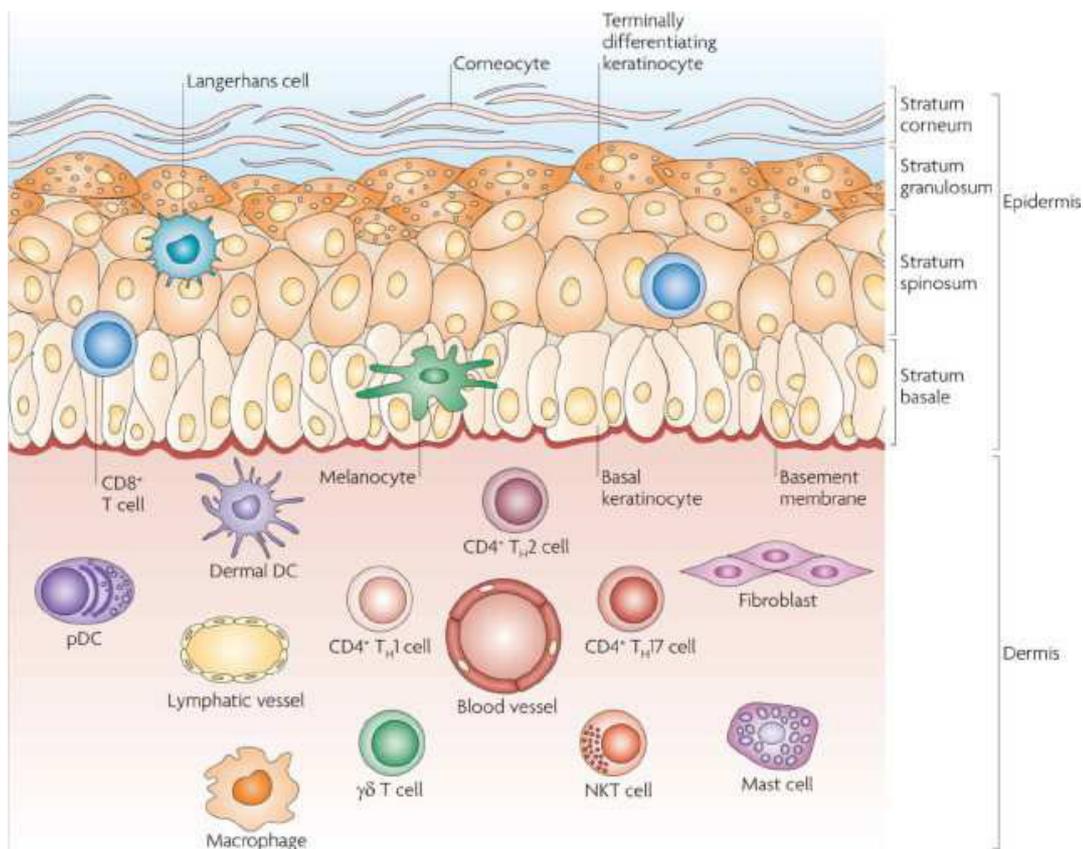


Figure 25 Anatomie et composition de la peau (79) : Dans l'épiderme, les cellules de Langerhans forment un réseau dense de cellules dendritiques. Deux principaux groupes de cellules dendritiques résident également dans le derme : les CD103+CD11b- et les CD11b+ (Heath WR, 2013). Des macrophages cutanés sont présents le derme. Ils sont aussi retrouvés autour des vaisseaux sanguins favorisant le recrutement de neutrophiles circulant dans le sang (Abtin A, 2014). Les lymphocytes résident en nombre significatif dans la peau saine. En particulier, les T CD4 peuplent le derme. A l'inverse, les T CD8 sont principalement localisés dans l'épiderme. Enfin, les T $\gamma\delta$ sont retrouvés à la fois dans le derme et l'épiderme.

Grâce à leur capacité de phagocytose, les cellules myéloïdes incluant les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes et les dérivés granulocytaires neutrophiles, apportent une première ligne de défense primordiale de l'immunité innée.

Les cellules Natural Killeur (NK) sont dérivées de cellules lymphoïdes. Elles induisent la lyse de leur cible via l'attaque de protéases appelées granzymes. Elles ciblent les cellules étrangères ne présentant pas ou peu les molécules du soi ou bien les cellules présentant les ligands activateurs de NK tels que les ligands de NKG2D ou TRAIL. Dans le mélanome, le rôle des NK intra-tumoraux est sujet de controverses. En effet, une récente analyse en cellule unique des NK circulants dans le sang et intra-tumoraux a mis en évidence chez cinq patients la rareté des NK intra-tumoraux, dont le pourcentage parmi les cellules lymphoïdes ne dépassait pas les 6.5%. A l'inverse, les NK circulant pouvaient représenter jusqu'à 46.1% des cellules lymphoïdes du sang (80). Cependant, bien que faible, l'infiltration tumorale par les NK a été associée à un meilleur pronostic pour les patients atteints de mélanome (81).

Les cellules de Langerhans forment un réseau de cellules dendritiques représentant environ 2 % des cellules de l'épiderme. Sentinelles immunitaires en charge de la détection de structures étrangères, les cellules dendritiques comprenant les cellules de Langerhans de l'épiderme et les cellules dendritiques CD103+ du derme sont capables d'initier une réponse immunitaire adaptative en activant les lymphocytes T des ganglions lymphatiques. Nous détaillerons le rôle clé des cellules dendritiques dans l'activation de lymphocytes T plus loin (Partie 2.2).

De plus, les cellules dendritiques produisent de l'interleukine 12 et de l'interféron, permettant l'activation des macrophages, NK et autres leucocytes. La reconnaissance de motifs moléculaires associés à des dommages (DAMP) conduit également à la sécrétion de l'interleukine pro-inflammatoire 1, aux effets antinéoplasiques (82).

Avec une estimation de 1 million de lymphocytes T/cm², les lymphocytes T résident en nombre significatif dans la peau saine (83). En particulier, les T CD4 peuplent le derme et les T CD8 sont principalement localisés dans l'épiderme. La majorité des T- $\alpha\beta$ résidents dans la peau sont des lymphocytes T mémoires (T_{RM}). Les T_{RM} expriment la lectine de type C CD67 et un récepteur à la E-cadhérine CD103 T_{RM}. De plus, les T_{RM} de la peau montrent une forte activité d'acquisition et de métabolisme des acides gras extracellulaires libres (FFA) suggérant une bonne capacité d'adaptation au microenvironnement local de la peau (84). Les T_{RM} sont capables de survivre longtemps après une réaction immune afin de protéger l'hôte d'une nouvelle exposition au pathogène. Ils ne seraient donc pas impliqués au cours de l'évolution tumorale. Parmi les T CD4, les T régulateurs (Treg) pourraient cependant jouer un rôle majeur au cours des étapes précoces

de tumorigenèse. Dans une peau adulte humaine saine, environ 20% des T CD4 résidents sont des Treg. Chez la souris la proportion de Treg parmi les T CD4 résidents varie de 20 à 60% (77). Il apparait que les Treg auraient des fonctions spécifiques au tissu où ils se trouvent. Dans les follicules pileux par exemple, les Treg ont été identifiés pour jouer un rôle clé dans l'homéostasie des cellules souches épithéliales (77). Cependant, plus généralement, les Treg sont connus pour leur rôle immunosuppresseur empêchant une réaction auto-immune contre les cellules du soi, ou un emballement d'une réaction immunitaire. Dans ce contexte, les Treg pourraient permettre le développement tumoral. Enfin, comme nous le verrons dans la partie suivante, les lymphocytes T spécifiques ayant une activité anti-tumorale ne résident pas dans la peau mais proviennent du ganglion lymphatique après activation par les cellules dendritiques.

Enfin, moins spécifiques que les lymphocytes T- $\alpha\beta$ CD4 ou CD8, les T- $\gamma\delta$ sont retrouvés à la fois dans le derme et l'épiderme. Peu d'études s'intéressent au rôle des T- $\gamma\delta$ dans la tumorigenèse. Cependant, les T- $\gamma\delta$ semblent jouer un rôle non négligeable dans la réponse anti-tumorale. Ils ont la double capacité de tuer les cellules tumorales par la voie des perforines/granzymes et de phagocyter. De plus, contrairement aux T- $\alpha\beta$, leur activation n'est pas restreinte à la reconnaissance d'un complexe CMH/peptide ce qui élargi leur domaine d'action (85). Une analyse de près de 18 000 transcriptomes de 39 types tumoraux incluant les mélanomes primaires et métastatiques a associé une signature T- $\gamma\delta$ à un pronostic favorable tout cancer confondu (86). Bien que peu ou faiblement retrouvés dans la peau humaine, les lymphocytes T dermiques au TCR- $\gamma\delta$ (DETC) sont très abondants dans la peau des souris (87). Les DETC contrôlent les cellules épidermiques et sont prêts à reconnaître et répondre contre des antigènes du soi altérés exprimés par les kératinocytes voisins exposés à un dommage. Dès la reconnaissance d'un signal de danger, les DETC sécrètent un ensemble de chémokines et molécules cytotoxiques, facteurs de croissances et cytokines aboutissant à l'inflammation cutanée et la destruction des cellules transformées ou en cours de transformation (88).

1.2. La phase d'équilibre

Certaines cellules tumorales parviennent à survivre à l'action du système immunitaire et rentrent alors en phase d'équilibre. Lors de la phase d'équilibre, la prolifération des cellules tumorales est encore maîtrisée sans éradication complète de la tumeur. La phase d'équilibre favorise la sélection de variants tumoraux à immunogénicité réduite qui échappent à la détection

du système immunitaire. Le système immunitaire présent exerce une pression suffisante sur la tumeur pour la contenir, parfois pendant plusieurs années. Dès que le système immunitaire faillit, la phase d'équilibre passe rapidement en phase d'échappement (89).

La phase d'équilibre est difficilement modélisable dans les modèles murins pour l'étude des mécanismes moléculaires. Son occurrence a principalement été décrite par des observations chez l'homme. Le développement de cancers au sein d'organes transplantés est une preuve clinique de l'existence de la phase d'équilibre. Une étude de cas a rapporté le développement de mélanomes, en moins de deux ans, chez deux patients ayant reçu un rein d'une même donneuse. Cette même donneuse avait été traitée avec succès d'un mélanome métastatique 16 ans avant sa mort. Des cellules de mélanomes étaient vraisemblablement présentes dans les reins de la donneuse dans une phase d'équilibre avec le système immunitaire. A cause de l'immunosuppression nécessaire à la réussite de la transplantation, les cellules de mélanomes sont sorties de l'équilibre avec le système immunitaire pouvant se diviser rapidement et disséminer dans l'ensemble du corps des patients receveurs (90).

1.3. La phase d'échappement

L'échappement au contrôle du système immunitaire résulte de divers mécanismes pouvant être mis en place par les cellules tumorales elles-mêmes. En dérégulant la présentation antigénique, les cellules tumorales empêchent la reconnaissance par le système immunitaire. De plus, par la mise en place de mécanismes d'exhaustion, les cellules tumorales sont capables d'inhiber l'activité des cellules cytotoxiques. Enfin, par le biais de facteurs sécrétés, les cellules tumorales peuvent aussi moduler le microenvironnement immunitaire en faveur d'un microenvironnement immunosuppresseur, favorable à sa croissance. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée de près à l'ensemble de ces mécanismes et au rôle de la plasticité phénotypique des cellules de mélanome dans l'échappement au système immunitaire. Aussi, je consacrerai une partie de ce chapitre au détail de l'ensemble de ces mécanismes (partie 3).

Avant de m'arrêter sur les mécanismes d'échappement, je souhaite détailler la réponse lymphocytaire mise en place lors de l'initiation tumorale, permettant le contrôle de la tumeur dans les deux premières phases d'immunoédition.

2. Les lymphocytes T : acteurs majeurs de la réponse anti-tumorale

2.1. Genèse des lymphocytes T

Les lymphocytes proviennent de la différenciation d'un progéniteur lymphoïde résident dans la moelle osseuse. Ce progéniteur est commun aux cellules lymphoïdes pouvant donner des lymphocytes T, des lymphocytes B ou encore des cellules NK. Le progéniteur lymphoïde entre dans la circulation sanguine et rejoint le thymus où il se différenciera progressivement en thymocytes sous l'influence de la signalisation Notch puis en lymphocyte T (91). Les thymocytes sont initialement double négatif CD4-/CD8- et n'expriment encore ni CD3 ni TCR. La différenciation approfondie des thymocytes se déroule en plusieurs étapes durant près d'une semaine qui permettront notamment l'expression progressive des clusters de différenciation CD3, CD4 et CD8 et le réarrangement des gènes codant le récepteur T nommé TCR. Les TCR sont des récepteurs membranaires propres aux lymphocytes T, permettant la reconnaissance des fragments peptidiques antigéniques présentés par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Le TCR est toujours associé au cluster de différenciation CD3 qui permet la transmission de signaux d'activation intracellulaire via des motifs ITAM.

La mise en place du TCR implique des réarrangements somatiques au sein des gènes codant pour les chaînes composant le TCR α, β ou γ, δ . Ces réarrangements, dits VDJ, permettent de rapprocher un gène variable V d'un gène de juxtaposition J, éventuellement d'un gène de diversité D puis d'un gène constant C. En configuration germinale, ces gènes sont éloignés les uns des autres empêchant leur fonctionnalité. Un réarrangement somatique ordonné permet d'aboutir à un TCR fonctionnel. Le choix de chaque gène V, J, D et C relève du hasard, permettant de générer une variété de TCR importante (92).

Dans le thymus, 20 pourcent des thymocytes réarrangent les gènes γ et δ formant les lymphocytes T- $\gamma\delta$. Une fois formés, les T- $\gamma\delta$ migrent en périphérie et se logent principalement dans l'épiderme. 20 pourcent réarrangent les gènes α et β formant des TCR de très faible diversité associés au CD3 sans exprimer de cluster de différenciation CD4 ou CD8. Ces cellules expriment également le récepteur NK1.1 retrouvé sur les cellules NK et font ainsi partie de la vaste famille des cellules NKT invariantes (iNKT). Enfin, les 60 pourcent restant réarrangent les gènes α et β pour former un TCR associé au CD3 et aux deux clusters de différenciation CD4 et CD8.

Le choix du cluster de différenciation CD4 ou CD8 est défini par l'étape de sélection positive qui a lieu dans le cortex du thymus. Cette sélection permet de ne conserver que les TCR utiles, capables de reconnaître des complexes CMH/peptide. Le CD4 est conservé par les lymphocytes T possédant un TCR affiné avec le CMH-II alors que le CD8 est retrouvé associé aux TCR reconnaissant le CMH-I. Enfin, certains thymocytes ne sont pas sélectionnés sur leur expression du CMH mais par l'analogue CD1d reconnaissant les antigènes glycolipidiques et se différencient alors en NK1.1 pouvant exprimer le cluster de différenciation CD4⁺ (93). Les thymocytes qui échouent à reconnaître un complexe CMH/peptide meurent par apoptose (89).

Afin d'assurer la tolérance des lymphocytes T face aux peptides du soi, les lymphocytes T simples positifs subissent une deuxième vague de sélection, dite négative. Une série de sélection s'enchaînent alors le long du thymus, depuis la partie cortex jusqu'à la médulla. Tout d'abord dans le cortex, les thymocytes CD4⁺ CD8⁺ doubles positifs réagissant trop fortement avec un complexe CMH-peptides du soi présenté par les cellules dendritiques sont à leur tour éliminés par apoptose. Ce phénomène a été mis en évidence chez des souris exprimant un récepteur T transgénique spécifique d'un peptide de l'ovalbumine présenté dans le contexte des molécules de classe II du CMH. L'injection d'ovalbumine aux souris induit la mort des thymocytes par apoptose dans le thymus. En revanche, suite à l'injection d'ovalbumine, les lymphocytes T en périphérie s'activent et prolifèrent (94).

Les thymocytes doubles positifs ayant passé cette première sélection négative continuent leur programme de maturation vers un état simple positif (orienté par la sélection positive, confère partie 2.1.B) et acquièrent le récepteur CCR7, permettant leur migration du cortex vers la médulla suivant un gradient d'expression des ligands CCL19 et CCL21. Les cellules épithéliales composant le thymus médullaire (mTEC) se différencient au contact des thymocytes simples positifs provenant du cortex. Une fois matures, les mTEC ont la capacité de présenter un large panel d'antigènes restreints aux tissus (TRA), permettant de présenter la quasi-totalité des antigènes du soi exprimés en périphérie. Le programme d'expression de ces antigènes TRA est au moins en partie sous le contrôle du régulateur transcriptionnel de l'autoimmunité AIRE.

Dans ce contexte, les thymocytes simples positifs subissent une deuxième sélection négative. Les thymocytes réagissant trop fortement avec un antigène du soi présenté par les mTEC meurent par apoptose. Dans le cortex comme dans la médulla, l'élimination des thymocytes auto-réactifs est médiée par la protéine pro-apoptotique BIM. Il est intéressant de souligner le rôle clé des

facteurs solubles présents dans le thymus dans la réalisation de la sélection négative. Encore faiblement documenté, le TGF- β a récemment été mis en évidence pour son rôle dans l'apoptose induite par BIM. En effet, il a été démontré dans un modèle murin CD4-cre;tgfbr2fl/fl, que les thymocytes auto-réactifs n'exprimant pas le récepteur au TGF- β échappent à la sélection négative dans le thymus (95).

Finalement, les lymphocytes T matures ayant passé les étapes de sélection positive et négative rejoignent ensuite les tissus lymphoïdes périphériques, en attendant d'être activés par les cellules dendritiques présentatrice d'antigène.

Les multiples étapes de sélections, nécessaire pour contrer l'auto-immunité, constituent une étape clé du façonnage du répertoire TCR. Grâce à la multitude de complexes CMH-peptides du soi présents dans le thymus, le répertoire T est purgé et les cellules ayant une trop forte affinité avec les molécules du soi sont éliminées. Ce façonnage du répertoire T peut avoir un impact majeur sur le développement tumoral, si les clones T reconnaissant des antigènes tumoraux n'étant pas des néoantigènes sont éliminés. Récemment, une étude analysant la diversité du répertoire TCR chez 44 patients atteints de mélanome a mis en évidence qu'une forte diversité TCR dans le sang est associée à une meilleure survie sans progression. Les TCR ont été analysés par PCR semi-quantitative N-Plex et la diversité a été calculée en prenant en compte à la fois la richesse (c'est-à-dire le nombre de clones différents) et leur occurrence (abondance relative de chaque clone) (96).

2.2. Mise en place de la réponse T

Les cellules de l'immunité innée reconnaissent les pathogènes grâce à des récepteurs de reconnaissances de motifs pathogènes ou de dommage, appelés PRR et TLR (97). Dans le contexte cutané, les kératinocytes activés sont également capables de détecter les signaux de danger. La signalisation en aval permettra l'expression de molécules de costimulation et la sécrétion de cytokines nécessaires à la mise en place d'une réponse adaptative spécifique. Dans le contexte tumoral, la mise en évidence de l'existence d'une réponse adaptative anti-tumorale a soulevé la question de la nature du signal de danger à l'origine de la mise en place de la réponse immune. Cette question est difficilement adressable chez l'homme ou dans les modèles animaux étant donné que les premiers signaux de danger doivent apparaître avant même tout signe clinique de l'existence d'une tumeur. L'équipe de Thomas Gajewski a mis en évidence le rôle majeur de la voie du stimulateur des gènes de l'IFN STING. La voie STING est une voie de détection innée

permettant de détecter l'ADN tumoral présent dans le cytosol des cellules dendritiques infiltrant la tumeur. En induisant la production d'IFN de type I, la voie STING favorise la mise en place d'une réponse immune adaptative anti-tumorale (98). L'IFN de type I alors produit permet l'activation des cellules dendritiques BATF3+ capables d'aller activer les lymphocytes T dans le ganglion drainant (confère parties 2.2.c et d). De plus, la signalisation en aval de l'IFN de type I permet la production de chémokines telles que CXCL10 capables d'attirer les lymphocytes T CD8 au cœur de la tumeur (confère partie suivante 2.2.d) (Figure 26).

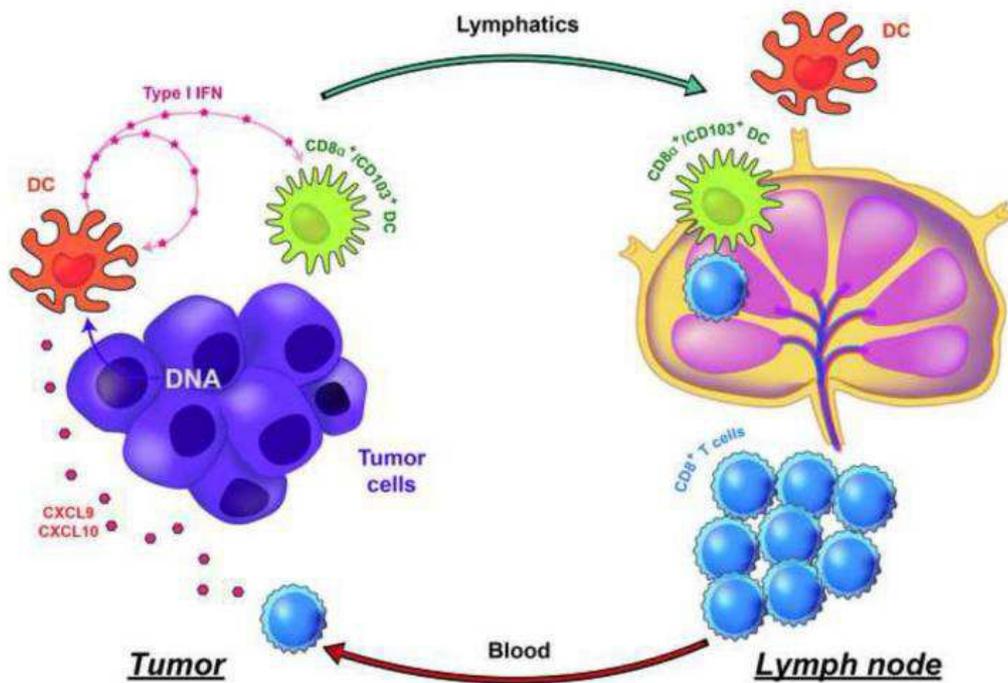


Figure 26 Modèle d'étude de la détection innée de signaux tumoraux aboutissant à la mise en place d'une réponse T anti-tumorale. L'ADN tumoral généré au court d'un stress cellulaire tumoral ou bien la mort de cellule tumorale peut être retrouvé dans le cytosol des cellules dendritiques. Il induit alors la voie STING et la production d'IFN- β , l'activation des cellules dendritiques BATF3+ (ou CD8 α + / CD103+) et la production de CXCL9 et CXCL10 contribuant au recrutement de T CD8 effecteur au cœur de la tumeur (99).

A. DEFINITIONS GENERALES DES FACTEURS SECRETES

Via la production de signaux solubles comprenant les signaux cytokiniques, une première vague de cellules immunes peut être recrutée au cœur de la zone tumorale. On appelle de manière générale cytokine toute protéine sécrétée affectant le comportement de cellules environnantes exprimant le récepteur approprié (89). Les chémokines représentent une vaste famille de cytokines impliquées dans le déplacement des différentes populations immunes en interagissant avec des récepteurs couplés à des protéines G. Des chémokines ont également été rapportées pour affecter les cellules stromales et tumorales favorisant la prolifération, l'invasion

et le développement de métastases. Une première classification divise les chémokines en quatre sous-groupes fonction de la localisation des deux premières cystéines C de leur séquence protéique. Ainsi, on retrouve les chémokines CC-, CXC-, C- et CX3C. Il existe une forte redondance entre les chémokines et leur(s) récepteur(s), impliquant que différentes chémokines peuvent lier un même récepteur et vice versa. Je présenterai ici les principales chémokines impliquées dans la mise en place de la réponse anti-tumorale dans le contexte cutané.

B. RECRUTEMENT PRECOCE DE NEUTROPHILES, MONOCYTES ET DC

En sécrétant des cytokines proinflammatoires et des chémokines telles que CXCL8, CXCL1, CCL2, CCL3 et CCL5, les kératinocytes activés et macrophages permettent le recrutement de monocytes et neutrophiles exprimant CXCR2 et CCR2 (Figure 27) (79). Dans le mélanome, le rôle majeur de la chémokine CCL4 sur le recrutement des cellules dendritiques BATF3+ a été démontré (100). Dans cette étude, la production de CCL4 a été associée aux cellules de mélanome ayant une faible activation de la voie β -caténine. Les DC immatures exprimant CCR6 peuvent aussi être recrutées sur le site tumoral par l'intermédiaire de CCL20 (Figure 27). Il a été montré chez la souris que la surexpression des chémokines CCL20 et CXCL14 non seulement attirait les DC immatures mais permettait également leur maturation favorisant l'inhibition de la croissance tumorale (101).

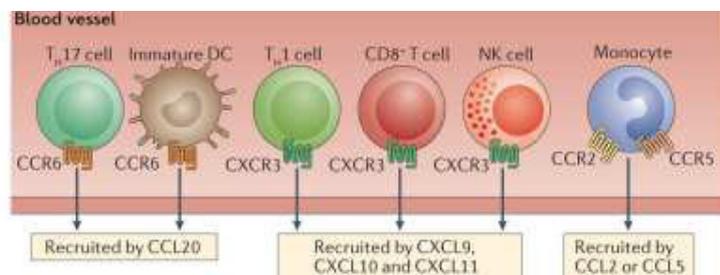


Figure 27 Mise en place de la réponse immunitaire anti-tumorale par un réseau de chémokines (102)

Les cellules dendritiques ont un rôle primordial dans la mise en place de la réponse T. Après avoir phagocyté une cellule cancéreuse, les DC dégradent les antigènes en peptides qu'elles chargent sur leurs molécules de classe I et II du CMH. Cette capacité de charger des peptides exogènes sur les deux classes de molécules du CMH est propre aux cellules dendritiques et est nécessaire à la bonne activation des lymphocytes T naïfs, on parle de présentation antigénique croisée. Une fois matures, les DCs expriment les récepteurs de chémokines CCR7 et CXCR4 qui leur permettent de migrer vers le ganglion lymphatique le plus proche afin de présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes naïfs présents dans le ganglion (103). On parle de priming (Figure 28).

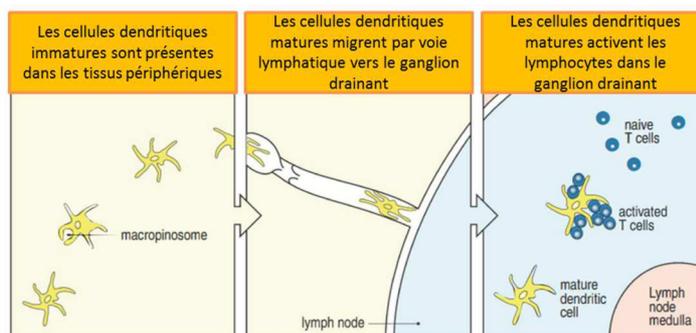


Figure 28 Initiation d'une réponse adaptative par les cellules dendritiques. Adapté à partir de (89)

Dans les tissus, on distingue deux principaux sous-groupes de DCs conventionnels aux fonctions distinctes: les cDC1 et cDC2 (Figure 29). Les cDC1 sont Langerin+CD103+CD11b- ou CD8α+ DCs chez la souris et les cDC2 sont Langerin-CD11b+Sirpα+. Les Langerin+CD103+ cDC1 ont une importance toute particulière puisqu'elles sont capables de présentation antigénique croisée dans le ganglion (104). La capacité de cross-présentation d'antigène par les DC XCR1+ a été démontrée plus tardivement. De manière intéressante, les populations de DC XCR1+/CD103+ et XCR1-/CD103- sont toutes deux capables de migrer et de présenter les antigènes de mélanome aux cellules T du ganglion (105). Chez la souris, l'importance du lignage CD8α+ DC a été étudiée par délétion du facteur de transcription *Batf3* (pour basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3). Le développement des CD8α+ DCs est fortement impacté par la délétion de *Batf3* et les cellules dendritiques restantes ne sont pas capables de réaliser la présentation antigénique croisée dans le ganglion (106), anéantissant l'activation des T CD8 et le rejet de tumeurs immunogéniques dans les souris *Batf3*- (107).

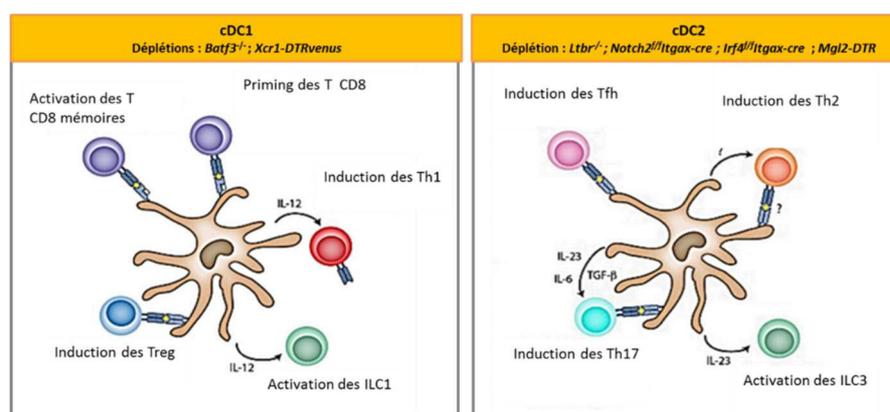


Figure 29 Fonctions des cellules dendritiques conventionnelles cDC1 à gauche et cDC2 à droite. Adapté de (108)

C. PRIMING

Le priming des lymphocytes T naïfs dans le ganglion nécessite trois signaux : un premier signal permettant l'activation du lymphocyte, un deuxième signal nécessaire à la survie du lymphocyte et enfin le troisième signal orientant la différenciation (Figure 30).

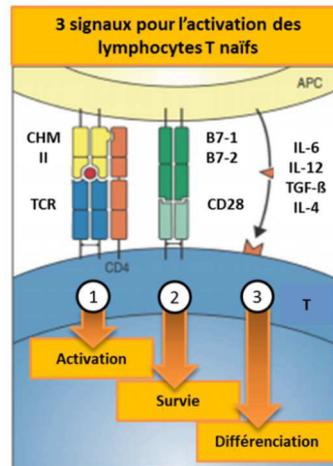


Figure 30 Signaux d'activation ou de « priming » des lymphocytes T naïfs. Schéma représentant les trois signaux nécessaires à l'activation, la survie et différenciation des lymphocytes T adapté de (89).

C.1. SIGNAL 1 : COUPLE CMH / PEPTIDE

Le premier signal permettant l'activation des lymphocytes T est la liaison de son TCR avec le complexe CMH/peptide présenté par la cellule dendritique. Les T CD8 se lient au complexe CMH-I/peptides alors que les T CD4 reconnaissent les peptides présentés par le CMH de type II.

C.2. SIGNAL 2 : MOLECULES DE CO-STIMULATION

Le deuxième signal permet la survie et l'expansion du clone T activé. Les molécules B7 sont les molécules de co-stimulation les mieux caractérisées. Le récepteur des molécules B7 à la surface des T naïfs est CD28. Ce deuxième signal peut être modulé par des voies de co-stimulation additionnelles telles que le co-stimulateur inductible ICOS ou CTLA-4.

C.3. SIGNAL 3 : FACTEURS SOLUBLES ORIENTANT LA DIFFERENCIATION

Le troisième et dernier signal passe par la sécrétion de cytokines telles que l'interleukine 2 qui soutiennent la prolifération et orientent la différenciation (89). Une fois activés, ils se différencient en lymphocytes fonctionnels appelés lymphocytes effecteurs. Parmi les lymphocytes T effecteurs, on retrouve les T CD8 cytotoxiques, les T CD4 dits helper et les T régulateurs. Les T cytotoxiques ont la capacité d'éliminer les cellules cibles. Les T helper (TH) soutiennent et orientent la réaction immunitaire en fournissant des signaux additionnels. Enfin,

les T régulateurs (Treg) contrôlent négativement la réponse immune en supprimant l'activité des autres lymphocytes (89).

L'activation des lymphocytes T CD8 nécessite souvent de forts niveaux d'expression de molécules de co-stimulation et d'IL-12. Dans un premier temps les DC n'expriment que les niveaux d'expression des molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des T CD4. En produisant de l'IFN- γ et via la stimulation de CD40, les T CD4 stimulent à nouveau les DC qui expriment alors des niveaux plus importants de molécules de co-stimulation et produisent de plus fortes quantités d'IL-12 permettant à l'activation des T CD8. L'interaction entre une cellule dendritiques et un lymphocyte T CD4 et CD8 est alors connue sous le nom de ménage à trois (109).

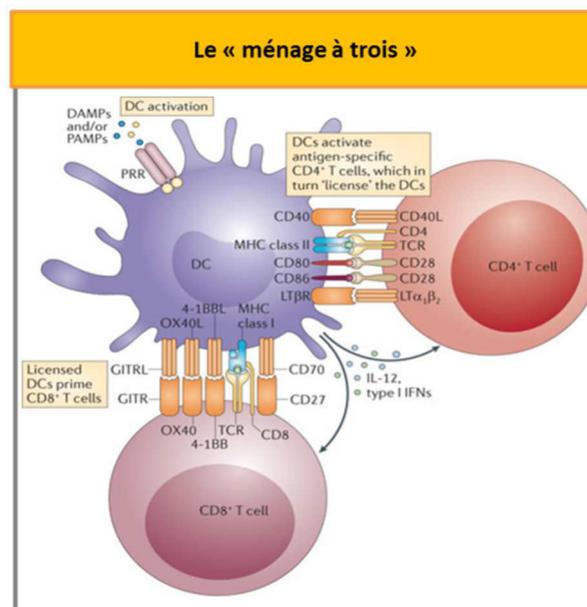


Figure 31 Présentation du « ménage à trois ». Les DC expriment les molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des T CD4. En produisant de l'IFN- γ et via la stimulation de CD40, les T CD4 stimulent à nouveau les DC qui expriment alors des niveaux plus importants de molécules de co-stimulation et produisent de plus fortes quantités d'IL-12. Ces niveaux d'expression sont souvent nécessaires à l'activation des T CD8. (109)

La réponse immunitaire adaptative qui suit l'activation des rares lymphocytes T naïfs spécifiques dépend de leur expansion et de leur différenciation qui sont soutenues par les signaux de co-stimulation 2 (B7/CD28) et 3. Après 4 à 5 jours d'intense prolifération, ces lymphocytes T se différencient en cellules T effectrices capables de synthétiser toutes les protéines nécessaires à leur fonction de cellule T cytotoxique ou auxiliaire. Les cellules effectrices subissent des changements qui les distinguent des cellules naïves. On notera entre autre l'expression différentielle de certaines molécules d'adhérence. Les cellules effectrices n'expriment plus la L-sélectine qui permet le maintien des lymphocytes à l'intérieur du ganglion. En revanche, ils

expriment VLA-4 qui favorise la fixation des cellules activées au niveau de l'endothélium vasculaire des sites d'inflammation. Aussi, les lymphocytes activés sont capables de quitter le ganglion en direction de la zone d'inflammation.

A leur tour, les lymphocytes activés dans le ganglion migrent sur le site d'inflammation. Environ un tiers des mélanomes sont dits « chauds » ou inflammés. Dans le contexte cutané, cette inflammation peut provenir des multiples dommages causés par l'exposition aux radiations UV par exemple, ou bien encore à la détection d'un signal de danger et l'activation de la voie STING (confère partie 2.2.A). Une étude transcriptomique à partir de 44 biopsies de mélanome associe l'infiltration lymphocytaire dans les mélanomes métastatiques à six principales chémokines : CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 et CXCL10 (110).

D. ROLE DE LA SIGNALISATION CXCR3

La signalisation impliquant CXCR3 est sûrement la voie de signalisation la moins controversée pour son rôle dans le recrutement des lymphocytes T cytotoxiques qui expriment le récepteur CXCR3 (CD183) (Figure 27). CXCR3 est un récepteur à protéines G composé de sept domaines transmembranaires dont deux domaines intracellulaires distincts d'activation. Il est sous le contrôle direct du facteur de transcription clé de la différenciation TH1 et CD8 cytotoxique T-bet (111). CXCR3 est majoritairement induit par l'IFN- γ (112) et signale en aval de la liaison à un de ses trois ligands CXCL9, CXCL10 et CXCL11. CXCL9, CXCL10 et CXCL11 sont localisées sur le chromosome 4. CXCL9 est aussi connue sous le nom de monokine induite par IFN- γ (MIG). CXCL9 est induite par l'IFN- γ mais pas par l'IFN- α/β . CXCL10 ou protéine induite par l'IFN- γ (IP-10) est induite sous plusieurs signaux incluant l'IFN- γ , l'IFN- α/β et de plus faibles niveaux d'expression de CXCL10 peuvent être induits par le TNF- α . Enfin, CXCL11, le chémoattractant alpha des cellules T inductible à l'interféron (I-TAC ou IP-9) est principalement induit par l'IFN- γ et l'IFN- β mais faiblement par l'IFN- α . Le domaine de liaison de CXCL11 sur CXCR3 diffère de celui de CXCL9 et CXCL10. CXCL11 a la plus grande affinité avec le récepteur CXCR3, s'ensuit CXCL10 puis CXCL9. Le rôle majeur de CXCL10 sur le recrutement des lymphocytes infiltrant les mélanomes a été démontré par l'équipe de Gajewski (113) puis confirmé par un modèle murin déficient pour CXCR3. L'injection syngénique de la lignée de mélanome murine B16 dans des souris CXCR3-/- révèle un infiltrat lymphocytaire réduit, une croissance tumorale accélérée et une survie réduite (114). Dans le modèle dépendant de la β -caténine de Gajewski, CXCL10 serait majoritairement produit par les cellules dendritiques présentatrices d'antigène BATF3 (100). Une étude sur

tumeurs solides a montré le rôle de la coopération des chémokines CCL5 et CXCL9 sur le recrutement des lymphocytes T CD8. CCL5 est directement produite par les cellules tumorales et permet l'attraction de lymphocytes T CCR5+. De manière intéressante, il est également connu que CCL5 induit le recrutement de macrophages. CXCL9 est quant à elle sécrétée par les macrophages CD68+ et cellules dendritiques CD11c+ et vient en soutien pour le recrutement de lymphocytes T cytotoxiques (115).

Une fois activés, les lymphocytes T cytotoxiques rejoignent le microenvironnement tumoral afin de tuer les cellules tumorales. Les T cytotoxiques reconnaissent leur cible de manière spécifique grâce à la présentation de peptides antigéniques sur le CMH-I. ce qui conduit au relargage de granules cytotoxiques. Les granules cytolytiques sont des lysosomes contenant les protéines cytotoxiques perforine et des granzymes. La perforine permet aux granules cytotoxiques de pénétrer la membrane plasmique de la cellule cible en faisant des pores dans la membrane plasmique. Les granzymes sont des sérines protéases. On en dénombre cinq chez l'homme et dix chez la souris. Les granzymes induisent l'apoptose de la cellule cible en activant les caspases. La granzyme B clive et active la caspase 3. Une autre cible de la granzyme B est la protéine régulatrice de l'apoptose dite « à BH3 seulement » BID. Le clivage de BID induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et le relargage de molécules proapoptotiques comme le cytochrome c (Figure 32). La perforine et les granzymes sont tous les deux indispensables pour induire la mort de la cellule cible.



Figure 32 Induction de l'apoptose dans la cellule cible par la voie des perforine/granzymes, adapté de (89)

Un autre moyen d'induire l'apoptose indépendamment de la voie des granzymes passe par l'expression de Fas et de son ligand FAS-L. Ce mécanisme permet principalement la régulation du nombre de lymphocytes. Un lymphocyte activé peut donc induire la mort d'autres lymphocytes par la signalisation Fas/Fas-L qui induit l'activation des caspases. Les T CD4 helper TH1 et TH2 ont aussi été reportés capable d'induire la mort par la signalisation Fas/Fas-L. Le syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité est observé chez l'homme comme chez la souris en cas de

mutation de Fas ou de son ligand, démontrant le rôle de cette voie de signalisation dans le maintien de l'homéostasie lymphocytaire (116).

Les lymphocytes cytotoxiques sont aussi de bons sécréteurs des cytokines inflammatoires IFN- γ et le TNF- α . L'IFN- γ induit l'expression du CMH-I par les cellules transformées ainsi que d'autres protéines impliquées dans le chargement des peptides antigéniques. L'IFN- γ et le TNF- α activent les macrophages et les recrutent sur le site de l'inflammation en tant qu'effecteurs et cellules présentatrices d'antigènes, favorisant la réponse anti-tumorale. Cependant, l'exposition continue à l'IFN- γ favorise l'état d'exhaustion des lymphocytes T CD8 et la progression tumorale en induisant l'expression de ligands de point de contrôle immunitaire comme PD-L1 ou l'enzyme IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase) par les cellules tumorales. L'expression de plusieurs points de contrôle immunitaire est une caractéristique de l'état d'exhaustion des lymphocytes T. L'exhaustion est définie par des fonctions effectrices affaiblies voire la perte des fonctions cytotoxiques pour les T CD8, l'expression prolongée de récepteurs inhibiteur et un état transcriptionnel général distinct.

2.3. Régulation de l'activité des T Cytotoxiques : Les points de contrôle du système immunitaire

Les récepteurs des points de contrôle du système immunitaire (PCSI ou IPC en anglais) tels que PD1, TIGIT, CTLA4, TIM3 et LAG3, sont exprimés de manière physiologique par les cellules immunitaires dans un contexte inflammatoire, en cas d'infection ou encore de tolérance face à un antigène du soi. Ils inhibent l'activité des T effecteurs mais aussi des T- $\gamma\delta$ en balance avec les signaux d'activation comprenant GITR, CD28, CD27, ICOS, 4-1BB et OX40 (Figure 33) (117; 118). Des modèles murins d'inhibition individuelle ou combinée de ces points de contrôle du système immunitaire et/ou de leurs ligands montrent une amélioration de la réponse immune anti-tumorale.

Les récepteurs inhibiteurs des points de contrôle du système immunitaires se subdivisent encore en deux groupes : le premier groupe contient les inhibiteurs du priming, tels que CTLA-4, qui empêche l'activation des T dans le ganglion. D'autres inhibiteurs, tels que PD-1, agissent plus tardivement en inhibant l'activité des lymphocytes T effecteurs. Dans le mélanome, l'apparition en clinique de deux anticorps bloquant les récepteurs CTLA-4 et PD-1 sont à l'origine d'une réelle révolution thérapeutique (Figure 34).

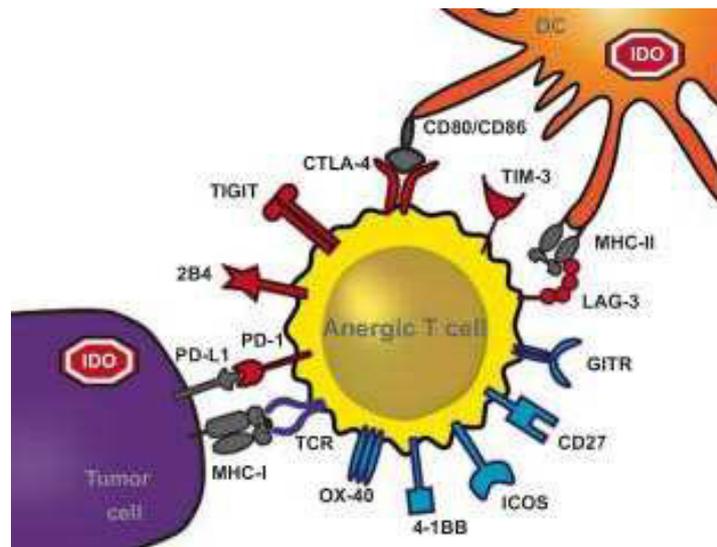


Figure 33 Balance entre les signaux activateurs (en bleu) et inhibiteur (en rouge) des lymphocytes T effecteurs. Ces signaux sont fournis à la cellule T (en jaune) par les cellules dendritiques (en orange) et les cellules tumorales (en violet). Adapté de (117)

CTLA-4 est le premier récepteur des points de contrôle immunitaire à avoir été ciblé en clinique (119). CTLA-4 est exprimé à la membrane plasmique des cellules T. Il agit précocement dans le contrôle de l'activation des T en entrant en compétition avec le récepteur de co-stimulation des lymphocytes T CD28 (120). CTLA-4 et CD28 ont tous les deux CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) comme ligands. Alors que la liaison de CD28 avec ses ligands participe au priming des lymphocytes T naïfs dans le ganglion, CTLA-4 génère un signal inhibiteur une fois lié à CD80/CD86. En se liant avec une plus forte affinité à CD80/CD86 que CD28, CTLA-4 agit également en empêchant la liaison des ligands CD80/CD86 avec CD28.

Contrairement à CTLA-4 qui agit sur l'activation des lymphocytes T, PD-1 limite l'activité des lymphocytes T effecteurs. Via la phosphatase SHP250, PD-1 inhibe les kinases impliquées dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T et induit leur mort par apoptose. PD-1 n'est pas exclusivement exprimé par les lymphocytes T mais est aussi retrouvé sur les lymphocytes B et NK activés (119). L'engagement chronique du TCR avec le complexe CMH/peptide induit de forts niveaux d'expression de PD-1 et donc l'inhibition du clone T spécifique à l'antigène (121).

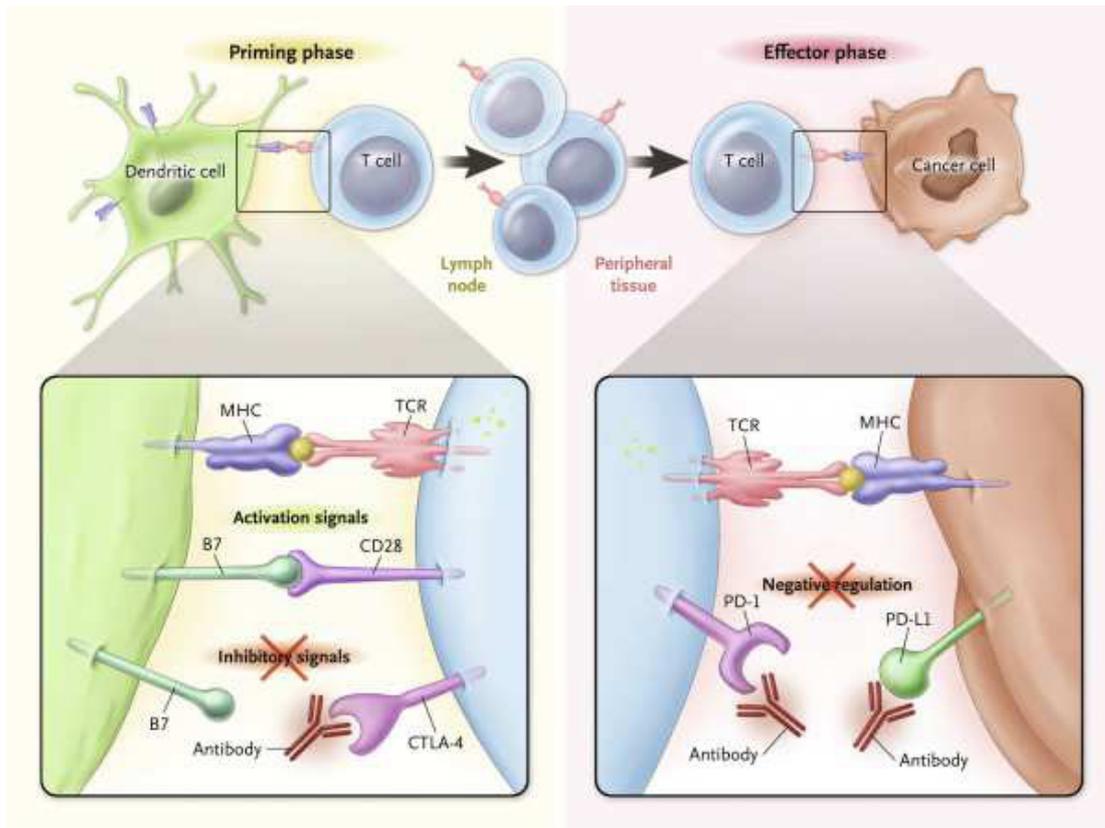


Figure 34 Représentation schématique du mécanisme d'action des deux inhibiteurs des points de contrôle du système immunitaire utilisés en clinique dans le cas de traitement des mélanomes. A gauche, les anti-CTLA-4 lèvent le signal inhibiteur de CTLA-4/B7 qui empêche le priming des lymphocytes T naïfs dans le ganglion. A droite, les anti-PD-1 bloquent la régulation négative de la liaison PD-L1/PD-1 qui se produit sur les lymphocytes T effecteurs infiltrant la tumeur.

TIGIT est une glycoprotéine transmembranaire possédant un domaine Ig-like de type V et un domaine de signalisation ITIM. TIGIT est exprimé par les lymphocytes T activés et mémoires, les NK et Treg. CD155 et CD112, les ligands de TIGIT, se trouvent sur les cellules présentatrices d'antigène et/ou les cellules tumorales. En se liant à TIGIT, ils empêchent la maturation des lymphocytes et inhibe leur activité cytotoxique, leur conférant ainsi un phénotype de tolérance (122). De par ses forts niveaux d'expression sur les lymphocytes T infiltrant la tumeur, TIGIT a fortement attiré l'attention dans le mélanome, d'autant plus que son ligand majoritaire, CD155 est exprimé de manière constitutive par les cellules de mélanome (123). De plus, des études chez la souris TIGIT^{-/-} soulignent le faible niveau de risque du ciblage de TIGIT, induisant moins d'effets secondaires que les anti-CTLA4 ou anti-PD1 (124).

LAG3 a été identifié pour la première fois en 1990 sur des NK activés et lymphocytes T (125). De manière intéressante, le gène de *LAG3* est adjacent au gène *CD4* sur le chromosome 12 humain. De plus, comme CD4, LAG3 possède 4 domaines extracellulaires immunoglobuline. LAG3

se lie au CMH-II, sur un domaine différent que CD4 et avec une affinité plus forte. Bien que très peu ne soit connu sur le mécanisme d'action de LAG3, LAG3 est une cible à fort potentiel dans le traitement des mélanomes. Des données préliminaires de l'utilisation de l'anti-LAG3 relatlimab en combinaison d'un anti-PD1 permet un taux de réponse de 11 pourcent parmi les patients atteints de mélanome en progression après anti-PD1 première ligne (126).

TIM3 quant à lui a été initialement identifié comme inhibiteur de la réponse TH1. TIM3 peut également être exprimé à la surface des lymphocytes T mémoires ou activés, des lymphocytes B, des cellules NK, mais également par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules myéloïdes suppressives. Le premier ligand de TIM3 identifié est la galectine 9, qui peut être exprimée par les cellules tumorales. La signalisation TIM3/Galectine-9 induit la mort des cellules. Aussi, TIM3 est une cible thérapeutique prometteuse, justifiant plus de 10 essais cliniques testant l'efficacité du ciblage de TIM3 seul ou en combinaison (127).

Enfin, BTLA a été initialement identifié comme récepteur inhibiteur sur les lymphocytes T. L'expression de BTLA sur les lymphocytes T CD8 spécifiques de virus est faible mais peut être bien plus forte dans un contexte tumoral tel que le mélanome. En présence de son ligand, le médiateur d'entrée du virus de l'herpès HVEM (TFNSFR14), BTLA inhibe l'activité des lymphocytes T. Le réseau de molécules interagissant avec HVEM est cependant complexe. Le membre de la superfamille des immunoglobulines CD160 et le membre de la famille des TFN LIGHT (TNFSF14) participent également à des signalisations d'inhibition ou d'activation en interaction avec HVEM. Ce réseau de signalisation est d'autant plus complexifié qu'il peut être bidirectionnel, HVEM pouvant agir comme ligand de CD160 et BTLA et récepteur pour LIGHT. De plus, la signalisation en aval de la liaison d'HVEM dépend du type cellulaire. CD160 est principalement exprimé par les NK alors que BTLA est plutôt retrouvé sur les lymphocytes B et T. Ainsi, HVEM inhibe l'activité des lymphocytes T via BTLA mais active les NK via CD160 (128).

En plus de l'expression des récepteurs des points de contrôle du système immunitaire, le microenvironnement tumoral peut-être riche d'autres molécules immunosuppressives telles que le TGF- β . De manière intéressante, à des stades précoces de développement tumoral, le TGF- β bloque la prolifération des cellules cancéreuses, favorise leur différenciation et induit l'apoptose des cellules tumorales. Au cours de la progression tumorale en revanche, la tumeur perd sa sensibilité au TGF- β en perdant l'expression du récepteur ou suite à une mutation inactivatrice en aval. Le TGF- β favorise alors la progression tumorale via son effet sur l'angiogenèse et l'induction

d'un microenvironnement immunosuppresseur. Le TGF- β empêche l'activation des lymphocytes T et réduit les capacités effectrices des T et NK. De plus, le TGF- β induit la différenciation des Treg, souvent rapporté comme facteur de mauvais pronostic.

Lors de l'ASCO 2018, Merck a présenté les avancées concernant sa nouvelle stratégie permettant de cibler PD-L1 et de capturer le TGF- β dans le microenvironnement tumoral grâce à sa protéine de fusion M7824. M7824 est composée du domaine extracellulaire du récepteur II au TGF- β , relié à la partie C-terminale de la chaîne légère de PD-L1 (129). Actuellement, l'essai concerne les carcinomes pulmonaires à non petites cellules et les cancers induit par le papillomavirus.

Bien que l'expression simultanée de plusieurs points de contrôles du système immunitaire soit souvent utilisée afin de caractériser l'état d'exhaustion, il est primordial de rappeler que l'expression des points de contrôle du système immunitaire reflète premièrement l'activation d'une réponse immune qui peut être efficace. Elle n'indiquera que plus tardivement un état d'exhaustion. Ainsi, plusieurs analyses des lymphocytes cytotoxiques infiltrant la tumeur à l'échelle de la cellule unique définissent des états d'exhaustion précoce et terminale. Le facteur de transcription TCF7 permet la distinction entre les états d'exhaustion précoce et terminale. Les lymphocytes T CD8 TCF7+ sont des lymphocytes spécifiques des cellules tumorales avec des propriétés de cellules souches, permettant le maintien de la population T spécifique à l'antigène et la différenciation en lymphocytes effecteurs. A l'inverse, les T CD8 TCF7- sont en état d'exhaustion terminale et ne sont plus capables d'induire une réponse anti-tumorale efficace (130). Une autre analyse récente du transcriptome et des TCR des lymphocytes T CD8 infiltrant les mélanomes à l'échelle de la cellule unique pour 25 patients fait évoluer le terme d'exhaustion en concept de dysfonctionnement. Alors que l'exhaustion était traditionnellement associée à un arrêt de prolifération des lymphocytes T, l'étude montre que les lymphocytes T en état de dysfonctionnement précoce exprimant fortement PD1 et LAG3 sont en fait très prolifératifs. De manière intéressante, cet état de dysfonctionnement est lié à une bonne reconnaissance tumorale. Plus tardivement, les niveaux d'expression des récepteurs inhibiteurs augmentent encore et la prolifération des lymphocytes diminue voire se stoppe, les T sont alors totalement non-fonctionnels (131).

3. Les mécanismes d'échappement médiés par la cellule tumorale

Afin d'échapper à l'attaque du système immunitaire, les cellules cancéreuses mettent en place différents mécanismes. Les cellules de mélanome peuvent empêcher la reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques en altérant la présentation antigénique. Elles envoient également des signaux inhibiteurs en exprimant les ligands des points de contrôle du système immunitaire tels que PD-L1. Enfin, via la sécrétion de cytokines et chémokines, les cellules de mélanome peuvent favoriser un microenvironnement immunosuppresseur favorable au développement tumoral (Figure 35). Je souhaite dans cette partie détailler les mécanismes d'échappement au système immunitaire déjà décrits dans le mélanome.

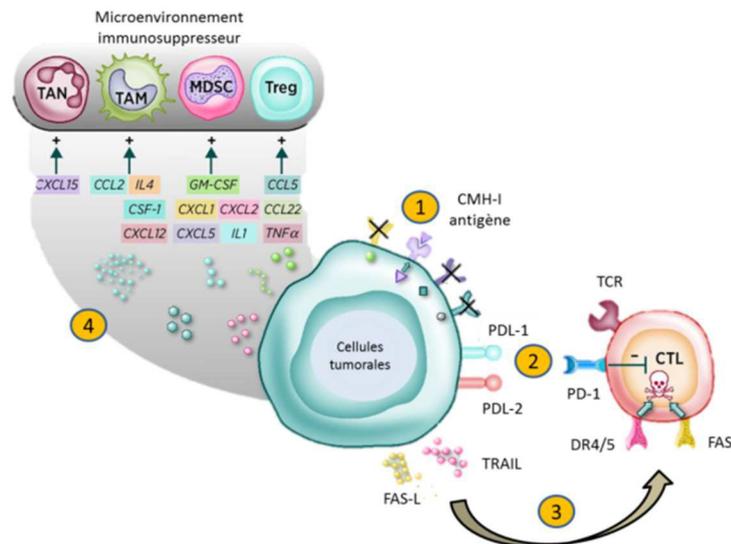


Figure 35 Mécanismes d'échappement au système immunitaire des cellules tumorales. (1) La reconnaissance des cellules tumorales peut être impactée à la suite par exemple de la perte d'expression du CMH-I. (2) En exprimant les ligands des points de contrôle du système immunitaire comme PD-L1 et PD-L2, les cellules tumorales envoient des signaux de co-régulation négative aux lymphocytes T (3) Les cellules cancéreuses peuvent induire la mort des lymphocytes T CD8 (CTL) Grâce à l'expression de signaux de mort comme FAS-L et TRAIL. (4) Les cellules tumorales produisent et sécrètent une variété de molécules immuno-modulatrices. Par exemple, elles recrutent des cellules myéloïdes dérivées suppressives (MDSC) par production d'IL-6 et induisent la différenciation Treg en sécrétant de l'IL-10. Adaptée de (132)

3.1. Altération de la présentation antigénique

L'altération de la présentation antigénique est un mécanisme tumoral d'échappement à la lyse par les lymphocytes T CD8 spécifiques. En régulant négativement la production de peptides antigéniques ou l'expression du CMH-I, les cellules de mélanome empêchent la reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques.

De nombreuses études révèlent une expression altérée des molécules du CMH-I dans les mélanomes associée à un échappement à la reconnaissance par les T cytotoxiques (133). Les molécules de classe 1 sont composées de deux chaînes polypeptidiques α et β « immunoglobuline-like » associées de manière non covalente. La chaîne α , aussi appelée chaîne lourde, est codée par les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C. Elle est polymorphique et varie donc d'un individu à l'autre. La chaîne β , également nommée chaîne légère, est quant à elle non-polymorphique. Elle est donc identique chez tous les individus. Elle assure un maintien de la conformation. Cette chaîne possède un domaine « immunoglobuline-like » β_2m . Les analogues murins des CMH de classe I sont les H2-K et H2-D. (Figure 36) (134).

Dans le mélanome, on retrouve majoritairement une délétion de la β_2 -microglobuline B2M, ce qui empêche l'expression du CMH-I (135). La perte totale d'expression du CMH-I par délétion ou mutation perte de fonction est rarement observée (136). Une étude sur 91 lignées cellulaires de mélanome de la banque européenne ESTDAB (European Searchable Tumor Cell Line Database) démontre que la perte d'expression du CMH-I HLA-B fréquemment observée est réversible sous traitement par IFN- γ (136). La perte totale d'expression du CMH-I rendrait les tumeurs sensibles à la lyse par les NK. L'expression ou l'absence d'expression des molécules du CMH-I par les cellules de mélanome serait donc réversible, permettant aux cellules de mélanomes d'échapper à la lyse des T et à l'immunosurveillance des NK.

Les antigènes du mélanome peuvent être classés en différents groupes incluant les protéines du lignage mélanocytaire, les antigènes testiculaires associés au cancer et les néoantigènes. Les antigènes de différenciation ou protéines du lignage mélanocytaire comme la tyrosinase, MLANA ou gp100 sont exprimés par les mélanocytes normaux et par les cellules de mélanome, principalement primaires ou en métastatiques précoces. Les antigènes testiculaires associés au cancer sont fortement exprimés au cours du développement. Leur expression se restreint aux testicules et au placenta à l'âge adulte. Ils sont ensuite de nouveau exprimés dans un certain nombre de cancer incluant le mélanome métastatique. Contrairement aux antigènes de différenciation trouvés dans les mélanocytes sains, les antigènes associés au cancer sont exprimés plus tardivement dans la progression tumorale. On recense par exemple les antigènes associés au mélanome (MAGE) ou NYESO-1. Enfin, les néoantigènes sont composés d'antigènes formés au sein des cellules cancéreuses à la suite de mutations somatiques et d'antigènes viraux (137). Ils permettent au système immunitaire de détecter les cellules transformées.

La présence d'antigènes tumoraux est nécessaire mais non suffisante à la reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques. En effet, avant d'être chargées sur le CMH, les protéines antigéniques doivent être transformées en peptides antigéniques. Le protéasome est un complexe clé permettant la dégradation de protéines cellulaires et la génération de peptides. Il est composé de trois sous-unités catalytiques. PSMB5 ($\beta 5$), PSMB6 ($\beta 1$) et PSMB7 ($\beta 2$) sont trois sous-unités composant le protéasome constitutif. Dans un contexte inflammatoire (IFN- γ , TNF- α), elles sont remplacées par les sous-unités composant le protéasome immunitaire PSMB8 ($\beta 5i$), PSMB9 ($\beta 1i$) et PSMB10 ($\beta 2i$). L'immunoprotéasome et le protéasome constitutif ont des activités catalytiques différentes ce qui aboutit à la production de peptides différents. Certaines études montrent que les antigènes immunogènes ne peuvent être produits que par l'immunoprotéasome. D'autres montrent cependant que des protéasomes intermédiaires, c'est-à-dire exprimant à la fois des sous-unités constitutives et des sous-unités immunitaires, sont capables de former des peptides tumoraux. L'antigène MAGE-A3 est par exemple exclusivement pris en charge par un protéasome intermédiaire ne contenant qu'une sous-unité catalytique PSMB8 ($\beta 5i$) de l'immunoprotéasome contre deux sous-unités constitutives (138). Récemment, il a été montré que l'expression des sous-unités de l'immunoprotéasome PSMB8 et PSMB9 corrèle avec une meilleure survie globale des patients atteints de mélanome et sont de bon pronostic de réponse aux immunothérapies (139).

Enfin, toutes autres altérations de la machinerie de présentation (Figure 36) permettant la formation du complexe CMH/peptide peuvent anéantir la présentation antigénique. Une altération décrite dans le cas du mélanome est la délétion du transporteur TAP permettant le passage de peptides antigéniques dans le réticulum endoplasmique où ils seront chargés sur le CMH-I avant de migrer vers la membrane plasmique.

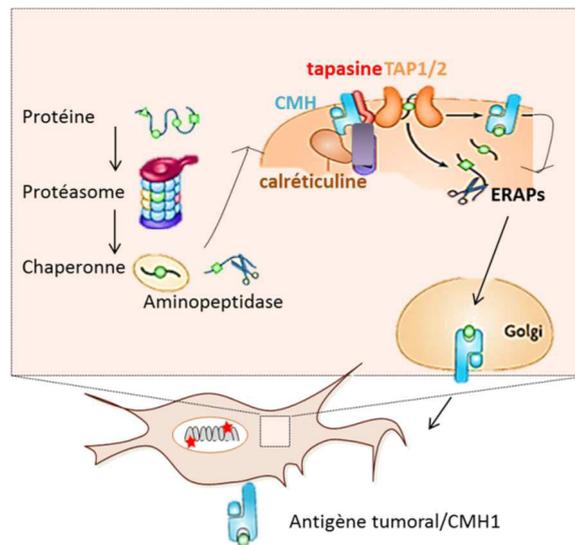


Figure 36 Présentation antigénique par la voie du CMH-I, adapté de (134). La chaîne lourde α et la chaîne légère β du CMH-I sont assemblées et maintenues grâce aux protéines chaperonnes à savoir la calréticuline, la calnexine et la tapasine. Les transporteurs TAP-1 et TAP-2 permettent le passage des peptides antigéniques présents dans le cytoplasme. Une fois assemblé, le complexe CMH/peptide migre vers la membrane plasmique via l'appareil de Golgi. Avant d'être chargées sur le CMH-I, les molécules antigéniques sont dégradées par le protéasome en peptides de 9 acides aminés

3.2. Les ligands des points de contrôle du système immunitaire

En plus de se masquer du système immunitaire, les cellules tumorales sont capables d'inhiber l'activité des cellules cytotoxiques dans le microenvironnement tumoral en exprimant les ligands des points de contrôle du système immunitaire (L-PCSI ou ICPL en anglais) tels que PD-L1 (B7-H1, CD274) et PD-L2 (B7-CD, CD273). Tous deux sont les ligands du point de contrôle PD-1 (140). Dans le mélanome, PD-L1 semble être le ligand majoritaire de PD-1 et est incontestablement le plus étudié à l'heure actuelle. Comme PD-1, PD-L1 est une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines. PD-L1 est retrouvé sur les cellules immunes incluant les lymphocytes B et T, les macrophages, les DC et mastocytes, et sur les cellules non-immunitaires saines telles que par exemples les cellules endothéliales et kératinocytes. PD-L1 peut également être exprimé par les cellules tumorales et les cellules stromales (141). L'expression de PD-L1 est sous le contrôle de divers signaux en aval d'aberrations génomiques, de signaux inflammatoires, de l'activation de voie de signalisation oncogénique ou encore de réseau de micro-ARN. Au-delà des régulations génétiques, transcriptionnelle et traductionnelle, la régulation de PD-L1 peut aussi se faire par stabilisation protéique (Figure 37).

L'amplification chromosomique de portions contenant PD-L1, PD-L2 et JAK2 ont été observées dans des carcinomes pulmonaires (142). En amont de la voie JAK/STAT, l'IFN- γ est le facteur soluble le plus reconnu pour induire l'expression de PD-L1. Les cellules de mélanome peuvent exprimer PD-L1 de manière constitutive mais à des niveaux d'expression et fréquences bien plus faibles en comparaison avec l'expression de PD-L1 induite par IFN- γ . L'expression de PD-L1 par les cellules de mélanome semble de plus restreinte aux zones riches en lymphocytes T CD8 producteurs d'IFN- γ (143). Dans ce cas, l'expression de PD-L1 est le reflet direct de l'activité des lymphocytes T. Les interférons de type I IFN- α et IFN- β induisent également l'expression de PD-L1 dans des lignées de mélanome en culture. Il est toutefois intéressant de noter que l'exposition à l'IFN de type I induit plus fortement PD-L2 que PD-L1, suggérant des voies de régulation divergentes pour les deux ligands (144).

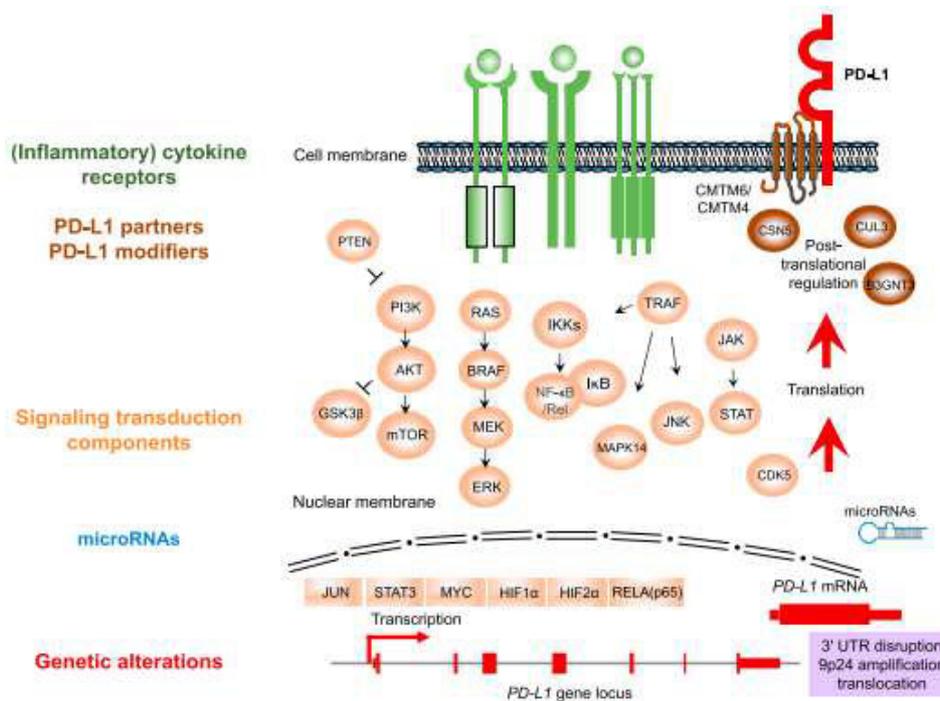


Figure 37 Mécanismes de régulation de PD-L1 : des stimuli extérieurs (vert) induisent un ensemble de voies de signalisation (orange) aboutissant à la régulation de PD-L1 par fixation directe de facteurs de transcription sur la région promotrice de PD-L1. Des altérations génétiques (rouges) sont également rapportées au sein du gène PD-L1. PD-L1 est également régulé par le biais de micro-ARN (bleu). Enfin, la protéine PD-L1 est stabilisée à la membrane (marron) (141).

L'activation de voies oncogéniques favorisent également l'expression de PD-L1. De nombreux facteurs de transcriptions oncogéniques en aval ont été identifiés comme régulateurs direct de PD-L1. Avec une expression aberrante dans plus de 70 pourcent des cancers, MYC appartient aux facteurs de transcription majeurs de la progression tumorale. Des approches

combinées d'immunoprécipitation de la chromatine et de délétion de MYC par shARN ont permis de démontrer le rôle du facteur de transcription MYC sur l'expression de PD-L1 (145). L'hypoxie favorise aussi l'expression de PD-L1 dans différents types cellulaires incluant des cellules de mélanome et de carcinome mammaire par directe fixation du facteur induit par l'hypoxie HIF-1 α sur les éléments de réponses à l'hypoxie présents dans le gène codant PD-L1 (146). La voie des MAPKinase apparaît être également une voie clé de régulation de PD-L1 qui est alors fortement impactée par l'utilisation des inhibiteurs de BRAF et MEK dans le mélanome. Il a été montré que l'exposition aux inhibiteurs de BRAF et MEK induit l'expression de PD-L1 par les cellules de mélanome (147). L'acquisition de résistance aux inhibiteurs de BRAF aboutit à une expression augmentée de PD-L1 médiée par c-Jun et STAT3 (143).

En amont de la transcription, les micro-ARN sont également impliqués dans la régulation de PD-L1, soit directement en induisant sa dégradation au niveau ARN messenger et/ou en inhibant la traduction, soit indirectement en ciblant des régulateurs de PD-L1. Le micro-ARN miR-513 réprimé par l'IFN- γ a été le premier micro-ARN démontré pour empêcher la traduction de PD-L1. A l'inverse, le micro-ARN miR-155 induit par l'IFN- γ et le TNF- α inhibe PD-L1, suggérant une régulation fine de PD-L1 en aval de la signalisation interféron par le biais de micro-ARN (141). Dans le mélanome le micro-ARN miR-17-5p a été identifié comme régulateur de l'expression de PD-L1. Une analyse sur une cohorte de 80 biopsies de mélanome montre une corrélation inverse entre l'expression de miR-17-5p et PD-L1. La régulation par liaison directe de miR-17-5p en 3'-UTR de l'ARN messenger de PD-L1 a été démontrée par test de reporteur luciférase (148).

Enfin, PD-L1 est régulé au niveau protéique. En empêchant l'ubiquitination de PD-L1, CMTM6 stabilise l'expression protéique de PD-L1 (149). De même, en aval de la signalisation NF κ B, le signalosome CSN5 stabilise PD-L1 en retirant les groupements ubiquitine (150). A l'inverse, en aval de la cycline D/ kinase CDK4, l'ubiquitination de PD-L1 par la ligase cullin-3 SPOP favorise sa dégradation par le protéasome, régulant ainsi négativement son expression (151).

3.3. Rôles des facteurs solubles sur l'attraction, la répulsion et la différenciation des populations immunes

En plus d'inactiver directement l'activité des lymphocytes effecteurs en exprimant les ligands des points de contrôle du système immunitaire, les cellules tumorales, en réseau avec leur microenvironnement, peuvent moduler l'infiltration immunitaire en impactant négativement le

recrutement des lymphocytes T cytotoxiques (confère partie 2) et/ou positivement le recrutement de cellules immunosuppressives (Figure 38). Après avoir décrit le rôle de la signalisation chémokinique CCR5 – CCL3/CCL4/CCL5, je souhaite faire un focus sur les populations immunosuppressives pouvant jouer un rôle dans le développement des mélanomes à savoir les Treg et les macrophages.

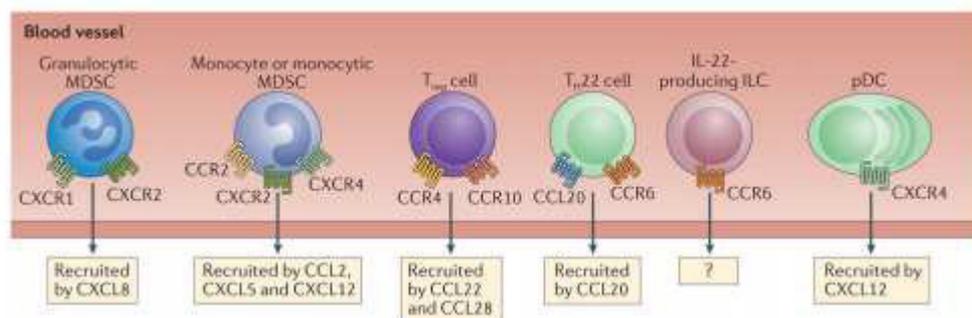


Figure 38 Recrutement de populations immunosuppressive par un réseau de chémokines (102)

A. RÔLE DE LA SIGNALISATION CHEMOKINIQUE CCR5-CCL3/CCL4/CCL5

L'implication de la signalisation impliquant CCR5 sur les cellules immunes et le développement tumoral des mélanomes est controversée mais semble majoritairement favoriser un environnement immunosuppresseur. Avec ses ligands CCL3, CCL4 et CCL5, CCR5 a un effet sur diverses populations immunes. De forts niveaux d'expression de CCR5 ont été retrouvés à la surface de lymphocytes T infiltrant la tumeur (115; 152). Cependant, il a été reporté que CCR5 n'agit pas seulement sur le recrutement des lymphocytes T CD8 mais induit la mort par apoptose. La liaison de CCL3, CCL4 ou CCL5 sur leur récepteur CCR5 induit le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme et active le programme de mort cellulaire dépendant des caspases 3 et 9 (153). De plus, la délétion de CCR5 *in vivo* chez la souris par knock-out ou utilisation d'anticorps bloquant retarde la croissance tumorale. En plus d'être fortement exprimé par les lymphocytes T CD8, CCR5 est retrouvé sur les T CD4 conventionnels et régulateurs (154) ainsi qu'à la surface des cellules myéloïdes dérivées suppressives (MDSC) dans différents types de cancers incluant le mélanome (155; 156). Les chémokines CCL3, CCL4 et CCL5 sont produites par les MDSC intra-tumorales et circulantes (154), mais aussi par les cellules tumorales (115). De manière intéressante, la délétion de CCR5 chez la souris, par knock-out ou utilisation d'anticorps bloquant réduit l'infiltrat immunosuppresseur Treg et MDSC sans impacter les lymphocytes T CD8 et CD4 conventionnels (154). De fortes concentrations des ligands CCL3, CCL4 et CCL5 au cœur de lésions mélanocytaires peut expliquer un enrichissement des MDSC CCR5+ au cœur de la tumeur (155).

B. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS

B.1. DEFINITIONS

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont des lymphocytes T CD4 régulant négativement l'activité immune suivant divers mécanismes inhibant *in fine* l'immunité innée, les fonctions des cellules présentatrices d'antigène ainsi que les réponses adaptatives B et T effectrices. Initialement, les Treg ont été identifiés sur la base de l'expression du cluster de différenciation CD25. La protéine forkhead box P3 (FoxP3) a ensuite été identifiée comme facteur de transcription définissant le lignage Treg. Il existe deux types de Treg : les Treg naturels et les Treg induits.

Les Tregs naturels se développent dans le thymus. Ils sont CD4 positifs et survivent à la sélection positive avec un TCR d'affinité moyenne à forte avec un couple CMH-II/peptide du soi.

Les Treg induits proviennent de la différenciation de T CD4 FoxP3- naïfs orientée par le TGF- β . La signalisation TGF- β active les facteurs de transcription Smad2/3 qui permettent directement la transcription de FoxP3. En plus de son rôle dans la différenciation, le TGF- β (et particulièrement l'isoforme 1) permet la maintenance de l'expression de FoxP3 et des fonctions suppressives des Treg. De manière globale, TGF- β 1 participe à l'homéostasie des Treg en périphérie (157).

B.2. ACTIONS IMMUNOSUPPRESSIVES

Les Treg peuvent agir spécifiquement ou non à un antigène donné. Par exemple, des Treg spécifiques de l'antigène tumoral NY-ESO-1 et des antigènes de différenciation GP100 et TRP1 sont retrouvés dans le sang de patient atteints de mélanome et sont de mauvais pronostic (158). Les Tregs peuvent également agir de manière indépendante d'un antigène en exprimant fortement le point de contrôle du système immunitaire CTLA-4. CTLA-4 entre en compétition avec les ligands activateurs de CD28 exprimés par les cellules présentatrices d'antigène, empêchant l'activation complète des lymphocytes T naïfs. Les autres récepteurs tels que PD1 et LAG3 sont également retrouvés sur les Treg. Leur rôle est alors d'amplifier leur activité immunosuppressive. Ainsi, certains points de contrôle du système immunitaire ont un rôle double en inhibant directement les lymphocytes T effecteurs et en soutenant l'activité régulatrice des Treg. Enfin, en sécrétant l'IL-10 et le TGF- β , les Treg inhibent la prolifération des lymphocytes T.

B.3. RECRUTEMENT DES TREG : CCL22, CCL28

Les Treg expriment CCR4 et sont recrutés au cœur de la tumeur par CCL22 principalement produit par les cellules tumorales et les macrophages. Les Treg expriment également CCR10 qui induit leur recrutement dans les zones hypoxiques riches en CCL28 (159).

B.4. INTERVENTIONS PRECOSES DES TREG DANS LA TUMORIGENESE

Une étude récente a mis en évidence le rôle très précoce des Treg dans la transformation des mélanomes induite par l'oncogène BRAF. Chez la souris, l'activation oncogénique *BrafV600E* et la perte de *Pten* dans les mélanocytes induit une accumulation de Treg FOXP3+ en l'absence de T CD8. Le recrutement des Treg sur le site de la transformation est médiée par la production, en aval de l'activation oncogénique *BrafV600E* de chémokines attractrices des Treg, ligands de CCR4. Dans ce modèle, les Treg jouent donc un rôle précoce majeur dans la restriction de l'immunosurveillance au cours de la tumorigenèse. Ces travaux soulignent également une conséquence de l'activation oncogénique sur la modulation du microenvironnement immunitaire de la tumeur naissante (160).

B.5. TREG ET RETROCONTROLE IMMUNITAIRE

De manière intéressante, les Treg ont été retrouvés dans les tumeurs infiltrées, dans les mêmes régions que les T CD8 alors que les tumeurs froides sont généralement dépourvues de cette population régulatrice. Le mécanisme d'immunosuppression médié par les Treg ne semblerait donc pas être une propriété intrinsèque à la tumeur mais plutôt un processus de rétrocontrôle immunitaire négatif suivant le recrutement des T CD8. Une étude mécanistique chez la souris a confirmé le rôle des T CD8 dans l'attraction des Treg FOXP3+ via la production de la chémokine CCL22 (161).

C. LES MACROPHAGES

C.1. DEFINITIONS

Les macrophages représentent une population immune connue pour sa capacité d'élimination des cellules mortes et débris cellulaires par phagocytose. L'origine des macrophages est double. Les macrophages résidents sont d'origine embryonnaire avec la capacité de s'auto-renouveler. Les autres macrophages sont la forme mature des monocytes. Les monocytes circulent dans le sang et se différencient en macrophage en pénétrant le tissu (162).

Chez l'homme, les macrophages expriment les marqueurs CD68, CD163, CD16, CD312 et CD115. Chez la souris, on les caractérise par l'expression membranaire de F4/80, CD11b et le récepteur CSF-1R.

C.2. POLARISATION M1/M2

Les macrophages représentent une population cellulaire très diverse et plastique, modulant constamment leur état fonctionnel en réponse aux stimuli du microenvironnement. On parle classiquement de polarisation entre les états d'activation classique M1 et d'activation alternative M2. Les macrophages en activation classique M1 produisent des cytokines pro-inflammatoires et espèces réactives de l'oxygène et induisent une réponse TH1, jouant un rôle majeur dans la défense de l'hôte et l'élimination de cellules tumorales. Les macrophages M1 sont caractérisés par leurs forts niveaux d'expression du CMH-II, CD68 et les molécules de co-stimulation CD80 et CD86. A l'inverse, les macrophages en polarisation M2 produisent des cytokines anti-inflammatoires afin de résorber l'inflammation. Ils suppriment ainsi l'immunité contre les cellules tumorales. Ils sécrètent également l'interleukine 10 et le facteur de croissance TFG- β favorisant l'infiltrat en Treg et la progression tumorale (163). Les macrophages en polarisation M2 expriment de faibles niveaux d'expression du CMH-II. Ils sont caractérisés par l'expression de CD163, la glycoprotéine membranaire CD200R et de l'enzyme arginase 1 ARG1.

Les cellules de mélanome sont capables de moduler le ratio M1/M2 par l'expression de la kinase sphingosine 1 (S1K). Cette kinase S1K produit un lipide bioactif, le lipide sphingosine 1-phosphate. De faibles niveaux d'expression de la kinase S1K sont associés à une réduction du nombre de macrophages en polarisation M2 en faveur d'une augmentation de macrophages en polarisation M1 (164).

C.3. MACROPHAGES ASSOCIES A LA TUMEUR (TAM)

Longtemps, les macrophages associés à la tumeur (TAMs) étaient associés à la polarisation M2. D'autres études ont cependant associé la polarisation au stade de progression tumoral et au microenvironnement tumoral à un instant donné. Les macrophages associés à la tumeur semblent former une population variée évoluant sur un continuum d'états physiologiques et fonctionnels, toujours en cours de caractérisation (Figure 39) (163).

C.4. RECRUTEMENT DES MACROPHAGES

Les macrophages sont principalement recrutés par les signalisations CCL5-CCR5 mais aussi CCL2-CCR2. Le rôle dans le recrutement des macrophages du facteur stimulant les colonies de macrophages (M-CSF ou CSF1) a aussi été montré. Des facteurs chémotactiques induits par l'hypoxie comme CXCL12, ligand de CXCR4 et l'angiopoïétine 2 (Ang-2) induisent également le recrutement de monocytes exprimant le récepteur à tyrosine kinase Tie2 dans les zones d'hypoxie tumorale qui se différencieront en macrophages exprimant Tie2, connus pour favoriser l'angiogénèse.

C.5. FONCTIONS PRO-TUMORALES ET IMMUNOSUPPRESSIVES DES MACROPHAGES ASSOCIES A LA TUMEUR

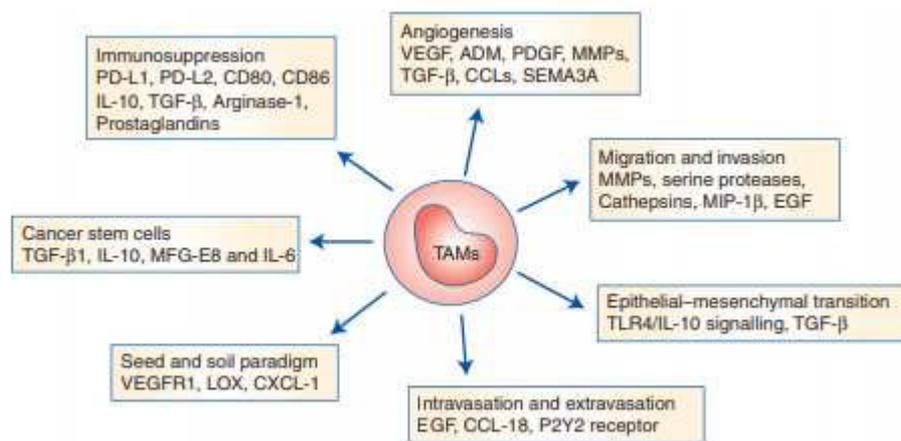


Figure 39 Rôles des macrophages associés à la tumeur et marqueurs correspondants au phénotype associé (163)

La vascularisation est induite par les facteurs sécrétés par les macrophages infiltrant la tumeur tels que les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF, l'adrénomédulline ADM, les facteurs de croissance dérivés des plaquettes PDGF et le TGF- β .

Les macrophages ont également un rôle clé dans l'invasion et la migration des cellules tumorales. En sécrétant des métalloprotéinases matricielles (MMP), les macrophages permettent le remodelage de la matrice extracellulaire.

Les macrophages associés à la tumeur induisent également la transition phénotypique des cellules tumorales en faveur d'un phénotype invasive/souche via notamment la sécrétion de TGF- β , et d'interleukines 6 et 10 (confère chapitre 3).

Enfin, les macrophages associés à la tumeur induisent un environnement immunosuppresseur via principalement le recrutement de Treg par production d'interleukine 10

et de TGF- β et l'exhaustion des T effecteurs en exprimant les ligands des points de contrôle du système immunitaire PD-1 et CTLA-4, respectivement PD-L1/PD-L2 et CD80/CD86. De manière intéressante, il a également été montré que la signalisation à travers PD-L1 induit un phénotype encore plus immunosuppresseur des macrophages associés à la tumeur, que ne sont alors plus capables de phagocytose et d'immunité anti-tumorale (165; 166).

4. Mécanismes de résistance à l'immunothérapie

Encore non totalement élucidés, les mécanismes de résistance aux immunothérapies reposent non seulement sur la composition/fonction de l'infiltrat immunitaire, mais aussi sur des altérations oncogéniques des cellules tumorales. Dans une première partie, j'ai choisi de décrire deux paramètres relatifs aux T CD8 jouant un rôle dans la réponse aux anti-PD1. Je me concentrerai ensuite sur la description des altérations oncogéniques au sein des cellules tumorales comme mécanisme d'évasion au système immunitaire et de résistance aux immunothérapies. En effet, mes travaux de thèse visent à étudier la potentielle implication d'une altération oncogénique des cellules de mélanome – la plasticité cellulaire dépendante de ZEB1 – dans l'évasion des mélanomes et la résistance aux immunothérapies anti-PD1 (Article 2).

4.1. Mécanismes d'origine immunitaire

Le concept de tumeurs chaudes et de tumeurs froides a été introduit en 2010 par Gajewski, suite à l'observation du profil d'expression génique de biopsies de mélanome avant traitement dans le contexte d'essais cliniques de vaccins anti-tumoraux. Deux groupes majeurs de microenvironnements tumoraux ont été identifiés, basés sur l'absence ou la présence d'un profil transcriptionnel associé à un infiltrat T préexistant (167). Cette observation a été largement reprise depuis et confirmée au niveau protéique notamment par marquages immunohistochimiques dans diverses études. Aujourd'hui, on parle de 'tumeurs chaudes' lorsque l'infiltrat en cellules T CD8 cytotoxiques est conséquent, dans un environnement globalement inflammatoire. Les cellules dendritiques et macrophages soutiennent la réaction immune anti-tumorale. Des lymphocytes T anergiques et régulateurs sont le reflet du contexte inflammatoire et d'une réponse immune. L'anergie des lymphocytes T est induite suite à l'engagement du TCR par la cellule présentatrice d'antigène sans signal de co-stimulation CD80/CD86. Les lymphocytes anergiques sont alors incapables d'initier une réponse immune vis-à-vis de l'antigène. A l'inverse, les tumeurs dépourvues de T CD8 sont caractérisées de 'froides'. Elles ne sont infiltrées que de

macrophages principalement pro-tumoraux avec un phénotype de macrophage associé à la tumeur (Figure 40). Il est aujourd’hui largement admis que les tumeurs pauvres en T CD8 activés ou tumeurs froides ne bénéficient pas d’effet des immunothérapies (113). L’exclusion des T CD8 et autres populations immunes est appelée l’évasion innée et est un mécanisme majeur de résistance aux immunothérapies (168).

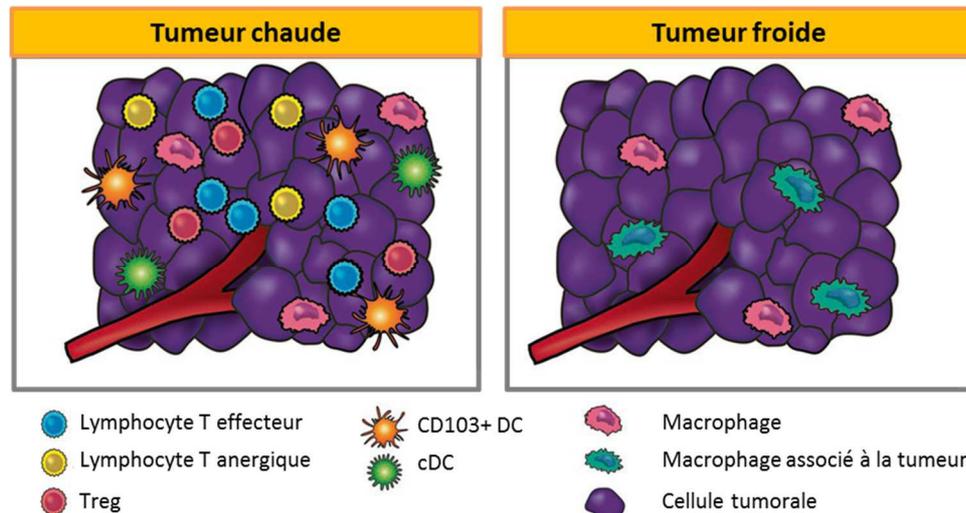


Figure 40 Composition du microenvironnement immunitaire des tumeurs chaudes (à gauche) et froides (à droite). Les tumeurs chaudes ont un environnement inflammatoire riche en lymphocytes T effecteurs (en bleu). Les cellules dendritiques (en vert et orange) et macrophages (en rose) soutiennent la réaction immune anti-tumorale. Des lymphocytes T anergiques (en jaune) et régulateurs (en rose) sont le reflet du contexte inflammatoire et d’une réponse immune. Les tumeurs froides sont des « déserts » de lymphocytes et ne sont infiltrées que par des macrophages principalement pro-tumoraux avec un phénotype de macrophages associées à la tumeur (en bleu)

La présence de T CD8 avant traitement mais aussi l’enrichissement en lymphocytes T intratumoraux sous traitement est un marqueur bien admis de bon pronostic et réponse aux anti-PD-1. Un nombre croissant d’études analysent les lymphocytes infiltrant la tumeur à l’échelle de la cellule unique afin d’affiner leur caractérisation et de mieux comprendre leur rôle dans l’évasion adaptative des mélanomes. Un répertoire de TCR riche et spécifique des cellules tumorales est nécessaire à la reconnaissance des cellules de mélanome. La caractérisation du répertoire TCR est couramment basée sur la détection des réarrangements V-J de la chaîne β du TCR. La régularité du répertoire est calculée à partir des fréquences des réarrangements V-J. Un score de régularité de diversité DE_{50} est attribué à chaque patient. Il est calculé par le ratio du nombre de réarrangements permettant de reproduire 50 pourcent de la cartographie TCR sur le nombre total de réarrangements présents. Un DE_{50} élevé correspond donc à une occurrence homogène de chaque réarrangement V-J alors qu’un faible score témoigne de la présence de lymphocytes T clonaux. Récemment, une étude réalisée sur 38 patients atteint de mélanome montre que

l'analyse qu'une forte clonalité du répertoire TCR des lymphocytes T circulant dans le sang pourrait être un marqueur de réponse aux immunothérapies anti-PD-1 (169). Cette clonalité est le résultat de la prolifération de lymphocytes T activés. Les lymphocytes T activés exprimant le facteur de transcription TCF7 sont un marqueur de bon pronostic de réponse aux anti-PD-1. De manière intéressante, ils expriment les récepteurs des points de contrôle du système immunitaire caractérisant un état de dysfonctionnement précoce (130). Cet état de dysfonctionnement précoce pourrait conduire à un état d'exhaustion tardive sans traitement. Il a été proposé que les immunothérapies anti-PD-1 empêcheraient ou retarderaient l'état d'exhaustion terminal en favorisant l'amplification des lymphocytes T clonaux (170). Les analyses des lymphocytes T à l'échelle de la cellule unique ont permis des avancées majeures dans la compréhension de la réponse lymphocytaire anti-tumorale. Cependant, ces approches ne prennent pas en compte la localisation spatiale des cellules immunes alors que la proximité avec les cellules tumorales est nécessaire à l'efficacité de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8. De plus, une réponse immune efficace ne peut être mise en place sans la collaboration de différentes populations et l'importance du microenvironnement ne peut être exclue.

4.2. Les mécanismes de résistance intrinsèques à la cellule tumorale

Au-delà des paramètres immunitaires, un nombre croissant d'études démontre le rôle majeur d'altérations oncogéniques dans la résistance aux immunothérapies et particulièrement aux thérapies anti-PD-1. Nous avons vu auparavant que la présentation antigénique pouvait être altérée, ce qui induit un défaut de priming et/ou d'activation des lymphocytes T et est donc défavorable à la réponse aux anti-PD-1. A l'inverse, la charge mutationnelle induisant une forte production de néoantigènes corrèle avec de haut taux de réponse aux anti-PD-1 (171). De manière moins évidente, l'activation de voies de signalisation oncogéniques a également été reportée pour avoir un impact sur le microenvironnement stromal et immunitaire, au-delà des impacts intrinsèques déjà décrits sur la prolifération, survie ou invasion des cellules de mélanomes (Figure 41). Dans la suite de cette partie, je souhaite détailler les principales altérations oncogéniques associées à la résistance aux immunothérapies des mélanomes. En fonction de la date de l'étude, toutes les études notamment les plus anciennes ne font pas de lien direct avec la réponse aux anti-PD-1 mais s'intéressent à d'autres solutions thérapeutiques telles que les anti-CTLA-4 ou le transfert adoptif de lymphocytes T. Je présenterai ici les études qui peuvent

raisonnablement être extrapolées comme mécanisme potentiel de résistance aux anti-PD-1 qui est en France l'immunothérapie de référence actuellement.

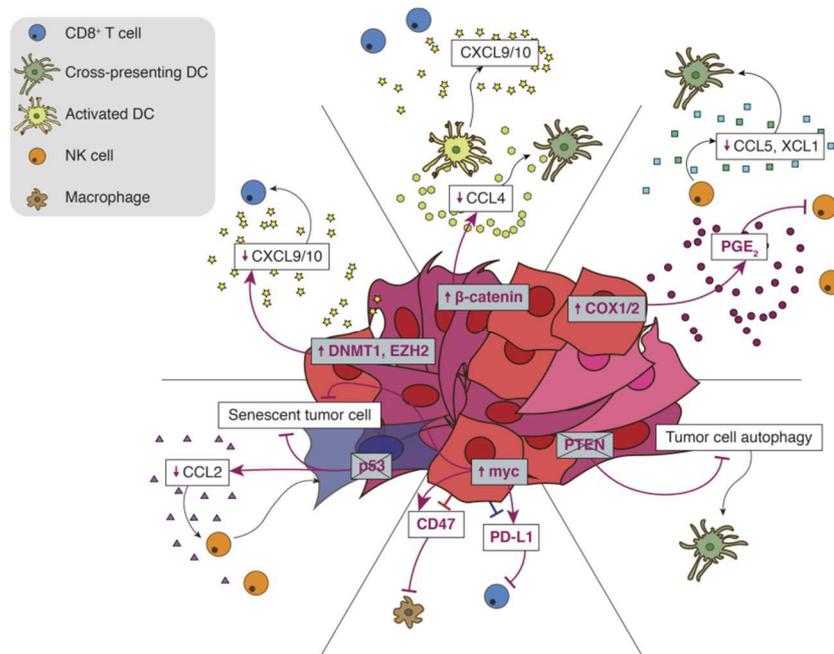


Figure 41 Mécanismes de résistance aux immunothérapies intrinsèques à la cellule tumorale affectant principalement le recrutement et l'activation des lymphocytes T cd8. L'activation de la voie WNT/ β -caténine réduit la production de CCL4. Or, CCL4 permet le recrutement des 103+ DC essentielles pour l'activation des T CD8 et le recrutement par production de CXCL9/10. La production de PGE2 par de forts niveaux d'expression de COX1/2 impaire le recrutement et l'activité des NK producteurs de CCL5 et XCL1. En aval, le recrutement des CD103+ DC est là encore impacté. Le recrutement des NK est aussi affecté suite à la perte de PTEN, causant de la diminution de production de CCL2 par les cellules tumorales sénescents. En perturbant le mécanisme d'autophagie des cellules tumorales, la perte de PTEN affecte la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T par les DC. Enfin, le facteur de transcription MYC régule directement la transcription de PD-L1 et CD47. PD-L1 inhibe l'activité des T et CD47 inhibe la phagocytose en engageant SIRP- α sur les cellules présentatrices d'antigène (172).

L'activation tumorale de la voie WNT/ β -caténine fut la première altération oncogénique intrinsèque à la cellule tumorale associée à un défaut d'infiltrat T CD8 dans le mélanome. Les données d'expressions de patients atteints de mélanome métastatique de la cohorte du TCGA ont été utilisées afin d'étudier comparativement les tumeurs faiblement et fortement infiltrées par les lymphocytes T CD8 grâce à une signature spécifique des T CD8. L'analyse conjointe des mutations et des données d'expression dans les deux catégories de patients a permis d'associer l'activation de la voie WNT/ β -caténine à l'absence d'infiltrat T CD8. Plus précisément, approximativement un tiers des mélanomes ayant anormalement activé la voie WNT/ β -caténine présentent un infiltrat T CD8 insuffisant. Afin d'étudier la mécanistique, un modèle murin a été généré permettant l'expression stable de la β -caténine inductible au tamoxifène sous le promoteur de la tyrosinase (Tyr::CreER) à partir du modèle Braf/Pten décrit dans le premier

chapitre. L'analyse de l'infiltrat immunitaire comparative des tumeurs β -caténine activée ou wild-type a révélé une importante défaillance en T CD8 dans les tumeurs présentant une β -caténine activée due à un défaut de priming des cellules T spécifique des tumeurs β -caténine dans le ganglion drainant. Ce défaut de priming est dû à une diminution des cellules dendritique CD103+ Batf3, connues pour jouer un rôle majeur dans la présentation croisée des antigènes spécifiques à la tumeur aux cellules T CD8. Les travaux de Stefany Spranger ont permis de montrer que ce défaut de recrutement des Batf3 DC est causé par une production réduite, par les mélanomes β -caténine activés, de la chémokine CCL4 impliquée dans l'attraction des cellules dendritiques Batf3. Concernant la réponse aux anti-PD1, les tumeurs β -caténine activées, faiblement infiltrées en T CD8 ont été montrées résistantes aux immunothérapies anti-PD-1. L'infiltrat T CD8 et la sensibilité des tumeurs β -caténine activées ont été restaurés par injection intratumorale de cellules dendritique Batf3 activée (113). De manière intéressante, le transfert adoptif de cellules T CD8, sensé générer un infiltrat de T effecteurs et mémoires, s'est révélé insuffisant pour le contrôle des mélanomes β -caténine activés (100). La présence des cellules dendritiques CD103+ Batf3 dans le microenvironnement tumoral est donc nécessaire au bon fonctionnement de l'immunité anti-tumorale dans ce modèle d'étude. Récemment, le rôle de la sérine/thréonine protéine kinase 4 activée par p21 PAK4 a été détaillé. En phosphorylant directement un site spécifique de la β -caténine, PAK4 active la voie WNT. Chez l'homme, PAK4 est enrichie dans les biopsies de mélanomes froids peu infiltrés en lymphocytes T et cellules dendritiques. Chez la souris, la délétion génétique de PAK4 dans un modèle syngénique d'allogreffe sous cutanée à partir de la lignée B16 restaure l'infiltrat T CD8 et sensibilise les mélanomes aux immunothérapies par anti-PD-1. De plus, la combinaison de l'anti-PD-1 avec l'inhibiteur pharmacologique de PAK4 KPT-9274 améliore la réponse anti-tumorale. Cette étude a abouti au lancement d'un essai clinique de phase 1 combinant l'anti-PD-1 nivolumab à l'inhibiteur de PAK4/NAMPT KPT-9274 dans diverses tumeurs solides avancées incluant le mélanome (NCT02702492) (173).

Des mutations perte de fonction de la phosphatase PTEN représentent la deuxième altération la plus fréquemment associée à un phénotype immunitaire pauvre en T CD8 dans les mélanomes. L'analyse des mélanomes métastatiques recensés dans le TCGA montre que la perte de PTEN et l'activation de la voie β -caténine sont deux mécanismes indépendants et non redondants. (Figure 42) (174). Les mécanismes d'action moléculaires en aval de la perte de PTEN ne sont pas complètement élucidés. L'étude comparative du transcriptome de tumeurs provenant de l'injection de la lignée A375 dont l'expression de PTEN a été régulée par sh-ARN

ciblant PTEN dans des souris nude révèle une augmentation d'expression de CCL2 et VEGF-A dans les tumeurs shPTEN par rapport aux tumeurs contrôles. L'impact sur le recrutement des macrophages n'a pas été approfondi dans cette étude impliquant des souris immunodéprimées. Plus relevant, l'expression des gènes associés à l'autophagie LC3I et LC3II est diminuée dans les lignées de mélanome et tumeurs déficiente pour PTEN. L'autophagie a été proposée comme mécanisme d'activation de cellules présentatrices d'antigènes permettant la présentation d'antigènes tumoraux et l'activation des lymphocytes T. Ainsi, la perte de PTEN diminuerait l'attraction et l'activation des cellules présentatrices d'antigènes macrophages et DC. L'inhibition pharmacologique de PI3K β chez les souris Tyr:CreER; PTENlox/lox; BRAF V600E/+, synergise avec le traitement anti-PD-1 dans le contrôle de la croissance tumorale (174).

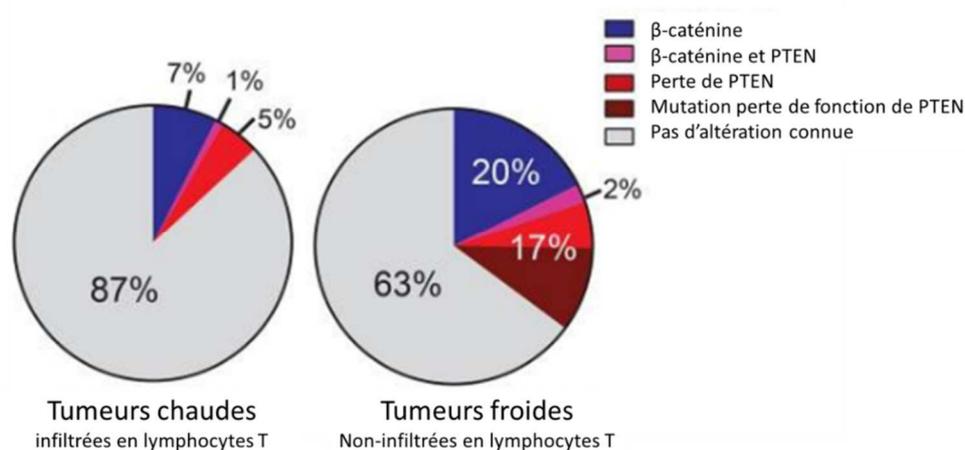


Figure 42 Fréquences des altérations génétiques des voies β -caténine et PTEN entre les tumeurs chaudes et tumeurs froides. Les mélanomes métastatiques du TCGA ont d'abord été divisés en fonction de leur infiltrat T CD8, fort à gauche et faible à droite puis sous-divisés sur les mutations activatrices de la voie β -caténine ou perte de fonction des régulateurs négatifs de la voie (APC, APC2, axin1, axin2) en bleu ; les délétions de PTEN en rouge ; les mutations pertes de fonction de PTEN en marron. Les tumeurs dont les deux voies sont affectées sont représentées en violet et celles dont aucune des deux altérations n'est reportées sont en gris (174).

Plusieurs études ont montré un lien entre la régulation du cycle cellulaire et la réponse aux anti-PD1. Dans un modèle murin de cancer du sein par exemple, l'inhibiteur de CDK4/CDK6 abemaciclib agit en synergie avec les immunothérapies anti-PD-1. L'effet de l'inhibiteur de CDK4/CDK6 a été attribué aux cellules tumorales induisant un contexte inflammatoire via une production augmentée de cassures d'ARN (175). L'inhibition de CDK4/CDK6 est cependant aussi connue pour impacter l'activité des lymphocytes T, en induisant la production d'interleukine 2 et favorise leur infiltration au cœur de la tumeur. A l'inverse, elle diminue leur capacité proliférative (176). Il semble donc difficile de dissocier l'effet de l'inhibition de CDK4/CDK6 sur les cellules tumorales et immunes. Une étude à partir de l'analyse de 33 tumeurs de mélanome à l'échelle

de la cellule unique a permis de mettre en évidence un programme oncogénique d'exclusion des lymphocytes T et plus généralement d'évasion immunitaire mené par CDK4/CDK6. Ce programme est en place avant traitement. La valeur prédictive de résistance aux anti-PD-1 du programme CDK4/CDK6 a été validée sur une cohorte indépendante de 112 patients atteints de mélanome. L'intérêt de cibler CDK4/CDK6 en combinaison des immunothérapies anti-PD-1 a de plus été validé chez la souris (72).

En aval de l'activation de la voie des MAPKinase, la production des cytokines immunorégulatrices IL-10 et IL-6 par les cellules tumorales peut induire un environnement immunosuppresseur. Une étude *in vitro* sur trois lignées de mélanome humaines incluant les A375 a montré que la production d'IL-10 et IL-6 était directement liée à la mutation activatrice *BRAFV600E* puisqu'elle diminue fortement sous traitement à l'ARN interférant la mutation *BRAFV600E* (177). Une étude comparative à partir de 34 biopsies de patients avant traitement et quatorze jours après traitement par inhibiteur de BRAF seul ou combiné à l'inhibiteur de MEK valide une diminution d'expression des cytokines inflammatoires IL-6 et IL-8 sous traitement mais ne montre aucune variation d'expression d'IL-10 et de TGF- β . En parallèle, l'étude a révélé que l'inhibition de la voie des MAPK favorise l'expression d'antigènes du mélanome (178). Une étude *in vitro* sur la lignée de mélanome A375 suggère aussi que l'inhibition de BRAF permet l'expression du CMH-I (179). A partir de données transcriptomiques de mélanomes humains, l'équipe de Lo a identifié une signature de résistance innée aux anti-PD-1 appelée IPRES. Cette signature comprend un panel de gènes régulant la transition épithélio-mésenchymateuse, le remodelage de la matrice extracellulaire, l'angiogénèse, l'adhésion cellulaire et la réparation (50). La signature IPRES présente des similarités avec les signatures de résistance aux inhibiteurs de BRAF, ce qui peut révéler soit un lien entre la voie des MAPK et la résistance aux immunothérapies, soit un biais lié au choix de la cohorte incluant des patients ayant été traités en première ligne par les inhibiteurs de BRAF. Aussi, dans sa dernière revue, Antoni Ribas conseille d'être prudent avec cette signature, qui n'a pas été confirmée par la suite sur d'autres grandes cohortes incluant la cohorte en cellule unique de Jerby Arnon et al. (180). Ainsi, contrairement aux autres altérations oncogéniques décrites plus haut, l'implication de la voie des MAPKinases dans l'évasion des mélanomes n'est à ce jour que suggérée par quelques observations sans démonstration formelle *in vivo*.

L'activité métabolique varie grandement d'une tumeur à l'autre et même d'une lignée cellulaire à l'autre. Une consommation importante en oxygène par la tumeur favorise l'épuisement des lymphocytes T et diminue la réponse immune. L'évaluation prospective d'une cohorte de 19 patients atteints de mélanome a mis en évidence un métabolisme oxydatif augmenté chez les patients non-répondeurs aux immunothérapies anti-PD-1 alors que le métabolisme glycolytique n'était pas prédictif de réponse aux anti-PD-1 (181). Récemment, l'impact du métabolisme des sphingolipides sur la résistance aux anti-PD1 a aussi été démontré. La sphingosine kinase de type 1 catalyse la phosphorylation de la sphingosine en sphingosine-1-phosphate S1P. *In vivo*, l'inhibition par shARN et pharmacologique de SK1 ralentit la croissance tumorale, restaure un infiltrat T CD8 et atténue le recrutement de Treg. L'inhibition de SK1 améliore la réponse aux anti-PD1, ouvrant une voie innovante et prometteuse de combinaison thérapeutique dans le mélanome (182).

CHAPITRE 3 : LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION INDUCTEURS D'EMT, LES EMT-TFS, DES REGULATEURS DE LA PLASTICITE DES CELLULES CANCEREUSES

1. Plasticité cellulaire des cellules cancéreuses

Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses subissent des changements aussi bien moléculaires que phénotypiques décrits par le concept de plasticité cellulaire. La plasticité des cellules cancéreuses résulte d'un ensemble de signaux émanant du microenvironnement, d'altérations génétiques et épigénétiques, ou encore de la pression induite par les thérapies anti-cancéreuses. La plasticité cellulaire est une source majeure d'hétérogénéité intra-tumorale. Elle confère à la tumeur une capacité d'adaptation exacerbée, lui permettant de surmonter les pressions de sélection rencontrées à chaque étape de la progression tumorale depuis les phases précoces d'initiation tumorale jusqu'à la réponse aux thérapies anti-cancéreuses.

La transition épithélio-mésenchymateuse est l'un des programmes de plasticité cellulaire les plus étudiés. Dans l'équipe, nous travaillons sur la plasticité des cellules cancéreuses dépendantes des EMT-TFs. Aussi, je commencerai par présenter l'EMT et les facteurs de transcriptions associés. La bibliographie étant plus exhaustive dans les cellules épithéliales et plus modeste dans les cellules de mélanome, je détaillerai le rôle des EMT-TFs au cours de chaque étape de la carcinogénèse incluant la transformation, l'acquisition de propriétés souches et invasives, la résistance aux traitements, et l'échappement au système immunitaire. Enfin, j'introduirai la notion de « pseudo-EMT » applicable au mélanome et détaillerai plus particulièrement le potentiel tumorigène de ZEB1 dans le mélanome.

2. La transition épithélio-mésenchymateuse

2.1. Définition de la transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse dite EMT est un processus fondamental de transdifférenciation cellulaire essentiel au cours du développement embryonnaire et de la réparation tissulaire. L'EMT a initialement été décrite par Elizabeth Hay en 1982 comme une transformation, impliquant le passage de cellules épithéliales jointives et polarisées en cellules mésenchymateuses, individuelles et motiles (183). Afin de souligner le caractère réversible du processus d'EMT, le concept fût par la suite rebaptisé en substituant au terme de transformation

la notion de transition. Le retour d'un état mésenchymateux à un état épithélial se fait par la transition inverse appelée transition mésenchymo-épithéliale ou MET. Grâce aux processus réversibles d'EMT et de MET, les cellules sont capables de passer d'un état à l'autre de manière très plastique et dynamique (Figure 43).

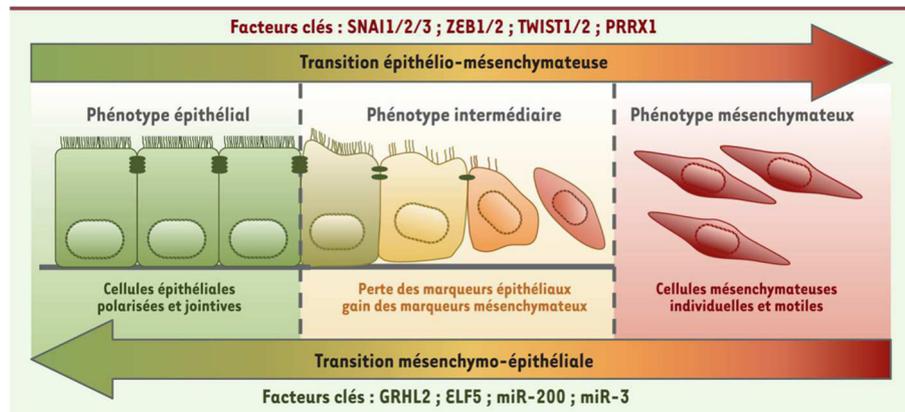


Figure 43 Schéma caractéristique de la transition épithélio-mésenchymateuse EMT et de la transition inverse MET. Les cellules épithéliales polarisées sont maintenues entre elles par des jonctions serrées, adhérentes et desmosomes. La couche adhérente à la membrane basale est maintenue par les hémidesmosomes. Les cellules passent progressivement à un état mésenchymateux en passant par des états intermédiaires (Caroline Moyret-Lalle, 2016).

On distingue trois types d'EMT : l'EMT de type I au cours du développement embryonnaire, l'EMT de type II au cours de la réparation tissulaire et enfin l'EMT de type III pathogène, retrouvée au cours de la progression tumorale. Avant de m'arrêter plus en détail sur la description des EMT-TFs et leurs rôles dans la progression tumorale, il convient de décrire le rôle de l'EMT au cours du développement. J'insisterai principalement sur le développement de la crête neurale, à l'origine du lignage mélanocytaire.

2.2. EMT et développement embryonnaire

Le processus d'EMT est primordial dès les premiers stades de l'embryogenèse. Afin d'assurer l'implantation de l'embryon et un correct ancrage du placenta, les cellules du trophoctoderme envahissent l'endomètre en suivant un programme d'EMT. Concernant l'embryon lui-même, le programme d'EMT est enclenché au cours de la gastrulation où l'embryon évolue d'un simple feuillet de cellules épithéliales aux trois feuillets primordiaux à savoir le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. Les cellules du mésoderme et de l'endoderme subissent plusieurs transitions EMT et/ou MET. Elles contribueront au développement d'un grand nombre de tissus (Figure 44).

Le programme EMT a également une importante majeure dans le développement du système nerveux. Les cellules de la plaque neurale s'enroulent afin de former le tube neural,

précurseur du cerveau et de la moelle osseuse. Les cellules de la partie dorsale de la crête neurale se séparent de celle-ci suivant un processus d'EMT. Ces cellules au fort potentiel migratoire vont donner naissance à de multiples structures spécialisées après migration, prolifération et différenciation (Figure 45).

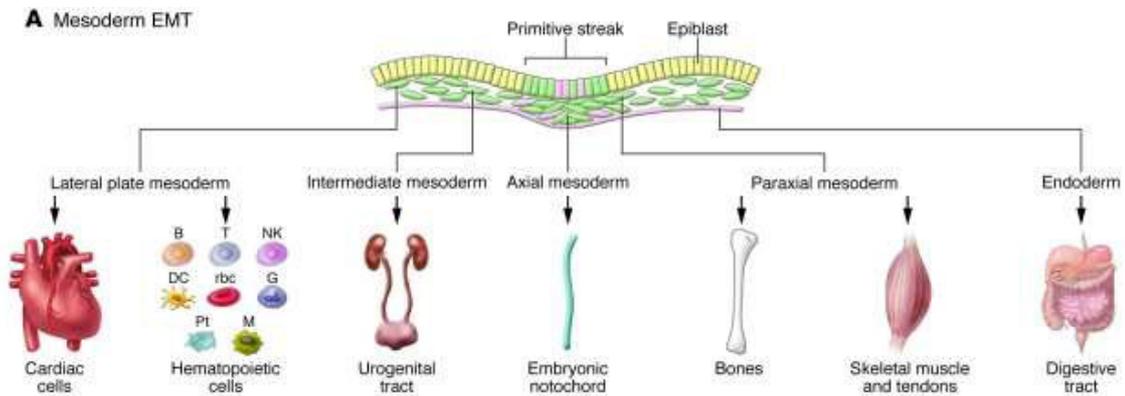


Figure 44 Gastrulation et devenir des cellules : Suite à la gastrulation, les cellules du mésoderme génèrent une multitude de types cellulaires à savoir les cellules cardiaques, les cellules hématopoïétiques, le système reproducteur, les cellules du cordon ombilical, les cellules osseuses et musculaires. Les cellules de l'endoderme formeront le système digestif. Les cellules subissant une EMT sont schématisées en vert (184).

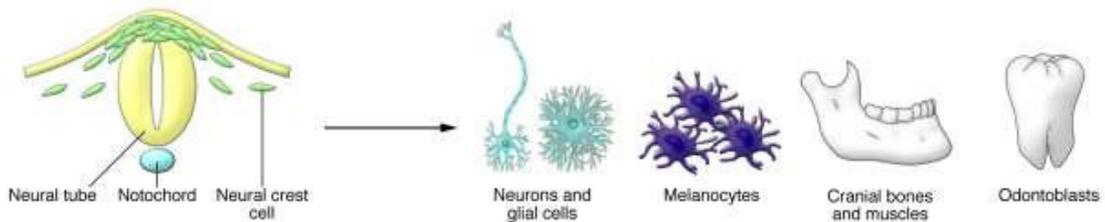


Figure 45 Délamination et devenir des cellules. Après délamination, les cellules migratoires de la crête neurale migrant, prolifèrent et se différencient pour former les neurones et cellules gliales du système nerveux périphérique, les mélanocytes, les odontoblastes. Et autres types cellulaires (184).

Les programmes d'EMT mis en place lors de la gastrulation et de la délamination des cellules de la crête neurale sont sous le contrôle de voies de signalisation similaires, impliquant les molécules de la superfamille du TGF- β , telles que Nodal et les protéines morphogéniques osseuses BMP, les signalisations Wnt et/ou les facteurs de croissance fibroblastiques FGF. Le facteur de transcription Snail est conservé en aval des deux processus d'EMT. Toutefois, si Snail apparaît être un facteur régulateur clé de l'EMT au cours de la gastrulation, le contrôle de l'EMT au cours de la délamination des cellules de la crête neurale est sous le contrôle d'un ensemble de facteurs de transcription (Figure 46).

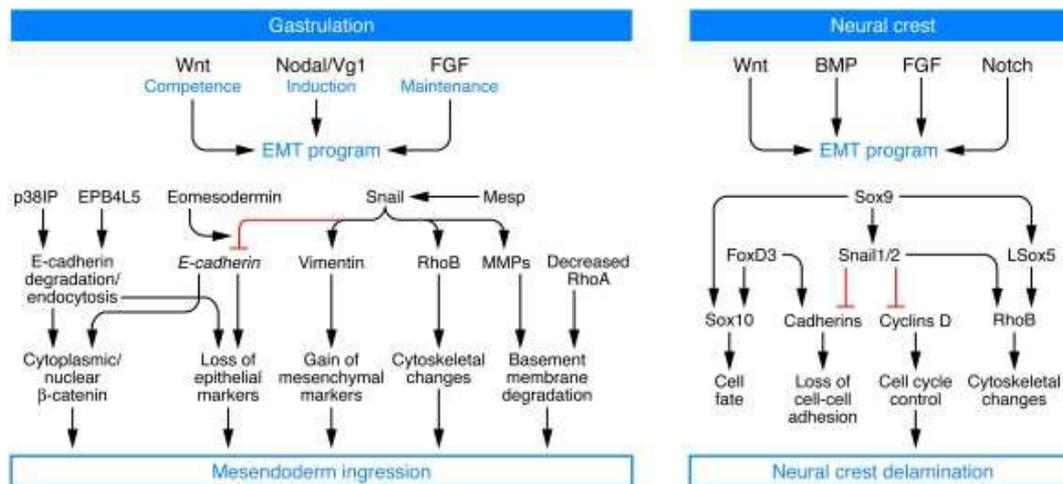


Figure 46 Comparaison des programmes d'EMT mis en place au cours de la gastrulation (à gauche) et de la délamination des cellules de la crête neurale (à droite) (184).

2.3. L'EMT partielle : source d'hétérogénéité phénotypique

L'EMT est souvent associée de manière très réductionniste à la simple transition entre deux états. Le processus d'EMT n'est alors considéré qu'en cas de changements extrêmes de perte d'expression de marqueurs de l'état épithélial comme la E-cadhérine et les cytokératines et le gain d'expression de marqueur de l'état mésenchymateux tels que la N-cadhérine et la vimentine. Cependant, dans la majeure partie des cas, l'EMT génère une multitude de phénotypes dits intermédiaires, fonction du contexte cellulaire incluant l'ensemble des signaux extra-cellulaires (185). Afin de souligner le caractère dynamique du processus d'EMT et la flexibilité des cellules en état d'EMT partielle, les états intermédiaires ont été décrits comme métastables (186). La notion de métastabilité provient du domaine de la thermodynamique pour lequel un état métastable correspond à un état d'équilibre délicat se trouvant en dehors d'un minimum d'énergie. Alors qu'un minimum d'énergie garantit la stabilité, nécessitant un apport d'énergie important afin de changer d'état, tout autre niveau d'énergie suggère une phase de transition vers un état de moindre énergie. Sur ce modèle thermodynamique, le processus d'EMT a été modélisé par trois états stables, l'état épithélial, l'état intermédiaire de maturation et l'état mésenchymateux et deux états métastables (Figure 47). Ainsi, le processus d'EMT est schématisé comme un continuum entre des états plus ou moins stables, avec la perte progressive de propriétés épithéliales et le gain progressif de propriétés mésenchymateuses. L'état d'EMT partielle stable EM2 a été observé au cours du développement embryonnaire, de la réparation tissulaire, ou encore de pathologies comme la fibrose ou la progression tumorale (185). Une étude d'un panel de marqueurs d'EMT de surface sur des tumeurs primaires mammaires et cutanées a

permis d'identifier de multiples populations tumorales plus ou moins avancées dans le processus d'EMT, de la cellule épithéliale pure à la cellule mésenchymateuse, en passant par divers états intermédiaires dits hybrides. L'établissement des cartographies transcriptionnelles et épigénétiques a mis en évidence des réseaux de régulation de gènes, facteurs de transcription et voies de signalisation aboutissant aux différents états hybrides (187).

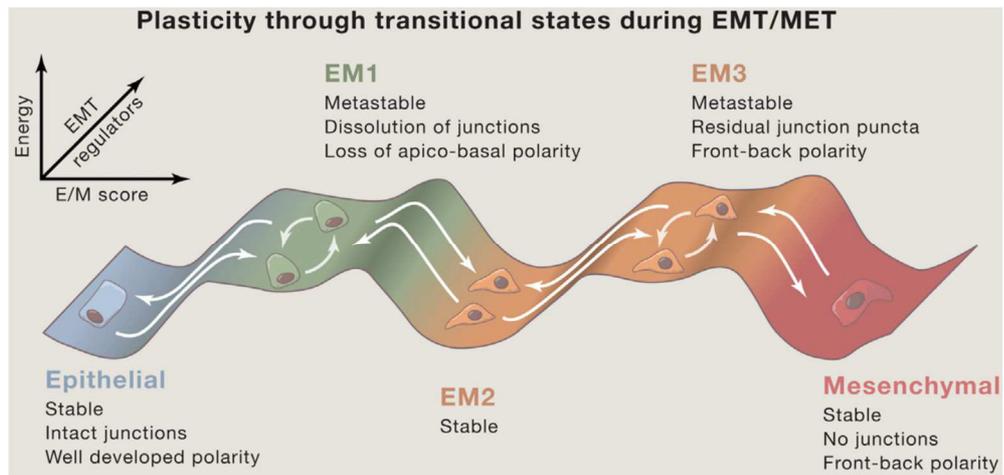


Figure 47 Transition entre les différents états au cours du processus d'EMT (185) : l'EMT est considérée comme un continuum au cours duquel les cellules peuvent présenter un phénotype épithélial (E), intermédiaires (EM) et mésenchymateux (M). Sur l'axe des x, le modèle de transition d'EMT (de gauche à droite) ou de MET (de droite à gauche). L'énergie thermodynamique associée à chaque état est représentée sur l'axe y avec des états stables de faible énergie et des états métastables de plus haute énergie. L'intervention des régulateurs d'EMT lors de la transition est représentée sur l'axe z. Parmi ces régulateurs, nous retrouvons les facteurs de transcriptions liés à l'EMT (SNAI1/2, ZEB, TWIST1, GRHL2 et PRRX1).

2.4. Les voies de signalisation régulant l'EMT

De manière générale, les voies moléculaires régulant l'EMT sont remarquablement conservées dans de nombreuses espèces mais très diverses. L'EMT est finement régulée par le biais de multiples signaux extracellulaires incluant le TGF- β , TNF- α ainsi que les facteurs de croissance EGF, PDGF, HGF, IGF activant des récepteurs à tyrosine kinase. L'effet ou la prévalence d'une signalisation est dépendante du contexte cellulaire dans lequel elle apparaît (188; 189). Toutes les voies de signalisation alors activées convergent vers un réseau de facteurs de transcription appelés EMT-TFs, dont les principaux appartiennent aux familles SNAIL, ZEB et TWIST que je vais décrire dans la partie suivante. La régulation des marqueurs des états épithéliaux tels que la E-cadhérine CDH1 ou mésenchymateux tels que la vimentine en aval des voies de signalisation induisant l'EMT et/ou de la signalisation par les EMT-TFs est très souvent utilisée pour mettre en évidence l'occurrence de l'EMT. De plus, des régulations épigénétiques assurent la dynamique réversible rapide.

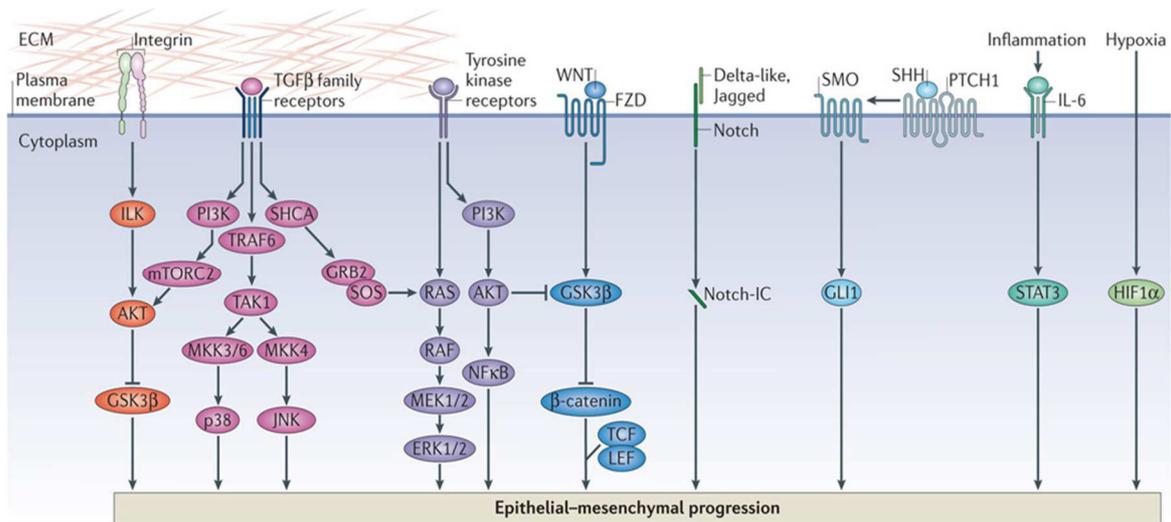


Figure 48 Voies de signalisation inductrices d'EMT (Samy Lamouille, 2014) : L'EMT est finement régulée par le biais de multiples signaux extracellulaires incluant le TGF- β , TNF- α ainsi que les facteurs de croissance EGF, PDGF, HGF, IGF activant des récepteurs à tyrosine kinase. Enfin, le contexte extracellulaire comprenant l'inflammation et l'hypoxie est également connu pour induire l'EMT.

A. VOIE DU TGF- β

La voie de signalisation inductrice d'EMT la mieux caractérisée est sans doute la voie du TGF- β . La voie est activée par la famille de ligands comprenant trois isoformes de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3) et six isoformes de protéines de morphogénèse osseuse (BMP2 à BMP7). Le signal est transmis par un complexe de récepteurs TGF- β R1 et TGF- β R2. Il existe sept récepteurs de type I et cinq récepteurs de type II. Les différentes combinaisons favorisent la liaison avec certains ligands. Une fois activé, TGF- β R2 phosphoryle TGF- β R1 qui permet l'activation et translocation nucléaire de SMAD2/3 en complexe avec SMAD4. La signalisation via BMP est identique à la différence qu'elle est initiée par un récepteur BMP de type II et non TGF- β R2. Elle induit ensuite l'activation des SMAD 1, 5 et 8 au lieu de 2 et 3. Les dimères de STAT activent la transcription des gènes codant pour les EMT-TFs ainsi qu'un ensemble de gènes favorisant la motilité, l'invasion, la croissance cellulaire, la prolifération et le contrôle des voies d'apoptose et de sénescence (190). La signalisation TGF- β peut aussi activer les voies de signalisation PI3K et voie des récepteurs à tyrosine kinase en transphosphorylant le récepteur.

La voie du TGF- β induit également des modifications épigénétiques cruciales pour la régulation des EMT-TFs et marqueurs d'EMT. La signalisation TGF- β s'accompagne notamment de la perte du variant d'histone H2A.Z et le gain d'expression de nouveaux modulateurs de la chromatine tels que UTX, Rad21, PRMT5 et RbBP5 (191). Ces modulations épigénétiques

contrôlent la régulation de gènes impliqués dans l'EMT, comme nous l'évoquerons dans la partie 2.4.c.

B. FACTEURS DE CROISSANCE

En aval des récepteurs à tyrosine kinase, de nombreux facteurs de croissance peuvent initier l'EMT de manière dépendante ou indépendante des EMT-TFs. Les facteurs de croissance activent principalement la voie des MAPKinases. La signalisation Ras induit les facteurs de transcription JUN et FOS ainsi que les EMT-TFs. Ras peut également induire l'EMT par la voie PI3K et/ou en affectant l'activité des petites GTPases Rac et Rho. Rac et Rho régulent les jonctions adhérentes, les adhésions focales, les fibres d'actine et la phosphorylation des myosines favorisant la mobilité et l'invasion. Les facteurs de croissances peuvent également activer la kinase SRC qui permet le réarrangement de l'architecture cellulaire et des adhésions focales par phosphorylation de protéines du cytosquelette et d'adhésions focales.

Le facteur de croissance ressemblant à l'insuline IGF2 a quant à lui été associé à l'expression nucléaire de la β -caténine. En se liant au récepteur Frizzled, les ligands de WNT activent Dishevelled qui s'oppose à la dégradation de la β -caténine. En absence de signalisation, la β -caténine est maintenue dans un complexe APC/axine. Sa phosphorylation par GSK3 β favorise sa dégradation par le protéasome. En présence de ligands WNT, l'inhibition de la dégradation de la β -caténine permet sa stabilisation et translocation dans le noyau. En association avec le facteur de transcription TCF/LEF, elle induit l'expression d'un large panel de gènes dont Snail (185).

C. INFLAMMATION

L'activation du processus d'EMT peut également faire suite à des signaux de stress provenant du microenvironnement tels que l'inflammation ou l'hypoxie. L'induction de l'EMT par des signaux pro-inflammatoires tels que IFN- γ , l'IL-6 et bien sûr le TGF- β (confère partie 2.4.A.) souligne bien les interactions permanentes entre le microenvironnement immunitaire et les cellules cancéreuses. Au cours de ma thèse, je me suis principalement focalisée sur l'impact de la plasticité des cellules tumorales sur le microenvironnement immunitaire (Article 2). Toutefois, il est bien admis aujourd'hui que les populations immunes jouent un rôle majeur dans la plasticité des cellules cancéreuses via les facteurs qu'elles sécrètent (192; 193). Il s'agit donc plutôt d'un échange réciproque entre cellules tumorales et cellules immunes.

D. HYPOXIE

Des concentrations en oxygènes insuffisantes induisent un stress dit hypoxique pour les cellules tumorales. Ce stress induit de nombreux changements métaboliques, épigénétiques et phénotypiques dont la plasticité cellulaire. Le facteur de transcription induit par l'hypoxie HIF1- α est capable d'induire directement l'expression des EMT-TFs TWIST1 et ZEB1 (194). De manière intéressante, l'expression du TGF- β est régulée par HIF-1 et le TGF- β stabilise à son tour HIF-1 (195).

L'EMT peut être activée de manière réversible par la réactivation d'expression des EMT-TFs via des régulations transcriptionnelles, épissages alternatifs ou modifications post-traductionnelles. Très peu de mutations génétiques activent de manière constitutive le programme d'EMT, dont une des propriétés majeures est sa réversibilité (196).

E. REGULATIONS EPIGENETIQUES SUR LE PROMOTEUR DE LA E-CADHERINE

Les premières modifications épigénétiques associées à l'EMT étudiées sont les modifications épigénétiques du promoteur de la E-cadhérine CDH1. La méthylation de l'ADN sur les îlots CpG est un mécanisme rapide de contrôle d'expression transitoire. La méthylation du promoteur de CDH1 a été identifiée comme mécanisme d'induction d'EMT (197). Des modifications d'histone telles que la déacétylation ou des motifs spécifiques de (dé)méthylation permettent également la répression génique. Par exemple, SNAI1 induit des modifications d'histones sur le promoteur de la E-cadhérine en recrutant les histones déacétylases HDAC 1 et HDAC2 (198). De la même manière, ZEB1 en coopération avec la déacétylase Sirtuine1 sur le promoteur de la E-cadhérine, permet la déacétylation de l'histone H3 (199).

F. REGULATIONS PAR LES ARN NON-CODANTS

Les régulations par les petits ARN non-codants ou microARN permettent également une réponse cellulaire rapide et transitoire. Les microARN sont des répresseurs post-transcriptionnels. Ils se présentent sous la forme de petits fragments simple-brin de 21 à 24 nucléotides de long, capables de s'apparier à des ARN messagers portant une séquence homologue. Ainsi, les ARN messagers ciblés sont dégradés ou bien leur traduction est inhibée. Les familles des microARN miR200 et miR34 ont été associées à la répression du programme d'EMT et des EMT-TFs. L'EMT dépendante de SNAIL1 est régulée par la famille miR34 (200). La famille miR200 quant à elle, interagit avec la famille ZEB. Elle est composée de cinq membres : miR-200a, miR-200b, miR-429, miR-200c et miR-141. La boucle de rétrocontrôle entre les familles des miR-200 et ZEB contrôle

finement l'EMT ainsi que la MET (201). Les protéines ZEB peuvent réguler négativement la transcription des miR-200 en se fixant sur les E-Boxes présentes dans leur promoteur (202). Enfin, les protéines ZEB entrent en compétition avec le micro-ARN miR-200 sur le promoteur de la E-cadhérine, inhibant sa transcription. Je reviendrai dans la suite de ce chapitre sur le rôle de la boucle de rétro-contrôle entre la famille ZEB et les miR-200.

G. EPISSAGES ALTERNATIFS

L'EMT peut aussi être régulée par des mécanismes post-transcriptionnels tels que l'épissage alternatif des pré-ARN messager. Les protéines régulatrices de l'épissage alternatif des cellules épithéliales ESRP1 et ESRP2 ont été identifiées comme régulatrices post-transcriptionnelles permettant le switch d'épissage alternatif au cours de l'EMT. Le réseau d'épissage régulé par les ESRP est vaste avec plus de deux cents épissages alternatifs parmi des gènes liés aux fonctions d'adhésion cellulaire, de polarité et de migration (203). Un exemple concret est l'épissage alternatif du gène de la δ -caténine 1 CTNND1, qui dans un contexte de cellule épithéliale, aboutit à une isoforme courte et une protéine favorisant la stabilisation de la E-cadhérine à la membrane plasmide. A l'inverse, au cours de l'EMT ou dans un contexte mésenchymateux, l'isoforme de CTNND1 est plus longue. La protéine ainsi produite interagit avec RHOA et atténue son activité, favorisant ainsi l'invasion (204). Cet exemple montre que les différents épissages alternatifs sont à la fois une conséquence et une potentielle voie d'amplification du programme d'EMT. La régulation négative des ESRP par les facteurs de transcription SNAIL1 et ZEB1, ZEB2 a été démontrée dans deux études à partir de cellules épithéliales mammaires (205; 206). A l'inverse des protéines ESRP, RBFOX est impliqué dans l'épissage alternatif favorisant l'EMT. Dans un modèle mammaire de cellules épithéliales dédifférenciées, la délétion de RBFOX2 induit un phénotype épithélial (207).

H. REGULATIONS DE LA TRADUCTION ET MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

Enfin, le processus d'EMT peut-être contrôlé soit par régulation directe de la traduction, soit par modifications post-traductionnelles des acteurs de l'EMT. Les modifications post-traductionnelles induisent un ou plusieurs changement(s) de la fonction de la protéine considérée, que ce soit au niveau de son action, de sa demi-vie, ou de sa localisation cellulaire.

H.1 REGULATIONS DE LA TRADUCTION : YB1

Les niveaux protéiques peuvent être directement régulés en favorisant ou bloquant la traduction des ARN messagers. La protéine se liant aux Y-Box 1 YB1 est une protéine capable de se lier aux ARN messagers réprimant la traduction de transcrits favorisant la croissance cellulaire tout en activant la traduction de protéines associées à l'EMT (208).

H.2 REGULATIONS PAR DEGRADATION DES EMT-TFS

La dégradation protéique est une autre façon de contrôler la demi-vie des protéines. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle dont la fonction principale est la reconnaissance puis la destruction de la protéine ciblée par le protéasome. Les EMT-TFs SNAI1, SNAI2, TWIST1 et ZEB2 sont notamment ciblés pour dégradation par l'E3 ubiquitine ligase PPA (209). A l'inverse, SNAI1 est stabilisé par phosphorylation spécifique par la kinase associée à l'activation de p21 PAK1 (210).

H.3 REGULATIONS DE LA LOCALISATION

La localisation nucléaire des EMT-TFs est indispensable à leur activité. Aussi, toute modification post-traductionnelle empêchant ou stabilisant la localisation nucléaire a un impact sur le processus d'EMT. La protéine kinase PRKD1, en phosphorylant SNAI1, favorise la liaison de complexes spécifiques du statut épithélial, transportant SNAI1 en dehors du noyau (211). De manière similaire, la localisation cellulaire de ZEB1 est sous le contrôle de multiples modifications post-traductionnelles.

H.4 REGULATION DE LA FONCTION DES EMT-TFS

Enfin, des modifications post-traductionnelles de type SUMOylation modifient l'activité protéique. La SUMOylation des facteurs de transcription ZEB empêche le recrutement du co-represseur transcriptionnel CTBP. Plus particulièrement, la SUMOylation de ZEB2 atténue la répression transcriptionnelle de la E-cadhérine (212).

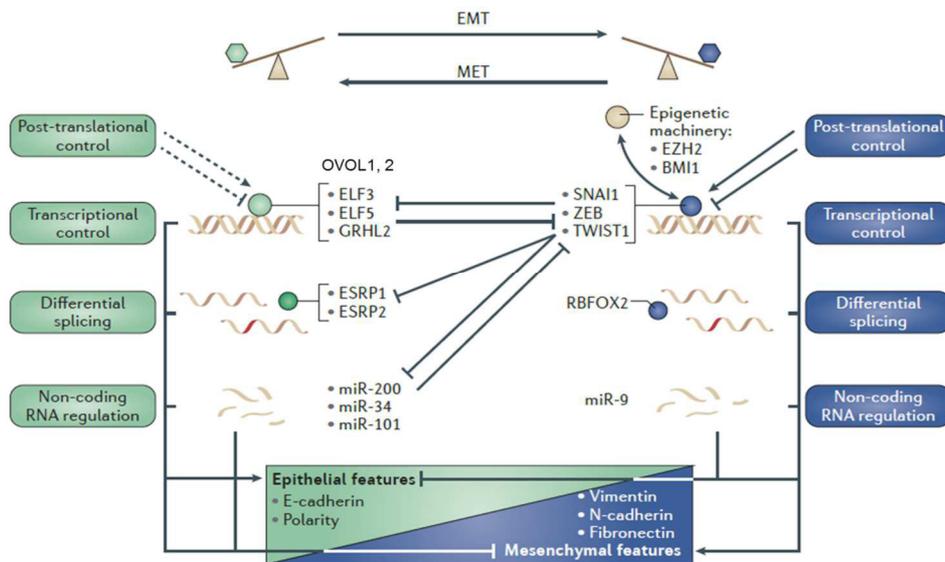


Figure 49 Réseaux de contrôle de l'EMT. Le réseau le mieux caractérisé fait intervenir les EMT-TFs tels que SNAI1, ZEB et TWIST1. En coopération avec la machinerie épigénétique, les EMT-TFs répriment les caractéristiques épithéliales. Les facteurs de transcriptions spécifiques de l'état épithélial sont beaucoup moins renseignés. De nombreux ARN non-codant semblent être les garants du statut épithélial. Ces micro-ARN, notamment miR-200, miR-34 et miR-101, forment un autre réseau de régulation du programme EMT. Des boucles de rétrocontrôle avec les EMT-TFs favorisent la réversibilité du processus. Des variants spécifiques des états épithéliaux et mésenchymateux résultent de différents épissages alternatifs, constituant ainsi un troisième niveau de régulation de l'EMT. Enfin, les protéines impliquées dans les différents réseaux de régulation sont encore régulées après traduction. Ces régulations peuvent soit favoriser l'activité protéique ou bien la dégradation de la protéine. Aujourd'hui, si la régulation transcriptionnelle des EMT-TFs est bien démontrée, des études plus approfondies afin de déterminer si la régulation post-traductionnelle des facteurs de transcription du statut épithélial est pertinente dans le processus d'EMT (flèches en pointillés). ELF3, E74-like factor 3; ESRP1, epithelial splicing regulatory protein 1; GRHL2, Grainyhead-like 2; MET, mesenchymal to epithelial transition; RBOX2, RNA binding protein FOX1 homologue 2. (196)

3. Présentation des principaux EMT-TFs

L'expression des EMT-TFs a longtemps été considérée comme étant restreinte aux étapes du développement embryonnaire et absente à l'âge adulte, excepté dans certains types cellulaires tels que les fibroblastes. L'expression des EMT-TFs est ainsi latente, notamment dans les cellules épithéliales, où elle peut être réactivée par des signaux similaires à ceux mis en jeu au cours du développement embryonnaire. De plus, il est apparu au fil des années, que l'expression des EMT-TFs est maintenue dans un certain nombre de types cellulaires autres que les fibroblastes, que ce soit des cellules différenciées, notamment les mélanocytes, certaines populations immunes, les cellules endothéliales, mais aussi certains types de cellules souches, comme mis en évidence par l'équipe d'Alain Puisieux dans les cellules souches mammaires normales.

Les EMT-TFs sont couramment divisés en deux catégories : les régulateurs directs ou indirects de la E-cadhérine (Figure 50). Suite à la première observation de l'interaction directe de SNAI1 avec le promoteur de la E-cadhérine, d'autres répresseurs directs de la E-cadhérine ont été identifiés, à savoir SNAI2, ZEB1, ZEB2, E47, KLF8 (Krüppel-like factor 8) et Brachyury 31. En plus de réprimer la E-cadhérine, ces facteurs répriment un ensemble de gènes impliqués dans les jonctions cellulaires, favorisant l'EMT (196). Il est important de noter que les EMT-TFs agissent au sein de réseaux de régulation complexes dans lesquels ils s'activent et se répriment les uns les autres.

| <i>Transcription factors: direct binding to the CDH1</i> | | <i>Other transcription factors associated with EMT</i> | |
|--|--|--|---------------------------|
| SNAI1 | Zinc-finger protein, transcriptional repressor and cellular reprogramming | TWIST1 | bHLH factor |
| SNAI2 | Zinc-finger protein, transcriptional repressor and cellular reprogramming | FOXC2 | Transcriptional activator |
| ZEB1 | Zinc-finger E-box binding homeobox protein, transcriptional repressor and cellular reprogramming | Goosecoid | Homeobox protein |
| ZEB2 | Zinc-finger E-box binding homeobox protein, transcriptional repressor and cellular reprogramming | E2-2 | Class I bHLH factor |
| E47 | Class I basic helix-loop-helix (bHLH) factor | SIX1 | Homeobox protein |
| KLF8 | Zinc-finger protein, transcriptional repressor and activator | PRRX1 | Homeobox protein |
| Brachyury | Transcriptional activator | | |

Figure 50 Classification des EMT-TFs en répresseur directs de la E-cadhérine (à gauche) et indirects (à droite) (196)

Aussi, les cibles des EMT-TFs ne sont pas restreintes à la E-cadhérine, et dépendent sans doute également du type cellulaire et de l'état de différenciation de la cellule. Bien qu'initialement identifiés comme répresseurs transcriptionnels, il est important de préciser que les EMT-TFs peuvent également agir comme activateurs de la transcription. De plus, le réseau d'EMT-TFs agit en coopération avec les régulateurs épigénétiques. Les EMT-TFs peuvent ainsi coopérer avec la méthyltransférase DNMT1 pour ajouter des méthylations répressives sur le promoteur de la E-cadhérine ou autre. Les EMT-TFs peuvent également favoriser ou orienter l'activité de modificateurs d'histones tels que les histones déacétylase HDAC ou déméthylase LSD1 afin de réprimer la transcription (213).

Dans cette partie, je souhaite présenter les principales familles d'EMT-TFs à savoir les familles SNAI, TWIST et ZEB. Au cours de ma thèse, je me suis principalement focalisée sur le rôle de ZEB1. Aussi, j'ai fait le choix de particulièrement détailler les EMT-TFs ZEB1 et ZEB2 et d'être plus brève sur les autres.

3.1. Les protéines à doigts de zinc et homéo-domaine de la famille ZEB

De manière intéressante, le facteur de transcription ZEB1 a été identifié pour la première fois en 1991 en tant que régulateur transcriptionnel de l'interleukine 2 dans les lymphocytes T humain. ZEB1 était alors nommé protéine inhibitrice de l'IL-2 (NIL2A) (214). Indépendamment, une autre équipe étudiait la régulation du gène delta-cristallin dans le poulet. Comme ils trouvèrent une séquence promotrice 'enhancer' dans le troisième intron du gène responsable d'un motif d'expression spécifique des cellules du cristallin, le gène fût rebaptisé delta-cristallin enhancer factor (deltaEF1) (215). AREB6, ZEB et BZP, maintenant connus sous le nom de ZEB1, ont été identifiés comme facteur de transcription dans différentes études indépendantes dans différents types cellulaires (216). Le répresseur transcriptionnel ZEB a par exemple été identifié comme régulateur de la chaîne lourde immunoglobuline, impliquée dans la spécificité des lymphocytes B (217).

De son côté, ZEB2 a été identifié pour la première fois lors d'une étude chez l'amphibien *Xenopus* comme facteur de transcription pouvant lier le domaine MH2 de Smad1. Le répresseur transcriptionnel alors identifié fût nommé protéine interagissant avec Smad (SIP1) ou ZEB2 pour sa forte homologie avec ZEB1 (218).

La famille des facteurs de transcription aux homéo-domaines à doigts de zinc ZEB comporte deux protéines homologues ZEB1 et ZEB2 (Figure 51). Les protéines ZEB possèdent un homéo-domaine central qui ne peut se lier à l'ADN. Cet homéo-domaine « POU-like » est principalement impliqué dans des interactions protéines/protéines. ZEB1 et ZEB2 se lient sur des séquences CACCT(G) de l'ADN appelées E-box grâce à leurs domaines en doigts de zinc. ZEB1 et ZEB2 ont chacun deux zones riches en doigts de zinc bien séparées. La zone localisée en partie N-terminale (NZF) contient quatre domaines à doigts de zinc et la zone en C-terminale (CZF) en contient trois. Alors que les séquences en dehors des zones NZF et CZF diffèrent, il existe une forte similarité entre les séquences NZF et CZF des protéines ZEB1 et ZEB2, avec respectivement 88 pourcent et

93 pourcent de similitudes. Grâce au domaine d'interaction avec le co-répresseur CtBP (CID), ZEB1 et ZEB2 sont capable de s'associer à CtBP afin de réprimer la transcription. Le seul domaine CID de ZEB2 est même capable de réprimer la transcription de la E-cadhérine en coopération avec CtBP. ZEB1 et ZEB2 peuvent aussi interagir avec les SMAD impliqués dans la signalisation TGF- β via les domaines d'interaction SBD. ZEB1 a la particularité de pouvoir interagir avec des co-activateurs transcriptionnels P300 et P/CAF. ZEB1 a également été décrit comme coactivateur de la voie Hippo médiée par YAP. YAP et ZEB1 colocalisent dans le noyau. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que ZEB1 et YAP se lient aux promoteurs de CTGF, CYR61, SDPR et AXL sur des motifs différents des E-box, sites de liaison de ZEB1. Alors que YAP ne possède pas de site de liaison à l'ADN, le complexe ZEB1/YAP se lie au facteur de transcription TEAD afin de lancer son programme transcriptionnel (219) (Figure 52). Les facteurs de transcription ZEB peuvent enfin être sumoylés (SUMO), ce qui affecte leur activité de régulateurs transcriptionnels. Les modifications post-translationnelles telles que la sumoylation et la phosphorylation pourraient favoriser les interactions protéine/protéine et orienter le recrutement d'un coactivateur ou corépresseur transcriptionnel (220). Au final, bien que ZEB1 et ZEB2 aient une structure très similaire, la présence de domaines d'interactions spécifiques donne la possibilité d'activités transcriptionnelles distinctes, voire antagonistes.

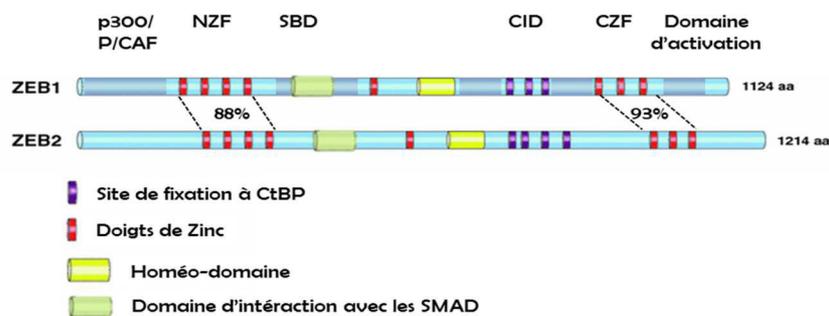


Figure 51 Représentation des facteurs de transcriptions ZEB1 (en haut) et ZEB2 (en bas). La famille des facteurs de transcription ZEB est caractérisée par la présence de deux zones riches en domaines à doigts de zinc à chaque extrémité (NZF et CZF) et un homéo-domaine central (HD). ZEB1 et ZEB2 peuvent interagir avec les SMAD et CtBP via les domaines d'interaction respectifs SBD et CID. ZEB1 a la particularité de pouvoir interagir avec des co-activateurs transcriptionnels P300 et P/CAF. Les protéines ZEB peuvent enfin être sumoylés (SUMO), ce qui affecte leur activité de régulateurs transcriptionnels Adapté de (220).

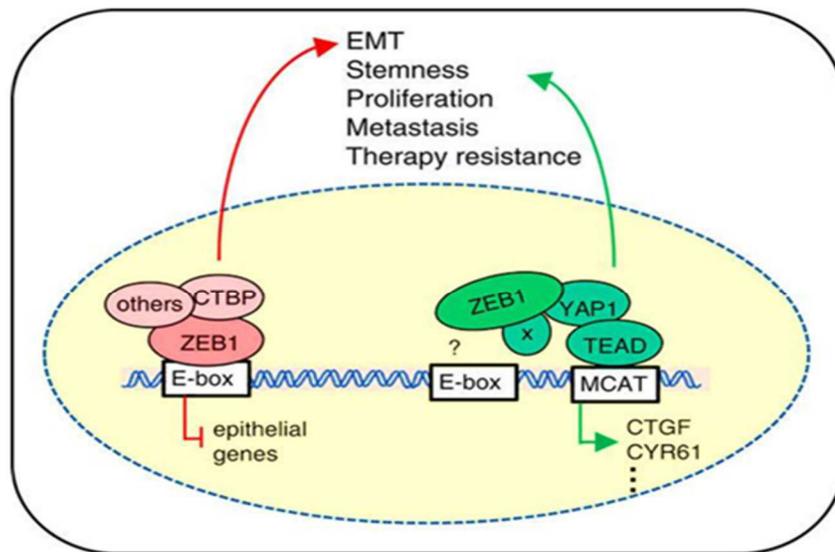


Figure 52 Exemples de mécanismes d'action du facteur de transcription ZEB1. Zeb1 peut agir comme répresseur transcriptionnel en se liant avec des corépresseurs sur les promoteurs de gènes à réprimer via les E-Box (à gauche en rouge). Zeb1 Peut également agir en tant que coactivateur du complexe YAP1/TEAD (à droite en vert) (Waltraut Lehmann, 2016).

Les phénotypes des souris KO pour les facteurs de transcription diffèrent également. Le KO de *Zeb2* chez la souris est létal au stade E9.5. Les embryons de souris présentent un défaut de fermeture du tube neural, une absence d'ectoderme et un retard de croissance (221). Le KO de *Zeb1* induit quant à lui la mort des animaux à la naissance en raison d'une déficience respiratoire sévère. Les souris présentent également des malformations osseuses. De plus, elles présentent un système immunitaire défaillant avec une déficience en lymphocytes T (222). Alors que *Zeb1* est exprimé au cours du développement du système nerveux central, le KO de *Zeb1* n'induit pas de déficience majeure sur le système nerveux, suggérant un rôle compensatoire du facteur de transcription *Zeb2* lors de la perte de *Zeb1* dans les tissus nerveux. De manière intéressante, les souris hétérozygotes *Zeb2*^{+/-} se développent jusqu'au terme mais meurent à la naissance en raison d'une déficience respiratoire sévère similaire aux souris *Zeb1*^{-/-}. Enfin, le phénotype *Zeb2*^{+/-} *Zeb1*^{-/-} est létal au stade E13.5 suggérant un effet additif des facteurs de transcription ZEB1 et ZEB2 (223).

Chez l'homme, des mutations de ZEB1 et ZEB2 ont également été décrites et associées à des malformations. Des mutations hétérozygotes de ZEB2 ont été associées à la maladie de Hirschsprung. La maladie de Hirschsprung est une maladie congénitale affectant le tube digestif. Elle est la conséquence d'un défaut de développement du système nerveux dans la paroi du

segment terminal de l'intestin. Des mutations non-sens de ZEB1 sont retrouvées chez plus de la moitié des patients atteints de dystrophie de la cornée (220).

L'expression de ZEB1 et ZEB2 ne se limite pas aux cellules mésenchymateuses, puisqu'elle a été décrite dans différentes populations immunes (T, B, NK, ...), les cellules endothéliales, certains neurones. Je tiens à souligner que l'expression de ZEB1 par différents types cellulaires dans le microenvironnement tumoral, incluant non seulement les cellules stromales mais aussi les cellules immunes, a été une problématique majeure au cœur de mes travaux de thèse.

A. FONCTIONS NON REDONDANTES DE ZEB1 ET ZEB2 AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Les fonctions antagonistes de ZEB1 et ZEB2 sont encore très peu décrites. Un argument en faveur des fonctions spécifiques à chaque EMT-TF est leur profil d'expression au cours du développement embryonnaire. Au stade embryonnaire E8.5 et E14.5 par exemple, les expressions de ZEB1 et ZEB2 sont largement mutuellement exclusives (Figure 53).

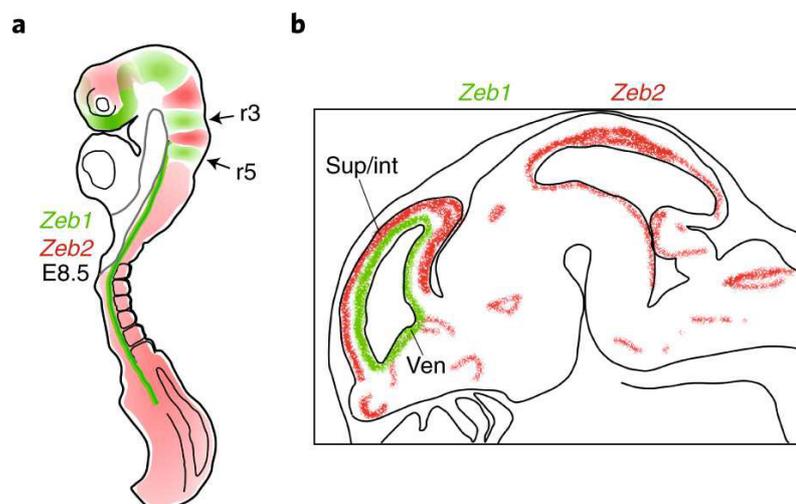


Figure 53 a. Représentation schématique des expressions de ZEB1 et ZEB2 au stade embryonnaire E8.5. ZEB1 est principalement exprimé dans le prosencéphale ventral, rhombencéphales 3 et 5, dans le notochorde et l'endoderme. ZEB2 quant à lui est exprimé dans le prosencéphale dorsal, le tube neural à l'exception des rhombencéphales 3 et 5 et dans le mésoderme paraxial. B. Représentation schématique de l'expression de ZEB1 et ZEB2 au cours du développement du cerveau au stade E14.5. L'expression de ZEB1 est restreinte aux zones ventriculaires et sous-ventriculaires du prosencéphale alors que ZEB2 est exprimé dans le stratum superficiel et intermédiaire (224).

B. FONCTIONS OPPOSEES DE ZEB1 ET ZEB2 DANS LA REGULATION DE LA VOIE DU TGF-B

Une des premières études démontrant le rôle antagoniste de ZEB1 et ZEB2 date de 2003. Postigo a alors étudié les rôles des deux homologues de la famille ZEB dans la régulation de la

voie du TGF- β . Alors que ZEB1 synergise avec les SMAD pour activer la signalisation TGF- β /BMP, ZEB2 joue le rôle de répresseur en recrutant CtBP (225).

C. FONCTIONS DE ZEB1 ET ZEB2 DANS LE CONTROLE DE LA DIFFERENCIATION DES T CD8 EFFECTEURS

L'expression en miroir des homologues de la famille ZEB dans les lymphocytes T CD8 effecteurs a soulevé la question de la coopération/redondance des fonctions des facteurs de transcription ZEB1 et ZEB2 ou de fonctions spécifiques. Les expressions variables de ZEB1 et ZEB2 au cours de la réponse immune permettent de définir l'état de différenciation des lymphocytes T CD8. Alors que ZEB2 favorise le phénotype de lymphocytes T cytotoxiques très différencié, ZEB1 est indispensable à la maintenance des T CD8 mémoires (226).

D. ROLES DE ZEB1 ET ZEB2 DANS LE LIGNAGE NK

L'équipe de Thierry Walzer s'intéresse tout particulièrement aux rôles distincts de ZEB1 et ZEB2 dans le développement des cellules NK. Aussi, il a pu être démontré que ZEB2, en coopération avec T-bet, est essentiel à la maturation et activité des cellules NK (227). Récemment, le rôle clé de ZEB1 dans le développement des lymphocytes NKT invariant a été révélé. ZEB1 favorise la survie des thymocytes doubles positifs CD4+CD8+ et doubles négatifs CD8-CD4- en réprimant la signalisation TCR (228).

E. ROLES DE ZEB1 ET ZEB2 DANS LE LIGNAGE MYELOÏDE

Les facteurs de transcription ZEB régulent un réseau transcriptionnel orientant la différenciation, maintenance et fonction des cellules myéloïdes. En 2012, le consortium ImmGen observait pour la première fois l'expression restreinte de ZEB2 aux cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDCs) et conventionnelles cDC2 mais pas cDC1. Tout comme pour les macrophages et monocytes, ZEB2 est nécessaire à la survie et au développement des pDCs. Le rôle de ZEB2 dans les cellules conventionnelles cDC2 n'est pas élucidé étant donné le faible impact de la délétion de ZEB2 sur le nombre de cDC2 chez la souris. De son côté, ZEB1 impacte le sécrétome des cDC1 (229).

F. ROLES DE ZEB1 ET ZEB2 DANS LE LIGNAGE MELANOCYTAIRE ET LA MELANOMAGENESE

Le lignage mélanocytaire est aussi une belle illustration d'expression en miroir des facteurs de transcription de la famille ZEB ainsi que de leurs fonctions spécifiques pour la mise en place et le maintien du lignage mélanocytaire et le développement de mélanome. Je m'arrêterai plus en détail sur l'expression des EMT-TFs dans les mélanocytes et cellules de mélanomes dans la dernière partie (partie 5).

3.2. La famille SNAIL

Snail est le premier facteur de transcription inducteur d'EMT découvert et sans doute un des plus importants répresseurs de la E-cadhérine. Snail a été décrit pour la première fois chez la drosophile, où il apparaît être essentiel pour la formation du mésoderme et de la crête neurale (230; 231). Suite à cette découverte, de nombreux homologues de Snail ont été mis en évidence dans d'autres espèces aussi bien chez les invertébrés que les vertébrés. Chez les vertébrés, trois facteurs de transcription membres de la famille Snail ont été identifiés : Snail1 (Snail), Snail2 (Slug) et Snail3 (Smuc).

Les membres de la famille SNAIL sont également des facteurs de transcription à doigts de zinc. La région C terminale, très conservée, contient quatre à six doigts de zinc qui permettent la liaison à l'ADN sur les motifs E-Box. SNAIL et SLUG peuvent donc agir en compétition ou en soutien des facteurs de transcription de la famille ZEB. SNAIL et SLUG sont tous deux des répresseurs transcriptionnels via le domaine d'interaction protéines-protéines commun Snag. SLUG possède en plus un domaine qui lui est propre qui permet notamment le recrutement du corépresseur CtBP (Figure 54).



Figure 54 Représentation des facteurs de transcriptions SNAIL (en haut) et SLUG (en bas). La famille des facteurs de transcription SNAIL est caractérisée par la présence de d'une zone riche en domaines à doigts de zinc à l'extrémité C terminale. SNAIL et SLUG peuvent interagir via le domaine d'interaction commun SNAG. SLUG possède un domaine d'interaction supplémentaire portant son nom (232)

Les deux membres de la famille des SNAIL ont un rôle prépondérant dans l'embryogenèse, notamment au cours de la gastrulation et formation de la crête neurale. Ils coordonnent non

seulement les changements morphologiques, les mouvements cellulaires pendant la gastrulation mais aussi le devenir des cellules en orientant la différenciation.

Tout comme les EMT-TFs ZEB, SNAIL est principalement exprimé de manière transitoire au cours du développement puis réactivé dans les cellules épithéliales néoplastiques. L'expression de Snail par d'autres types cellulaires tels que les cellules souches mammaires (233) ou les macrophages a récemment été observée (234; 235).

Chez la souris, l'inactivation de *Snail1* est létale au stade de la gastrulation pour l'embryon qui ne parvient pas à former le mésoderme.

La perte homozygote de *Snail2* est quant à elle viable. *Snail2* intervient moins précocement que *Snail1* au cours du développement embryonnaire. Cependant, *Snail2* étant essentiel au développement des cellules hématopoïétiques, cellules germinales et mélanoblastes, la perte homozygote de *Snail2* entraîne de l'anémie, des problèmes de fertilité et des défauts de pigmentation comparables à ceux observés chez les patients atteints du syndrome de Waardenburg (236).

3.3. Les bHLH TWIST

Le gène *Twist* a été découvert chez la drosophile où son absence induit un phénotype « vrillé » des embryons (237). TWIST apparaît être essentiel pour la gastrulation, la polarité dorso-ventrale ainsi que la différenciation du mésoderme et la formation des muscles.

Les facteurs de transcription TWIST1 et TWIST2 appartiennent à la famille des facteurs de transcription à motif basique hélice-boucle-hélice qui permettent à la fois leur dimérisation et liaison à l'ADN. En effet, TWIST1 et TWIST2 se lient sur les motifs E-box de l'ADN sous forme de dimères. TWIST1 et TWIST2 hétérodimérisent avec les protéines bHLH de classe I ubiquitaires nommées protéines E, incluant les protéines E12, E47, TCF4 et TCF12 (238).

La partie à l'extrémité C-terminale appelée « TWIST box » est fortement impliquée dans l'activité transcriptionnelle activatrice ou inhibitrice de la famille TWIST (Figure 55). La régulation de la transcription dépend de plusieurs facteurs incluant le choix du partenaire de dimérisation, les modifications post-traductionnelles, ainsi que le recrutement de coactivateurs ou corépresseurs. Ainsi, les protéines TWIST peuvent à la fois inhiber la E-cadhérine et activer la N-cadhérine par exemple.



Figure 55 Représentation des facteurs de transcriptions TWIST1 (en haut) et TWIST2 (en bas). La famille des facteurs de transcription TWIST est caractérisée par les domaines basiques et hélice-boucle-hélice (HLH). La TWIST box permet le recrutement de corégulateurs transcriptionnels (232)

Tout comme les EMT-TFs des familles ZEB et SNAIL, les membres de la famille TWIST sont exprimés de manière variable au cours du développement embryonnaire. A l'âge adulte, les gènes TWIST restent exprimés dans de nombreux tissus glandulaires, tubulaires ou épithéliaux dont les cellules gastriques principales, l'épithélium de la prostate, les hépatocytes, les tubes séminifères, la granulosa des follicules ovariens, les tubules rénaux collecteurs et sécrétoires, les glandes utérines, la corticosurrénale, les bronchioles ainsi que les alvéoles pulmonaires. Les membres de la famille TWIST sont également exprimés par les cellules immunes. Il a notamment été montré que TWIST1 et TWIST2 interagissent avec la sous-unité NF- κ B p65 (Rel-A) pour inhiber l'activation de la voie (239).

Les délétions des gènes *Twist1* ou *Twist2* chez la souris sont toutes deux létales, mettant ainsi en évidence le rôle majeur de ces deux gènes au cours du développement (240; 241). L'inactivation homozygote de *Twist* est létale après 11,5 jours de développement avec une exencéphalie sévère.

L'état hétérozygote est viable mais accompagné d'un ensemble d'anomalies osseuses cranio-faciales et des membres, et de polydactylie. La perte hétérozygote de *TWIST* est associée au syndrome de Saethre-Chotzen entraînant une déformation du visage due à une soudure latérale précoce des structures coronales, un ptosis et des malformations de l'oreille (241).

4. Fonctions oncogéniques des EMT-TFs dans les carcinomes

L'expression aberrante des EMT-TFs a été décrite dans un grand nombre de cancers, incluant entre autres les carcinomes mammaires, pulmonaires, colorectaux pancréatiques, cutanés et les mélanomes. L'essentiel des fonctions des EMT-TFs ont été décrites dans les carcinomes, apportant des informations majeures, potentiellement généralisables aux autres cancers, même si des spécificités sont observées en fonction du type cellulaire d'origine, notamment pour les cancers dérivés de la crête neurale comme le mélanome (confère partie 5).

4.1. EMT et dissémination métastatique

Si l'implication de l'EMT dans la tumorigenèse a été envisagée pour la première fois dans les années 80s, le rôle oncogénique de l'EMT *in vivo* a longtemps été sujet de controverse. En effet, le processus d'EMT étant transitoire, il est difficile de l'observer. Etant donné son rôle majeur dans la mobilité cellulaire au cours du développement, l'EMT était premièrement soupçonnée de jouer un rôle dans la dissémination métastatique. Cependant, les capacités mésenchymateuses nécessaires à la métastase, telles que la dissociation cellulaire, la migration, la dissémination et l'invasion ont longtemps été associées à une succession d'altérations génétiques secondaires (242).

Les premières preuves de l'implication de l'EMT dans la carcinogénèse sont arrivées au cours des années 2000 grâce notamment à une étude de l'équipe d'Angela Nieto sur l'EMT-TF SNAIL1. L'expression ectopique de *SNAIL1* dans des cellules épithéliales saines, plus précisément des kératinocytes, et des lignées tumorales incluant des cellules de carcinome du colon, d'adénocarcinome mammaire, de carcinome de la vessie ainsi que la lignée de mélanome A375P était corrélée à une diminution de la E-cadhérine et plus généralement l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux. De plus, pour les cellules cancéreuses, la surexpression de ZEB1 augmentait le potentiel invasif (243).

Un an plus tard, Thomas Brabletz décrivait des cellules à morphologie fibroblastique sur le front invasif de carcinomes colorectaux (244). De plus, ces cellules avaient perdu l'expression de la E-cadhérine au profit de la N-cadhérine. Ainsi, des caractéristiques de l'occurrence du programme d'EMT étaient retrouvées sur le front invasif de tumeurs, aussi bien primaires que métastatiques.

En 2004, le laboratoire de Robert Weinberg démontre l'implication de TWIST1 dans la formation de métastases. Dans un modèle murin de carcinome mammaire hautement métastatique, la déplétion de *Twist1* par ARN interférence empêche la formation de métastase au poumon. A l'inverse, l'expression ectopique de *Twist1* induit la perte de la E-cadhérine, l'activation de marqueurs mésenchymateux et la dissémination métastatique (245).

La relevance de l'EMT dans le cancer du sein a été démontrée *in vivo* en 2008 grâce à la génération de souris transgéniques exprimant l'oncogène *c-Myc* et le traceur cellulaire lacZ spécifiquement et de manière inductible dans les cellules épithéliales mammaires. Après induction de l'oncogène, la présence de cellules mésenchymateuses positives pour lacZ était la preuve de l'occurrence du processus d'EMT *in vivo* à partir de cellules épithéliales (246).

Le rôle de la boucle de rétrocontrôle ZEB/miR-200 sur le contrôle de la dissémination métastatique a été étudié dans un modèle murin d'adénocarcinome du poumon *Kras^{G12D}p53^{R172HΔG}*. L'analyse différentielle d'expression entre les tumeurs formant des métastases ou non identifie les membres de la famille miR-200. L'expression ectopique de miR-200b dans les tumeurs initialement capables de former des métastases anéantit leurs capacités d'entrer en EMT, d'invasion et de métastases (247). Dans un modèle murin d'adénocarcinome canalaire pancréatique *Kras/p53* muté (KPC), la délétion du facteur de transcription *Zeb1* supprime les capacités d'invasion et de formation de métastases (248). Dans le même modèle, la déplétion des EMT-TFs *Snai1* et *Twist1* s'était avérée inefficace sur l'altération des capacités invasives et métastatiques des tumeurs primaires suggérant un rôle spécifique de *Zeb1* dans ce modèle (249).

Enfin, si l'EMT est nécessaire pour la dissémination, la transition inverse MET est indispensable à la colonisation métastatique. L'analyse de l'expression de TWIST sur presque cent carcinomes métastatique a montré une diminution de l'expression de TWIST1 dans les métastases ganglionnaires en comparaison à la tumeur primaire. L'impact de l'EMT-TF a été étudié rigoureusement dans un modèle de carcinome cutané où l'expression de *Twist1* peut-être induite grâce au transgène *TetOP-Twist1* sous le contrôle du promoteur de la kératine 5 *K5*. Ainsi, sous traitement à la doxycycline, les cellules de la couche épidermique basale expriment *Twist1*. L'expression de *Twist1* n'étant pas suffisante à la formation de tumeur, l'induction de carcinomes est induite par traitements DMBA/TPA. Une fois les tumeurs formées, *Twist1* est soit induit dans

les cellules K5 de la tumeur primaire par application locale de la doxycycline, soit dans toutes les cellules tumorales incluant les cellules ayant disséminé par traitement à la doxycycline dans l'eau de boisson. Le maintien de l'expression de *Twist1* dans le deuxième groupe réduit drastiquement la formation de métastases démontrant l'importance du caractère réversible de l'EMT dans la formation de métastases (250). Dans un autre modèle murin, la perte de l'inducteur d'EMT *Prrx1* a été démontrée nécessaire à la formation de métastases après injection dans la queue de souris immunodéprimées de cellules cancéreuses (251). Finalement, c'est la succession réversible de cycles d'EMT et de MET et non pas la seule induction d'un phénotype mésenchymateux qui permet l'invasion et la formation de métastase, soulignant là encore l'importance de la plasticité cellulaire.

L'ensemble de ces travaux illustre le rôle de la transition réversible entre les états épithéliaux et mésenchymateux orchestrée par les EMT-TFs dans l'invasion et la formation de métastases. Cependant, l'expression des EMT-TFs a également été rapportée dans des tumeurs humaines et murines non-invasives, suggérant leur implication dans d'autres processus. Chez l'homme par exemple, de forts niveaux d'expression de ZEB1 sont observés dans des adénocarcinomes pancréatiques *in situ* (252). En parallèle chez la souris, *Zeb1* a été retrouvé dans des lésions d'adénocarcinome pancréatique canalaire non invasives (249). L'équipe du Pr. Alain Puisieux a démontré les rôles précoces des EMT-TFs et particulièrement de ZEB1 dans la transformation et progression tumorale que je vais détailler (Figure 56, confère annexe). Enfin, il apparaît que les EMT-TFs sont impliqués à chaque étape de la carcinogenèse incluant la résistance aux traitements et échappement au système immunitaire des carcinomes que je décrirai dans une dernière partie.

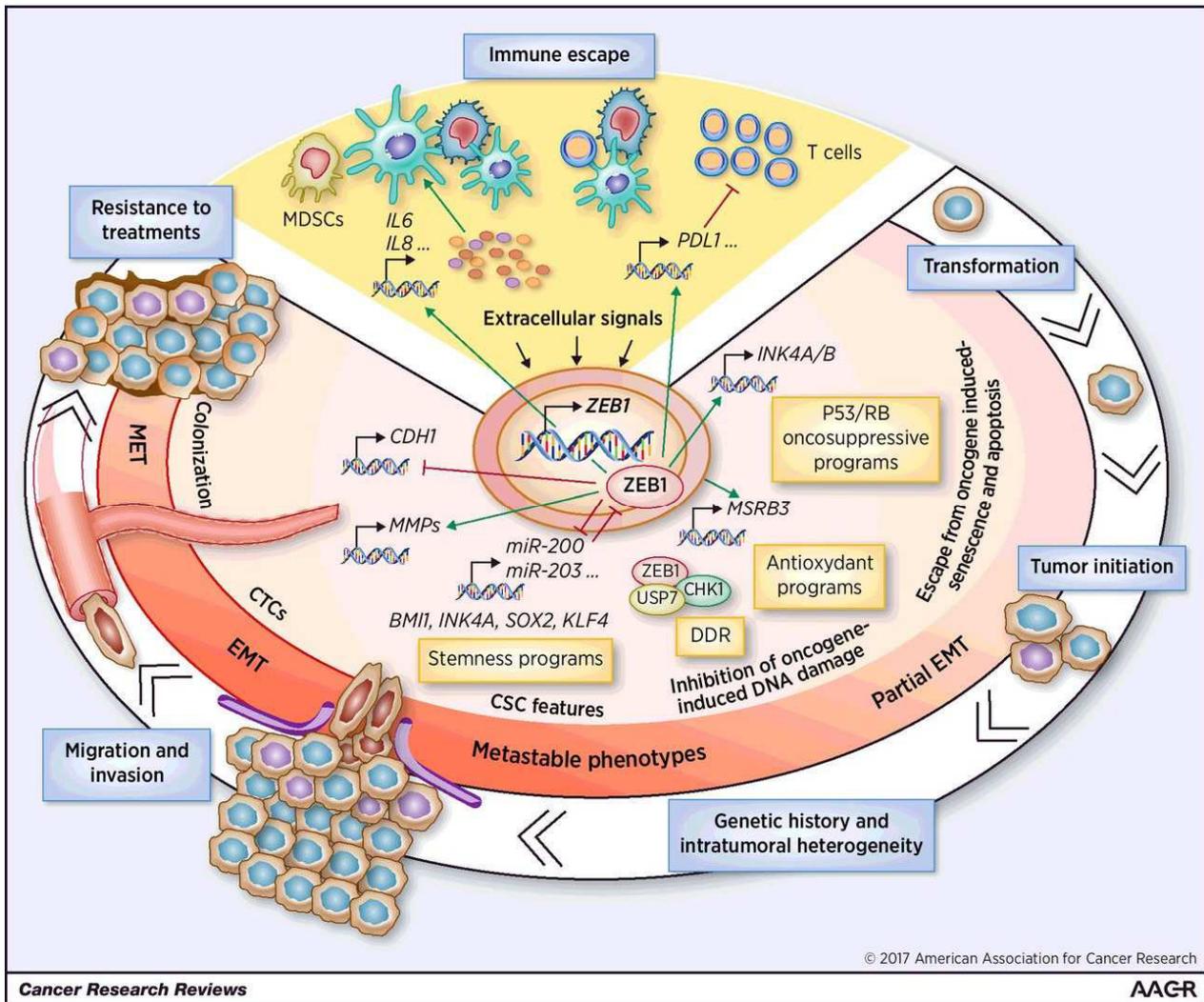


Figure 56 Fonctions Oncogéniques de ZEB1. Comme les EMT-TFs des familles SNAIL et TWIST, ZEB1 joue un rôle central déterminant le devenir cellulaire en régulant la transcription de facteurs impliqués dans le contrôle de la différenciation, prolifération, survie et mobilité. Son expression soutient la transformation et la progression tumorale et contribue à la résistance aux traitements et l'évasion au système immunitaire (Julie Caramel, 2018). De plus, si un grand nombre de fonctions sont conservées d'un EMT-TF à l'autre, certaines fonctions sont spécifiques et non redondantes (224). Enfin, certaines cibles directes ont pu être démontrées par de nombreux CHIP Seq réalisés à partir de lignées cancéreuses mammaires.

4.2. Les EMT-TFs favorisent l'échappement aux systèmes de sauvegarde permettant la transformation

Les travaux notamment de l'équipe d'Alain Puisieux, ont permis de montrer que l'implication des EMT-TFs dans la carcinogénèse est en fait très précoce en favorisant l'échappement aux systèmes de sauvegarde incluant les voies Rb et p53 (253). Dans un modèle cellulaire épithélial mammaire immortalisé HMEC, la surexpression de TWIST1 inhibe la sénescence induite par l'oncogène ERBB2 en inhibant p16 et p21 (254). La capacité de ZEB1 à inhiber la sénescence induite par l'oncogène EGFR a aussi été démontré *in vitro* dans un modèle humain de cellules épithéliales de l'œsophage immortalisées EPC2-hTERT. Dans ce modèle, ZEB1 inhibe p16INK4A et

p15INK4B (255). Cette capacité est conservée chez la souris et a été observée dans un contexte différent à savoir un modèle de fibroblaste embryonnaire. La délétion de *Zeb1* par knock-out induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S précoce suite à l'expression de p21 et p15 (256).

En inhibant les mécanismes de sauvegarde, les EMT-TFs favorisent la transformation maligne. Ainsi, dans un modèle de lignée épithéliale mammaire immortalisée HMEC, l'expression ectopique de ZEB1 ou de TWIST1 accélère la transformation induite par l'oncogène RAS en réduisant le nombre d'événements génétiques nécessaires. Le potentiel transformant des cellules HMEC après induction combinées de RAS et d'un EMT-TF a été validé *in vitro* par test de formation de colonies en agar mou. *In vivo*, la coopération de TWIST1 avec RAS a été montrée dans un modèle transgénique murin. Les transgènes *Twist1* et/ou *K-rasG12D* sont principalement exprimés dans la glande mammaire mais aussi dans l'épithélium cutané grâce à un contrôle par le promoteur MMTV. Alors qu'aucune souris *Twist1* ne développe de lésion maligne, les souris *KrasG12D* développent des papillomes oraux et anaux et les souris exprimant les deux transgènes développent des papillomes qui évoluent en carcinomes (257).

Suite à ces travaux révélant la synergie existante entre l'induction oncogénique de *Ras* et la réactivation de l'expression de l'EMT-TF *Twist1*, l'équipe Cédric Blanpain a étudié le rôle de *Twist1* dans les étapes d'initiation de carcinomes cutanés émergents après activation de *Ras*. Dans un modèle murin de carcinome cutané induit par mutation de *Kras* ou traitement DMBA/TPA, les niveaux d'expression de *Twist1* augmentent au cours de la progression tumorale. Alors que *Twist1* n'est pas détectable dans les cellules épidermiques normales, *Twist1* est exprimé par quelques cellules après activation de *Kras* ou traitement DMBA/TPA, avant même l'apparition de tumeur bénigne. *Twist1* est ensuite exprimé par une grande majorité de tumeurs cutanées et les niveaux d'expression de *Twist1* sont encore augmentés au stade le plus avancé de carcinome cutané dit SCC. L'inactivation conditionnelle de *Twist1* dans les cellules épidermiques murines K14Cre:*Twist1*^{fl/fl} compromet l'initiation tumorale. Enfin, la délétion de *Twist1* dans les tumeurs existantes démontre son rôle dans le maintien de la croissance tumorale. En fait, *Twist1* inhibe l'apoptose induite par l'oncogène en régulant p53 d'une part et favorise la prolifération cellulaire et propagation de façon indépendante de p53 d'autre part (258).

Dans un modèle de cancer du poumon médié par *Kras*, de faibles niveaux d'expression de *Zeb1* ont été montrés suffisants pour l'initiation de tumeurs *in vivo* (252). Enfin, dans le modèle KPC d'adénocarcinome pancréatique canalaire *Kras/p53*, le rôle majeur et spécifique de l'EMT-TF

Zeb1 sur l'initiation tumorale a été démontré. La déplétion homozygote de *Zeb1* réduit drastiquement le nombre de métaplasie et lésions précancéreuses alors que les déplétions de *Snail1* ou *Twist1* n'ont pas d'effet (248).

4.3. Les EMT-TFs favorisent l'acquisition de propriétés souches et la génération de cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSCs) sont caractérisées par la double capacité d'auto-renouvellement en générant une hétérogénéité phénotypique comparable à la tumeur d'origine (259). Initialement, le modèle hiérarchique plaçait la CSC au sommet de la pyramide de différenciation tumorale. Elle seule était alors capable d'initier une tumeur hétérogène. Le « gold standard » d'isolation et de caractérisation de CSC humaine est le test de transplantations sériées en dilution limite chez les souris immunodéficientes. Le faible nombre de cellules injectées permet d'évaluer la fréquence de CSC en fonction du nombre de tumeurs formées par rapport au nombre de cellules implantées. La répétition de transplantations sériées permet de démontrer le maintien des capacités tumorigènes au cours du temps, en excluant la présence de cellules cancéreuses très proliférantes mais non CSC. Les tests de mammosphères ont été développés afin d'isoler et de cultiver les CSC *in vitro*. De même que chez la souris, la capacité à former plusieurs générations de mammosphères est associée aux CSC. L'analyse de l'efficacité à former des organoïdes ainsi que l'expression du cluster de différenciation CD44 et de l'enzyme ALDH sont également des biomarqueurs couramment utilisés pour l'isolement de CSC dans les tumeurs solides. En utilisant des tests de mammosphères, Anne-Pierre Morel et al. a démontré le rôle de la coopération des EMT-TFs TWIST1, ZEB1 et ZEB2 avec l'oncogène RAS dans l'acquisition de propriétés souches par la lignée épithéliale mammaire HMEC. L'acquisition de CD44 et la perte du cluster de différenciation CD24 sous expression combinée de HRASG12V avec les EMT-TFs valident la reprogrammation en cellules souches cancéreuses des cellules HMEC. De manière intéressante, alors que l'expression de RAS, TWIST1 ou ZEB2 n'est pas suffisante à elle seule pour l'induction d'un phénotype souche, la seule expression ectopique de ZEB1 permet la conversion de près de 85 pourcent des cellules épithéliales HMEC en CSC CD44+/CD24- (257). L'acquisition de propriétés souches grâce au processus d'EMT remet en cause le dogme attaché aux rares cellules souches cancéreuses au sommet d'une hiérarchie unidirectionnelle. La notion de reprogrammation de cellules cancéreuses non souches en cellules souches cancéreuses révèle de plus une plasticité tumorale longtemps sous-estimée.

Au niveau moléculaire, ZEB1 régule négativement les micro-ARN répresseurs de propriétés souches comme miR-200, miR-183 et miR-203 qui régulent les facteurs associés aux propriétés souches BMI1, SOX2 et KLF4 (253). Les travaux de l'équipe d'Alain Puisieux ont également démontré le rôle de ZEB1 dans la régulation du programme de protection des cellules souches mammaires humaines saines contre le stress oxydatif. Le facteur de transcription ZEB1 régule directement la réductase sulfoxyde/méthionine MSR3 qui joue un rôle majeur dans la prévention des dommages à l'ADN induits par un oncogène. Ainsi, ZEB1 empêche l'activation de p53 et permet le maintien de la stabilité génomique au cours de la transformation (260). L'expression de ZEB1 favorise donc un processus de tumorigénèse reposant davantage sur la plasticité cellulaire que sur l'acquisition de mutations génétiques.

4.4. Les EMT-TFs dans la résistance aux traitements

L'acquisition de propriétés souches mais aussi mésenchymateuses a été associée à la résistance aux traitements standards incluant les radio- et chimiothérapies mais aussi les thérapies ciblées. Ces thérapies échoueraient dans l'élimination des cellules cancéreuses ayant acquis des propriétés souches par le processus d'EMT (261). Le rôle spécifique d'un ou plusieurs EMT-TFs n'est cependant pas toujours clairement identifié et la résistance aux traitements est parfois simplement associée aux caractéristiques mésenchymateuses. Cependant, certaines études s'efforcent de disséquer le rôle spécifique à chaque facteur de transcription. Je souhaite ici en détailler les principales. Par exemple, un phénotype dépendant de ZEB1 favorise l'acquisition de résistance à l'erlotinib ciblant le récepteur à tyrosine kinase EGFR dans les cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC) avec un rôle majeur du récepteur AXL (262). Les EMT-TFs des familles TWIST et SNAIL contrôlent de manière directe l'expression du transporteur ABCB5, favorisant la résistance à la chimiothérapie (263). L'activation du programme de réponse aux dommages à l'ADN induit par ZEB1 décrit précédemment comme caractéristique de CSC (260) favorise la résistance des cellules cancéreuses mammaires aux radiothérapies. Il est intéressant de noter que le mécanisme identifié fait intervenir ZEB1 indépendamment de son activité transcriptionnelle. En interagissant avec la peptidase spécifique de l'ubiquitine USP7, ZEB1 augmente la capacité de USP7 à déubiquityniler et donc stabiliser la kinase CHK1. En orchestrant la réparation de l'ADN de manière très fidèle par recombinaison homologue, CHK1 contre les effets de la radiothérapie (264). De plus, les micro-ARN cibles de ZEB1 miR-203, miR-429 et miR-200c ont été largement impliqués dans la résistance à la chimiothérapie. Le cas des carcinomes de l'ovaire est particulièrement intéressant. En effet, les cancers de l'ovaire épithéliaux s'avèrent

être plus résistants au cisplatine comparativement à ceux présentant des caractéristiques mésenchymateuses (265). Dans le même type tumoral, la résistance au cisplatine a été associée à de forts niveaux d'expression de ZEB1 régulant miR-429 (266). Ces deux observations, à priori incompatibles, suggèrent que le mécanisme de résistance dépendant de la boucle de rétrocontrôle ZEB1/miR-429 est découplé du processus d'EMT. miR-200c, un autre membre de la famille mirR-200 également régulé par ZEB1, favorise la sensibilité des glioblastomes à la chimiothérapie en contrôlant l'expression de la 6-O-Méthylguanine-ADN méthyltransférase MGMT, enzyme clé de la réparation de l'ADN (267). L'expression de miR-203 est aussi associée à la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires et pancréatiques au paclitaxel et à la gemcitabine. Dans cette étude, l'équipe de Thomas Brabletz propose d'inhiber ZEB1 et de restaurer un niveau suffisant de miR-203 en utilisant un inhibiteur de HDAC appelé mocétinostat (268). Ces travaux soutiennent l'utilisation de drogues épigénétiques afin de favoriser le phénotype épithélial, différencié sensible aux traitements actuels. La palette des fonctions de ZEB1 a été élargie par une étude démontrant son rôle dans le métabolisme, la synthèse, le stockage et l'utilisation des acides gras à longue chaîne polyinsaturée. Ces lipides sont des substrats pour la peroxydation des lipides. Les lipides peroxydés sont toxiques entraînant la mort cellulaire par ferroptose. Les cellules mésenchymateuses de différents types cancéreux résistantes aux thérapies expriment la peroxydase GPX4 qui protège les cellules de la ferroptose en dissipant les réactifs peroxydés. Dans cette étude, GPX4 apparaît être le talon d'Achille commun aux tumeurs résistantes aux traitements ayant de forts niveaux d'expression de ZEB1 (269).

Enfin, bien que le lien direct d'un ou plusieurs EMT-TFs dans la résistance aux immunothérapies n'a à ce jour pas été démontré, le phénotype EMT a été associé à la résistance aux immunothérapies dans des modèles de cancer du sein (270). De plus, le rôle bien décrit des EMT-TFs dans l'échappement au système immunitaire des carcinomes suggère fortement qu'ils pourraient avoir un impact sur la réponse aux immunothérapies.

4.5. Les EMT-TFs dans l'échappement au système immunitaire

De plus en plus d'études s'intéressent aux rôles des EMT-TFs, et particulièrement des cellules cancéreuses aux caractéristiques mésenchymateuses, dans la modulation de l'immunité anti-tumorale. Je souhaite dans cette partie discuter les multiples mécanismes (confère chapitre 2

partie 3) par lesquels les cellules tumorales en EMT influencent le microenvironnement immunitaire et la réponse immune anti-tumorale.

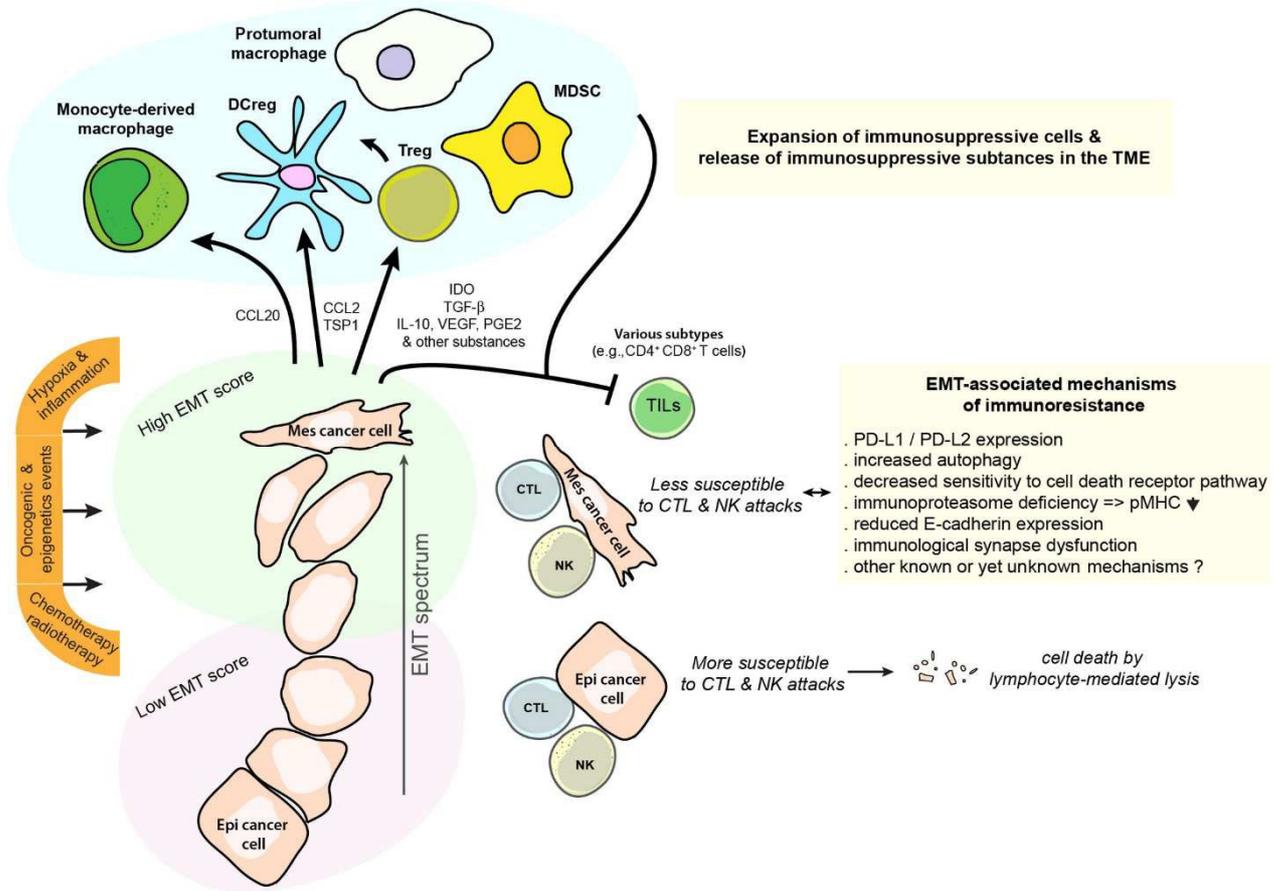


Figure 57 Rôle de l'EMT dans les interactions entre les cellules tumorales et cellules immunes. Les cellules tumorales en EMT, moins immunogènes, contrôlent l'attraction de populations immunosuppressives et inhibent l'activité des populations immunes cytotoxiques et effectrices permettant l'échappement au système immunitaire (271).

Plusieurs études ont associé l'induction du programme d'EMT à la résistance à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques. De manière intéressante, divers mécanismes indépendants favorisant cette résistance ont été mis en évidence, suggérant qu'une multitude de mécanismes associés à différents variants tumoraux en EMT sont capables d'induire la résistance à l'attaque du système immunitaire. Aussi, l'hétérogénéité intratumorale induite par l'EMT augmente la probabilité d'apparition d'un variant tumoral résistant à la lyse des T.

Clé de la présentation antigénique, le CMH-I a été reporté régulé négativement par les cellules tumorales au phénotype mésenchymateux. La lignée de carcinome mammaire parentale au profil plutôt épithélial exprime de plus fort niveaux d'expression du CMH-I que sa dérivée mésenchymateuse (272). *In vivo* une diminution d'expression du CMH-I par les cellules de carcinomes mammaire mésenchymateuses

dérivées du modèle MMTV-PyMT a également été observée, par rapport aux tumeurs plus épithéliales (269).

Dans un contexte de carcinome pulmonaire non à petites cellules, des déficiences de l'immunoprotéasome associées à un répertoire HLA-peptides peu divers sont des événements communément retrouvés dans des tumeurs aux profils plus mésenchymateux. Tripathi et al. se sont intéressés aux expressions constitutives et induites des sous-unités de l'immunoprotéasome et leur impact sur la présentation antigénique. En plus d'augmenter l'expression du CMH-I, un traitement par IFN- γ restaure le répertoire de peptides liés au CMH de classe I dans les cellules mésenchymateuses. Cependant, le répertoire peptidique généré par traitement à l'IFN- γ des cellules mésenchymateuses est significativement différent du répertoire des cellules épithéliales. Cette observation souligne l'impact de l'immunoprotéasome sur la présentation antigénique des cellules cancéreuses, indépendamment d'éventuels signaux pro- inflammatoires (273).

Une étude sur la lignée de carcinome mammaire humain MCF-7 a démontré le rôle de l'EMT dans la résistance à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques. Les MCF-7 sont induites en EMT soit par expression ectopique de SNAIL1, soit par exposition chronique au TNF- α . Dans les deux cas, l'induction d'EMT protège les MCF-7 mésenchymateuses de la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques. Le défaut de formation de synapse entre les lymphocytes T effecteurs Heu33 et les MCF-7 mésenchymateuses a été mis en évidence par quantification de l'accumulation de phospho-tyrosine à la synapse. Cette protection contre la lyse des T semble être liée à l'activation de l'autophagie dans les cellules mésenchymateuses. En effet, l'inhibition de l'autophagie par ARN interférant ciblant la bécline 1 restaure l'activité anti-cancéreuse des lymphocytes T (274).

De manière intéressante, l'induction d'EMT dans le même modèle cellulaire MCF-7 par le ciblage de la protéine 2 induite par la signalisation WNT1 (WISP2) réduit également la sensibilité des MCF-7 à la lyse des T. Dans ce cas, l'EMT est associée à une hyperactivité de la voie du TGF- β et l'inhibition de la signalisation TGF- β restaure la sensibilité des MCF-7 à la lyse des T. Dans ce modèle, l'autophagie ne semble pas impliquée dans la résistance à la lyse par les lymphocytes T (275).

Dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire IGR-Heu, l'EMT induite par culture en conditions hypoxiques favorise l'émergence de clones résistants à l'attaque par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques Heu171. La résistance des cellules mésenchymateuses IGR-Heu à la

lyse spécifique par les Heu171 peut être partiellement expliquée par la perte d'expression de la E-cadhérine par les IGR-Heu en EMT. En effet, l'activité des lymphocytes T cytotoxiques Heu171 repose sur l'intégrine CD103 et son interaction avec la E-cadhérine, son ligand. L'inhibition des EMT-TFs des familles SNAIL et ZEB par ARN interférant restaure la sensibilité à la lyse des T (276).

Enfin, malgré une immunogénicité suffisante, les cellules cancéreuses peuvent échapper à l'attaque des T et NK en dérégulant leur programme de mort apoptotique dépendante des caspases en aval des signalisations par TRAIL et FAS. Ainsi, les cellules de carcinome pancréatique PANC1 montrent une sensibilité réduite à la lyse par les LT après induction de l'EMT par expression ectopique du facteur de transcription à T-box Brachyury. Cette résistance ne semble pas associée à une perte d'immunogénicité mais à un défaut de la voie des caspases. Bien que les caspases soient activées, la laminine présente dans le noyau n'est pas dégradée correctement. Cette observation a été corrélée avec la perte d'expression de la kinase dépendante du cycle cellulaire CDK1, connue pour phosphoryler la laminine. Finalement, la restauration de l'activité de CDK1 restaure également l'immunosurveillance des cellules mésenchymateuses (277).

4.6. Dérégulation de l'expression des ligands des points de contrôle du système immunitaire

Un deuxième niveau d'échappement au système immunitaire passe par l'expression des ligands des points de contrôle du système immunitaire. De robustes corrélations entre un score EMT, les niveaux d'expression de miR-200 et de PD-L1 ont été observées en clinique dans des carcinomes pulmonaires non à petites cellules. Le contrôle direct d'expression de PD-L1 par la boucle de rétrocontrôle miR-200/ZEB1 a de plus été démontré. miR-200 régule négativement PD-L1 par ciblage direct. En réprimant miR-200, ZEB1 lève la répression de PD-L1 favorisant l'immunosuppression des lymphocytes T CD8 (278). De nombreuses études montrent également une association entre un score EMT et les niveaux d'expression des ligands des points de contrôle du système immunitaire (279; 280). Toutefois, il est crucial de rappeler que les scores EMT et les expressions des ICPL obtenus à partir de la tumeur entière sont le reflet de l'expression des marqueurs d'EMT et ICPL par chacune des populations composant la tumeur, y compris les fibroblastes au fort score d'EMT et cellules immunes exprimant fortement les ICPL.

4.7. EMT et recrutement d'un microenvironnement tumoral

Enfin, les cellules tumorales sont capables de recruter un microenvironnement immunitaire favorable au développement tumoral par la production et le relargage de cytokines inflammatoires.

Dans un modèle de carcinome hépatique, l'EMT induite en condition d'hypoxie enclenche l'installation d'un microenvironnement immunosuppresseur. Les cellules tumorales en EMT favorisent le recrutement de macrophages dérivés de monocytes en produisant CCL20 de manière dépendante d'HIF- α . Ces derniers favorisent le ratio Treg/CD8 en produisant l'indoléamine-2,3-dioxygénase IDO (281). Dongre et al. ont également montré le rôle de l'EMT et plus particulièrement de *Snail1* sur le recrutement des Treg et macrophages dans le modèle mammaire murin MMTV-PyMT. Des variants épithéliaux et mésenchymateux ont été dérivés à partir de la lignée de carcinome mammaire PyMT, avec induction possible des différents EMT-TFs à la doxycycline. Les tumeurs développées à partir de variants mésenchymateux ou aux forts niveaux d'expression de *Snail1* ont un infiltrat plus faible en CD8 et plus riche en Treg, CD8 CTLA-4+/PD-1+ et macrophages protumoraux CD206+ iNOS+ que leur homologues épithéliaux ou *Snail1* faible. De manière intéressante, la combinaison de clones épithéliaux et mésenchymateux dans diverses proportions permet de démontrer un gradient inverse entre l'infiltration T CD8 et le pourcentage de cellules mésenchymateuses à l'origine de la tumeur (269).

Dans des lignées cancéreuses mammaires de type basal (MDA-231-D et Hs578T) et luminal (MCF-7), le séquençage d'immunoprécipitation de la chromatine ChIP-Seq avec un anticorps anti-ZEB1 a permis d'identifier les cibles directes du facteur de transcription. En cohérence avec le niveau d'expression de ZEB1, 32 907 sites de fixation de ZEB1 ont été identifiés dans les MDA-231-D, 13 514 dans les Hs578T et seulement 281 dans les MCF-7. Des sites de fixations connus sur les promoteurs de la E-cadhérine et ESRP2 valident le bon déroulement de l'expérimentation. L'analyse d'enrichissement de signature a mis en évidence la régulation de l'inflammation comme cible majeur du facteur de transcription ZEB1. Parmi les cibles directes de ZEB1, on retrouve des attractants de cellules myéloïdes dérivées suppressives MDSC telles que les interleukines -6, -8 et -1 β mais aussi les chémokines CXCL1 et CXCL5. L'implémentation *in vivo* d'approche gain de fonction de *Zeb1* dans un modèle murin mammaire 4T1 a permis de confirmer le rôle de *Zeb1*

dans l'attraction des MDSC au cœur de la tumeur, via une production accrue d'IL6 et IL8 par les cellules tumorales surexprimant *Zeb1* (282).

5. Mélanome et pseudo-EMT

A la différence du lignage épithélial, le lignage mélanocytaire trouve son origine au niveau de la crête neurale. Associer le processus d'EMT aux cellules mélanocytaires est donc un abus de langage, on peut toutefois utiliser le terme de pseudo-EMT afin de décrire un processus similaire que je vais présenter dans ce chapitre.

5.1. Expression et fonction des EMT-TFs dans le lignage mélanocytaire dérivé de la crête neurale

Les EMT-TFs jouent un rôle majeur dans l'établissement du lignage mélanocytaire et la fonctionnalité des mélanocytes adultes. La migration dorso-latérale des mélanoblastes à travers l'embryon nécessite la participation des EMT-TFs SNAIL2 et ZEB2. Les souris déficientes pour *Snail2* présentent des défauts de migration des mélanoblastes qui induisent des défauts majeurs de pigmentation incluant un front blanc (283). La délétion spécifique de *Zeb2* dans le lignage mélanocytaire (Tyr:Cre *Zeb2* knock-out) induit une perte drastique de la pigmentation du pelage de la souris qui est dû à la fois à une mauvaise migration des mélanoblastes mais aussi à un défaut de différenciation des mélanocytes. En effet, l'invalidation de ZEB2 dans des mélanocytes primaires induit une diminution d'expression de MITF et des défauts de différenciation (9). En plus d'être exprimés par les mélanoblastes, SNAIL2 et ZEB2 restent exprimés par les mélanocytes adultes aussi bien chez l'homme que chez la souris. L'analyse de l'expression des EMT-TFs à partir d'échantillon de peau humaine saine a en effet démontré la présence de SNAIL2 et ZEB2 dans les mélanocytes différenciés, alors que ZEB1 et TWIST1 n'étaient pas détectés (10). L'ensemble de ces travaux souligne le rôle clé de SNAIL2 et ZEB2 dans le maintien de l'homéostasie du lignage mélanocytaire, depuis le développement embryonnaire jusqu'à l'âge adulte.

A l'inverse, ZEB1 n'est pas exprimé par les mélanocytes différenciés. Cependant, l'expression de ZEB1 a été observée dans des mélanocytes souches de la peau murine, suggérant sa potentielle implication dans la génération de mélanocytes matures à partir du pool de cellules souches (9). Au sein de la niche de cellules souches, le contrôle d'expression de MITF et ZEB2 est obtenu via

l'expression du TGF- β . Il permet de prévenir l'activation du programme de différenciation médié par MITF (

Figure 58) (284).

De plus, contrairement à ZEB2 qui active la transcription de MITF, ZEB1 réprime l'expression de MITF et altère la pigmentation des cellules épithéliales pigmentaires de la rétine (285). Il est également important de noter que l'inactivation de ZEB2 dans les mélanocytes n'impacte pas seulement l'expression de MITF et la différenciation, mais induit également l'expression de ZEB1 (9). Une balance d'expression de ZEB2 vers ZEB1 est ainsi associée à la dédifférenciation mélanocytaire.

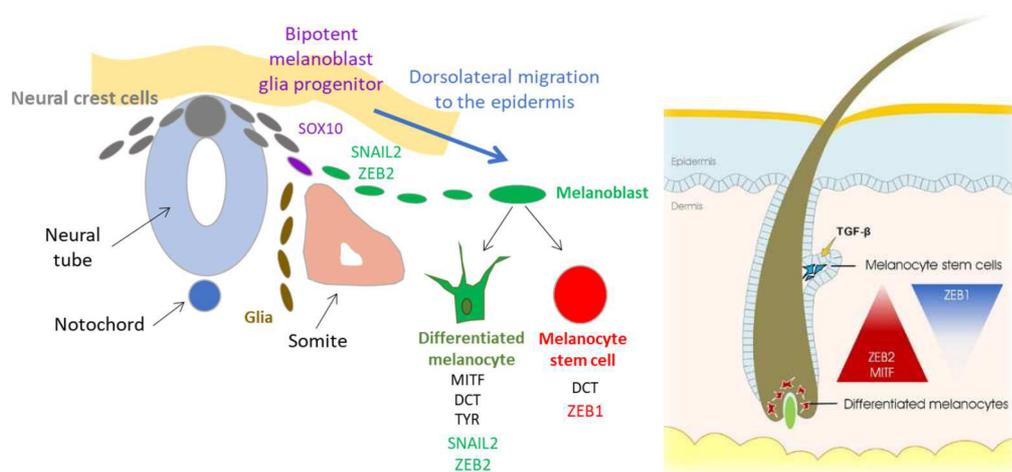


Figure 58 A gauche : Expression des EMT-TFs au cours de la formation du lignage mélanocytaire à partir de cellules embryonnaire de la crête neurale. Le facteur de transcription SOX10 est exprimé par le progéniteur bipotent des cellules gliales et mélanocytaires. SNAIL2 et ZEB2 sont requis pour la délamination des cellules de la crête neurale, la spécification des mélanoblastes et leur migration dorso-latérale. (286) A droite : Expression des EMT-TFs à l'âge adulte. SNAIL2 et ZEB2 sont aussi nécessaires à l'homéostasie des mélanocytes différenciés de l'épiderme, en régulant positivement MITF. Au contraire, ZEB1 est exprimé par les mélanocytes souches, qui n'expriment pas MITF. (287)

5.2. Le « switch » d'expression des EMT-TFs au cours de la mélanomagenèse

Ces observations relatives aux mélanocytes normaux soulèvent la question de l'implication éventuelle et différentielle des EMT-TFs dans les pathologies associées telles que les mélanomes. Les travaux de notre équipe ont permis de mieux comprendre le rôle de chaque EMT-TFs dans la mélanomagenèse, depuis les étapes précoces de transformation (10). Contrairement aux carcinomes, les EMT-TFs ne présentent ni le même profil d'expression, ni des fonctions similaires dans les mélanomes. L'analyse des expressions des EMT-TFs SNAIL1, SNAIL2, TWIST1, ZEB1 et

ZEB2 dans une série de tissus humains représentatifs de l'évolution des mélanomes incluant l'épiderme normal, des nævus, des mélanomes primaires et des métastases a permis de révéler les spécificités des EMT-TFs propres au développement des mélanomes. De manière intéressante, les mélanocytes normaux expriment les EMT-TFs SNAIL2 et ZEB2 et sont négatifs pour ZEB1 et TWIST1. Une balance d'expression de ZEB2/SNAIL2 vers ZEB1/TWIST1 est observée au cours de la progression et de la transformation tumorale. Au sein des lésions de mélanome, les EMT-TFs sont exprimés en gradient. ZEB2 et SNAIL2 sont fortement exprimés à la surface de l'épiderme et perdus en profondeur. ZEB1 et TWIST1 s'expriment suivant un gradient inverse, avec de plus fortes expressions en profondeur, sur le front invasif des mélanomes (Figure 59). L'analyse différentielle de la survie sans métastase en fonction des niveaux d'expressions individuels de chaque EMT-TFs confirme le risque majeur en termes de mauvais pronostic associé au switch d'expressions ZEB2/SNAIL2 vers ZEB1/TWIST1. Remarquablement, les patients présentant des mélanomes au fort niveau d'expression de ZEB2 et faibles niveaux de ZEB1/TWIST1 ont une survie sans progression très favorable alors que la quasi-totalité des tumeurs ZEB2 faible, ZEB1/TWIST1 forts évoluent rapidement (10). Une autre étude incluant un nombre important de patients a confirmé que de faibles niveaux d'expression de ZEB2 améliorent le pronostic des patients atteints de mélanome (9).

Ces observations démontrent le rôle majeur des EMT-TFs dans l'évolution des mélanomes et l'intérêt de disséquer leurs fonctions individuelles. Dans la suite, je détaillerai les signalisations contrôlant ce switch d'expression des EMT-TFs et positionnerai la transition de type EMT des mélanomes par rapport au switch de phénotype associé au modèle du rhéostat de MITF décrit au chapitre 1. Je me focaliserai ensuite sur ZEB1 et son potentiel tumorigénique.

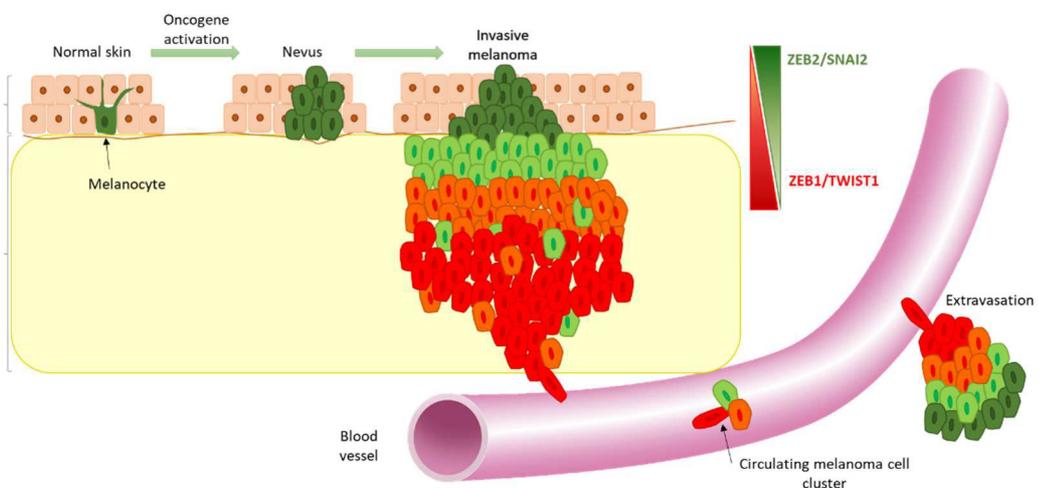
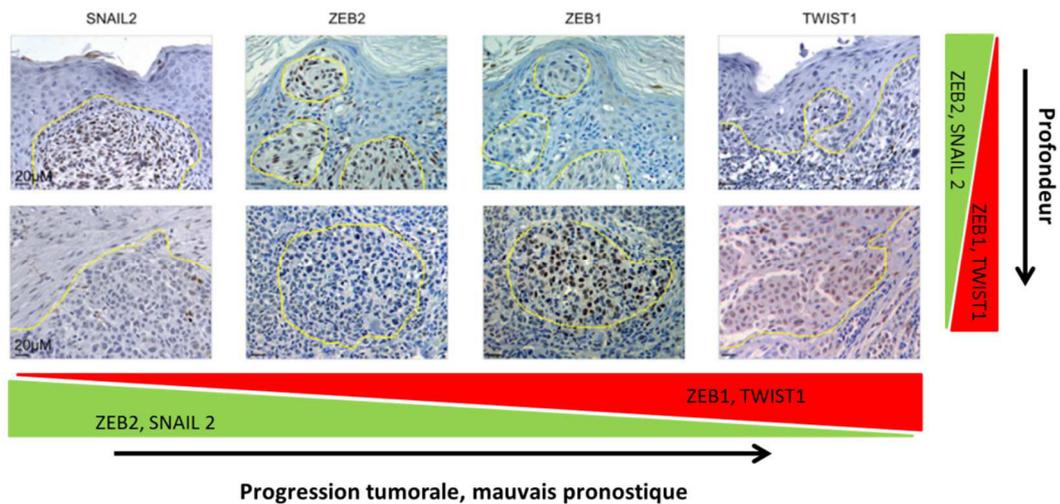


Figure 59 En haut : Exemples représentatifs de marquage IHC des EMT-TFs respectivement de gauche à droite SNAIL2, ZEB2, ZEB1 et TWIST1 à la surface et en profondeur de mélanomes primaires. Les images illustrent les gradients inverses d'expression de ZEB2 et SNAIL2 versus ZEB1 et TWIST1. Les contours jaunes délimitent les bords de la tumeur. Adapté de (10) En bas : Représentation schématique de la balance d'expression des EMT-TFs au cours du développement des mélanomes. ZEB2 et SNAIL2 sont exprimés par les mélanocytes différenciés au sein de l'épiderme sain de la peau humaine. Leur expression est maintenue dans les névi sénescents. Au cours de la transformation en mélanome primaire, l'expression de SNAIL2 et ZEB2 est progressivement perdue en faveur de l'expression de TWIST1 et ZEB1. De plus, une hétérogénéité intra-tumorale est également observée dans les lésions de mélanomes, la balance d'expression des EMT-TFs étant généralement observée en gradient depuis la surface jusqu'au front invasif du mélanome. Le gain de capacités invasives via l'activation de ZEB1 favorise la dissémination des cellules de mélanome. Enfin, le profil d'expression différentiel inverse des EMT-TF est retrouvé sur le site secondaire, permettant la croissance de la métastase (286).

5.3. Contrôle de l'expression différentielle des EMT-TFs dans le mélanome

Etant donné la prévalence de l'activation de la voie des MAPKinases dans le mélanome, son implication dans le réarrangement d'expression des EMT-TFs a été étudiée. Ainsi, l'expression ectopique d'une forme activée de BRAF dans deux lignées de mélanocytes immortalisés mais non-transformées murine (melan-a) et humaine (NHEM) induit la conversion des profils d'expressions

ZEB2/SNAIL2 vers ZEB1/TWIST1. Le maintien d'expression de ZEB1/TWIST1 est dépendant de l'activation de la voie des MAPKinase puisque l'inhibition des kinases MEK et BRAF dans la lignée de mélanome A375p induit la transition inverse à savoir la perte d'expression de ZEB1 et TWIST1 et le gain de l'expression de ZEB2. Le facteur de transcription FRA1 (Fos-related antigen 1), membre de la famille AP1, joue un rôle majeur en aval de la voie des MAPKinase MEK/ERK. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que FRA1 contrôle l'expression des EMT-TFs par fixation directe sur la zone de répression transcriptionnelle de ZEB2 et en avant des sites d'initiation de la transcription (TSS) de ZEB1 et TWIST1. Dans le contexte du mélanome, le contrôle de ZEB par la famille des micro-ARN miR-200 ne semble pas pertinent étant donné les faibles niveaux d'expression de miR-200 (10). Enfin, un séquençage d'immunoprécipitation de la chromatine ciblant MITF sur la lignée de mélanome 501Mel a identifié le locus de ZEB1 comme cible potentielle de MITF (288). Pour rappel, il a également été montré que ZEB2 contrôle l'expression de MITF dans les mélanocytes normaux (9). Ces données identifient donc des régulations réciproques entre les EMT-TFs ZEB et MITF, suggérant un couplage entre le switch de phénotype dépendant de MITF et le switch d'expression des EMT-TFs.

5.4. Switch d'expression des EMT-TFs et couplage avec le switch phénotypique dépendant de MITF

La transformation des melan-a induit la diminution d'expression de *Mitf* et de ses gènes cibles (289). L'expression forcée de *Snail2* et *Zeb2* restaure l'expression de *Mitf* et induit le programme de différenciation mélanocytaire décrit par Hoek et Goding (chapitre 1). A l'inverse, l'expression ectopique de *Zeb1* et *Twist1* accentue le phénotype invasif faible en *Mitf*. Dans des lignées établies de mélanome, la délétion de *SNAIL2* et *ZEB2* par ARN interférant réduit les niveaux d'expression de MITF, tout comme l'induit l'expression ectopique de ZEB1, TWIST1. La balance d'expression des EMT-TF ZEB2/SNAIL2 vers ZEB1/TWIST1 permettrait donc l'acquisition d'un phénotype invasif au faible niveau d'expression de MITF (10). L'étude menée par Deneker confirme également la régulation de MITF par le switch d'expression ZEB1/ZEB2 (9). Des tests de migration en matrigel valident le potentiel invasif de ZEB1 et TWIST1. Ces observations sont en accord avec les gradients d'expressions observés *in vivo* et l'expression de ZEB1 et TWIST1 au plus fort sur le front d'invasion. Ainsi, la reprogrammation induite par l'EMT des mélanocytes et mélanomes est capable d'induire le switch phénotypique médié par MITF et la transition réversible entre les états prolifératifs et invasifs (Figure 60) (10).

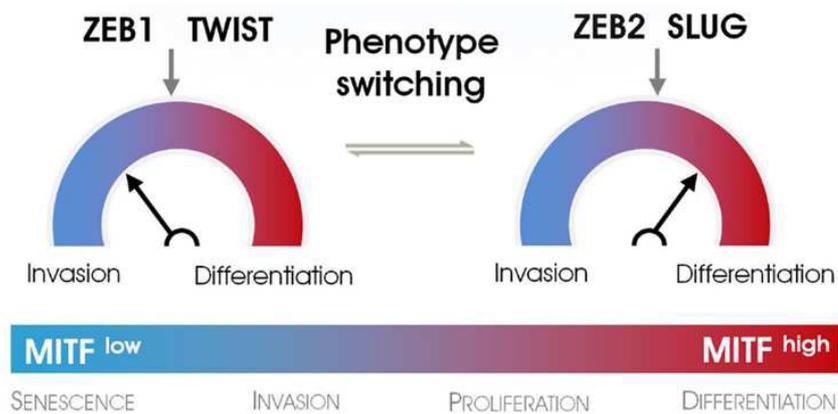


Figure 60 Les EMT-TFs orchestrent la transition phénotypique réversible entre les états différenciés forts en MITF et invasifs, faibles en MITF des cellules de mélanome (287)

5.5. Fonctions oncogéniques antagonistes des EMT-TFs dans le mélanome

Le switch d'expression des EMT-TFs induit par la voie des MAPKinases est nécessaire à la transformation des mélanocytes médiée par l'oncogène BRAF. Le potentiel transformant des cellules melan-a après induction combinée de BRAF et d'un EMT-TF a été validé *in vitro* par test de formation de colonies en agar mou. L'acquisition de l'expression des EMT-TFs *Zeb1* et/ou *Twist1* est nécessaire à la transformation induite par l'oncogène BRAF *in vitro* alors que l'expression ectopique de *Zeb2* et *Snail2* réduit drastiquement le nombre de colonies formées. De plus, l'expression ectopique de ZEB2 et/ou SNAIL2 dans des lignées établies de mélanome comme les A375P réduit également le potentiel transformant *in vivo* et leur tumorigénicité *in vivo*. Ainsi, les rôles des EMT-TFs apparaissent totalement découplés au cours de la mélanomagenèse, où ZEB1 et TWIST1 présentent des propriétés oncogénique alors que ZEB2 et SNAIL2 agissent comme suppresseurs de tumeur (10). Des supposées cellules souches cancéreuses, sur la bases d'expression des clusters de différenciation CD44 et CD133 ont été isolées à partir de B16F10. La délétion de *Zeb1* par shARN confirme son implication dans la tumorigénicité des mélanomes. De plus, la délétion de *Zeb1* réduit les capacités transformantes, les capacités d'invasion et de migration des B16F10 CD44+ CD133+ (290).

Une étude récente à partir de modèles murins transgéniques indique que la délétion de *Zeb2* (Knock Out) n'est pas suffisante à l'initiation d'un mélanome, même dans le cas de l'activation oncogénique de *Nras* par la mutation *NrasQ61* (291). Aussi, cette étude ne confirme pas la fonction suppresseur de tumeur prétendue de ZEB2. De plus, l'expression ectopique de *Zeb2* dans

le même modèle murin favorise la croissance des mélanomes primaires et métastases en favorisant la prolifération cellulaire. A l'inverse, l'inactivation de *Zeb2* induit une diminution de l'expression de *Mitf*, une augmentation d'expression de *Zeb1* le tout associé à un défaut de prolifération. Ces résultats suggèrent que l'expression de ZEB2 pourrait mimer le modèle du rhéostat de MITF : l'expression ectopique de *ZEB2/MITF* dans les cellules de mélanome conduirait à la différenciation et à l'arrêt du cycle cellulaire alors que l'inactivation de *ZEB2/MITF* aboutirait aussi à un défaut de prolifération. En revanche, des niveaux intermédiaires de *ZEB2/MITF* seraient favorables à la prolifération des cellules de mélanome. De fait, l'expression aberrante de ZEB2 par les cellules de mélanome favoriserait une différenciation terminale et réduirait les capacités tumorigènes par xénogreffe chez la souris nude alors que des niveaux intermédiaires de ZEB2 seraient compatibles avec la prolifération et prise tumorale. Cependant, le lien entre l'expression des EMT-TFs et la prolifération demeure encore peu clair étant donné qu'aucun effet sur la prolifération n'est observé sous modulation d'expression de *ZEB1* (10).

OBJECTIFS DE LA THESE

Les précédant travaux de l'équipe avaient permis de bien définir le rôle respectif de chacun des EMT-TFs (ZEB1/2, SNAIL1/2, TWIST1/2) dans le développement et la progression des mélanomes. De manière intéressante, ZEB2 et SNAIL2 ne sont pas seulement impliqués dans la délamination des cellules de crête neurale et la différenciation mélanocytaire mais ils restent exprimés par les mélanocytes normaux chez l'adulte. Leur expression diminue au cours de la progression tumorale, au profit des facteurs ZEB1 et TWIST1. Ce changement de profil d'expression est un facteur de mauvais pronostic pour les patients atteints de mélanome.

Lorsque j'ai commencé ma thèse, j'ai eu la chance de participer à la finalisation des travaux du doctorant me précédant Geoffrey Richard (article 1) qui s'intéressaient au rôle oncogénique majeur de ZEB1 et son implication dans la résistance aux thérapies ciblées (inhibiteurs de BRAF, MEK). J'ai participé aux expérimentations *in vitro*, en élargissant notamment le panel de lignées permettant d'affirmer la corrélation inverse entre les expressions de ZEB1/TWIST1 et ZEB2/MITF et en réalisant les tests de sensibilité aux inhibiteurs de BRAF. Enfin, via la combinaison d'approches gain de fonction de ZEB1 et perte de fonction de NGFR, mes travaux ont participé à confirmer que l'acquisition de résistances aux inhibiteurs de BRAF/MEK médiée par ZEB1 est dépendante de la plasticité phénotypique.

Concernant le potentiel impact de ZEB1 dans la résistance aux immunothérapies et plus généralement dans les interactions cellules tumorales / microenvironnement immunitaire des mélanomes, rien n'était décrit au commencement de ma thèse. Etant donné le nombre croissant d'études dans les carcinomes suggérant l'implication de l'EMT dans l'échappement au système immunitaire, j'ai voulu étudier le rôle de ZEB1 dans l'échappement au système immunitaire des mélanomes. Mon premier objectif était d'établir une potentielle corrélation entre l'expression tumorale de ZEB1 par les cellules de mélanome et une population immune infiltrant les tumeurs, à partir de biopsies de patients (multi IF, RNA-Seq). En parallèle, l'implémentation d'approches gain/perte de fonction de ZEB1 dans des modèles syngéniques murins m'a permis d'étudier le rôle de l'expression de ZEB1 par les cellules de mélanome sur les interactions avec le microenvironnement immunitaire. L'utilisation de modèles murins m'a également permis d'adresser la question majeure du rôle de ZEB1 dans la sensibilité aux immunothérapies par anti-PD1. Enfin, j'ai essayé de décortiquer *in vitro* les mécanismes d'échappement au système immunitaire intrinsèques aux cellules de mélanome à savoir l'expression du CMH, des antigènes et des ligands des points de contrôle du système immunitaire. Etant donné la discordance obtenue entre nos modèles humains et murins, ces travaux ne sont pas intégrés à l'article 2 mais seront présentés dans la discussion.

RESULTATS

ARTICLE 1

Le mélanome est le plus agressif des cancers cutanés. Après des décennies d'impasse dans le traitement des patients atteints de mélanome métastatique, la découverte de la mutation majoritaire BRAFV600E a conduit à la première révolution des thérapies ciblées. La réponse obtenue par l'utilisation des inhibiteurs de la voie MAPK est drastique mais de courte durée. Une régression tumorale claire est observée chez la moitié des patients mutés pour BRAFV600 mais tous rechutent et le taux de survie à 5 ans reste relativement faible.

En parallèle de l'acquisition de mutations génétiques, il est possible que les cellules de mélanome s'adaptent à la pression exercée par l'inhibition de la voie MAPK grâce à leur plasticité cellulaire exacerbée. Le facteur de transcription ZEB1, connu pour induire la transition épithélio-mésenchymateuse et favoriser l'invasion est aujourd'hui considéré comme un facteur oncogénique impliqué dans la plasticité des cellules cancéreuses et la résistance aux thérapies dans les carcinomes.

Dans l'étude qui suit, nous démontrons le rôle oncogénique majeur de ZEB1 et son implication dans la résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK (MAPKi) des mélanomes mutés pour BRAFV600.

- De forts niveaux d'expression de ZEB1 sont associés à la résistance innée aux MAPKi à la fois des lignées cellulaires et tumeurs de mélanome présentant la mutation BRAFV600E.
- Des niveaux élevés de ZEB1 ont aussi été associés à la résistance acquise aux MAPKi, que ce soit *in vitro* ou bien à partir de biopsies de patient avant/après acquisition de résistance.
- L'expression ectopique de ZEB1 est suffisante à l'émergence de résistance aux MAPKi en favorisant la transition réversible vers un phénotype souche tumorigène MITF faible/NGFR fort.
- A l'inverse, l'inactivation de ZEB1 favorise la différenciation, ralentit la croissance tumorale *in vivo*, sensibilise les cellules de mélanome aux MAPKi et induit la mort des cellules résistantes.

Ainsi, nous avons démontré le rôle majeur de ZEB1 dans le contrôle de la plasticité cellulaire des mélanomes, permettant l'adaptation et la résistance aux MAPKi.

SOURCE
DATATRANSPARENT
PROCESSOPEN
ACCESS

ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors

Geoffrey Richard^{1,2,3,4,5}, Stéphane Dalle^{1,2,3,4,5,6}, Marie-Ambre Monet^{1,2,3,4,5}, Maud Ligier^{1,2,3,4,5}, Amélie Boespflug^{1,2,3,4,5,6}, Roxane M Pommier^{1,2,3,4,5}, Arnaud de la Fouchardière^{1,2,3,4,5,7}, Marie Perier-Muzet^{1,2,3,4,5,6}, Lauriane Depaepe⁸, Romain Barnault^{1,2,3,4,5}, Garance Tondeur⁸, Stéphane Ansieau^{1,2,3,4,5}, Emilie Thomas⁹, Corine Bertolotto^{10,11,12}, Robert Ballotti^{10,11,12}, Samia Mourah¹³, Maxime Battistella¹⁴, Céleste Lebbe^{15,16}, Luc Thomas^{1,2,3,4,5,6}, Alain Puisieux^{1,2,3,4,5,17,*} & Julie Caramel^{1,2,3,4,5,**}

Abstract

Targeted therapies with MAPK inhibitors (MAPKi) are faced with severe problems of resistance in *BRAF*-mutant melanoma. In parallel to the acquisition of genetic mutations, melanoma cells may also adapt to the drugs through phenotype switching. The ZEB1 transcription factor, a known inducer of EMT and invasiveness, is now considered as a genuine oncogenic factor required for tumor initiation, cancer cell plasticity, and drug resistance in carcinomas. Here, we show that high levels of ZEB1 expression are associated with inherent resistance to MAPKi in *BRAF*^{V600}-mutated cell lines and tumors. ZEB1 levels are also elevated in melanoma cells with acquired resistance and in biopsies from patients relapsing while under treatment. ZEB1 overexpression is sufficient to drive the emergence of resistance to MAPKi by promoting a reversible transition toward a MITF^{low}/p75^{high} stem-like and tumorigenic phenotype. ZEB1 inhibition promotes cell differentiation, prevents tumorigenic growth *in vivo*, sensitizes naive melanoma cells to MAPKi, and induces cell death in resistant cells. Overall, our results demonstrate that ZEB1 is a major driver of melanoma cell plasticity, driving drug adaptation and phenotypic resistance to MAPKi.

Keywords EMT; MAPK; melanoma; resistance; targeted therapy

Subject Categories Cancer; Skin

DOI 10.15252/emmm.201505971 | Received 21 October 2015 | Revised 9 August 2016 | Accepted 11 August 2016 | Published online 5 September 2016

EMBO Mol Med (2016) 8: 1143–1161

Introduction

The recent emergence of targeted therapies directed against components of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway has led to unprecedented clinical benefits for the treatment of metastatic melanoma. Approximately 50% of melanomas exhibit a *BRAF*^{V600E} mutation that can be targeted with specific inhibitors, namely vemurafenib (or PLX4032) or dabrafenib (Chapman *et al*, 2011). Unfortunately, resistance to these BRAF inhibitors (BRAFi) invariably develops in patients after only a few months, through various mechanisms that generally lead to the reactivation of the BRAF-MEK-ERK pathway or to the activation of the PI3K-AKT survival pathway (Lito *et al*, 2013; Holderfield *et al*, 2014; Van Allen *et al*, 2014). Fifty percent of patients displaying mutated *BRAF* melanomas also develop intrinsic/innate resistance at an early stage during treatment. The combined administration of BRAFi and MEK inhibitors (MEKi), such as trametinib or cobimetinib, has been shown to

1 Cancer Research Center of Lyon, INSERM U1052, Lyon, France

2 Cancer Research Center of Lyon, CNRS UMR 5286, Lyon, France

3 Université de Lyon, Lyon, France

4 ISPB, Université Lyon 1, Lyon, France

5 Centre Léon Bérard, Lyon, France

6 Dermatology Unit, Hospices Civils de Lyon, CH Lyon Sud, Pierre Bénite Cedex, France

7 Department of Biopathology, Centre Léon Bérard, Lyon, France

8 Department of Biopathology, Hospices Civils de Lyon, CH Lyon Sud, Pierre-Bénite Cedex, France

9 Fondation Synergie Lyon Cancer, Centre Léon Bérard, Lyon, France

10 INSERM U1065, Equipe 1, Biologie et pathologies des mélanocytes: de la pigmentation cutanée au mélanome, Equipe labellisée Ligue 2013, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice, France

11 Université de Nice Sophia-Antipolis, UFR Médecine, Nice, France

12 CHU Nice, Service de Dermatologie, Nice, France

13 APHP, INSERM U976, Saint Louis Hospital Pharmacology-Genetic Laboratory Paris, Paris, France

14 Department of Pathology, INSERM U1165, Université Paris Diderot, AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

15 Department of Dermatology, APHP, Saint Louis Hospital, Paris, France

16 INSERM U976, University Paris 7 Diderot, Paris, France

17 Institut Universitaire de France, Paris, France

*Corresponding author. Tel: +33 478782667; E-mail: alain.puisieux@lyon.unicancer.fr

**Corresponding author. Tel: +33 426556740; E-mail: julie.caramel@lyon.unicancer.fr

extend median progression-free survival, from 7.3 months in the vemurafenib monotherapy group to 11.4 months in the combination therapy group (Robert *et al*, 2015). However, combination therapy does not prevent the appearance of acquired resistance (Flaherty *et al*, 2012), through genetic mechanisms resembling those described during monotherapy (Long *et al*, 2014; Moriceau *et al*, 2015). Moreover, no clear mutational mechanism is found in up to forty percent of resistant melanomas (Hugo *et al*, 2015), indicating that transcriptomic or epigenetic alterations may underlie acquired MAPK inhibitor (MAPKi) resistance. Therefore, identification of non-genomic mechanisms may lead to the design of more efficient combination therapies.

We and others have recently demonstrated the role of epithelial–mesenchymal transition-inducing transcription factors (EMT-TFs) in the development of melanoma (Shirley *et al*, 2012; Caramel *et al*, 2013; Denecker *et al*, 2014; Tulchinsky *et al*, 2014). EMT is a reversible embryonic process that is often aberrantly reactivated during the progression of carcinomas (Trimboli *et al*, 2008; Morel *et al*, 2012), where it promotes invasion and metastatic dissemination (Thiery *et al*, 2009). More recently, we and others have shown that EMT-TFs of the ZEB, SNAIL, and TWIST families act as genuine oncogenic factors in epithelial cells, promoting cell transformation, stemness (Mani *et al*, 2008; Morel *et al*, 2008) and carcinoma initiation *in vivo* (Liu *et al*, 2014; Puisieux *et al*, 2014; Beck *et al*, 2015). ZEB1 is the main regulator of breast cancer cell plasticity enabling the reversible conversion of non-CSCs (cancer stem cells) into CSCs (Chaffer *et al*, 2013). EMT commitment has also been shown to promote resistance to treatment, establishing a link with the resistant phenotype of CSCs (Polyak & Weinberg, 2009; Singh & Settleman, 2010; Mallini *et al*, 2014; Tan *et al*, 2014). However, the epithelial phenotype was instead associated with resistance to cisplatin in ovarian carcinoma, therefore highlighting cancer type dependency and drug specificity (Tan *et al*, 2014; Miow *et al*, 2015).

Conversely to what has been reported for carcinoma, not all EMT-TFs exhibit oncogenic functions in melanoma. Indeed, ZEB2 and SNAIL2 are expressed in normal adult melanocytes, and a switch in EMT-TFs expression, characterized by a loss of ZEB2 and SNAIL2 and an upregulation of ZEB1 and TWIST1, occurs during melanoma progression (Shirley *et al*, 2012; Caramel *et al*, 2013; Denecker *et al*, 2014; Tulchinsky *et al*, 2014). This reversible switch is regulated by the MAPK pathway, at least in part through the AP1 JUN-FRA1 transcriptional complex, and represents a major risk factor for a poor outcome in melanoma patients.

We herein wondered whether high ZEB1/TWIST1 expression may be associated with the resistance to MAPKi in melanoma, with

the final aim of testing whether targeting these factors in combination with MAPKi could prevent the emergence of resistance. We uncovered that high ZEB1 expression levels were associated with inherent resistance to MAPKi in *BRAF*^{V600}-mutated cell lines and tumors. Moreover, ZEB1 expression level was increased in melanoma cell lines with acquired resistance to BRAFi and in biopsies from patients relapsing while under BRAFi treatment. We further demonstrated that *ZEB1* overexpression in melanoma cell lines triggered the emergence of resistance to MAPKi by promoting the reversible conversion of a *MITF*^{high}/*p75*^{low} differentiated state into a *MITF*^{low}/*p75*^{high} stem-like and tumorigenic state. Consequently, the inhibition of ZEB1 sensitized naive melanoma cells to BRAFi, prevented the emergence of resistance following chronic exposure to BRAFi *in vitro*, and induced cell death in resistant melanoma cells. Collectively, these data highlight the role of ZEB1 as a major driver of phenotype switching in melanoma cells, providing them with a resistance to MAPKi.

Results

High levels of ZEB1 expression are correlated with low MITF levels and are associated with inherent resistance to MAPKi in *BRAF*^{V600}-mutated melanoma cell lines

The microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*) is the master regulator of melanocyte development, and *MITF* expression levels tightly regulate and control the phenotype of melanoma cells (Hoek & Goding, 2010). Indeed, according to the *MITF* rheostat model, *MITF* regulates the transition from a differentiated, cell cycle-arrested phenotype (*MITF*^{high}) to a proliferative phenotype (intermediate *MITF*) and then to a quiescent stem-like phenotype (*MITF*^{low}). Interestingly, previous expression microarray profiling of murine immortalized melan-a cells revealed that the ectopic expression of *ZEB1* or *TWIST1* induces the downregulation of *MITF* (Caramel *et al*, 2013). Taking these findings into consideration, we analyzed the crosstalk between EMT-TFs and *MITF* in human melanoma cells. We found a strong inverse correlation between the mRNA expression of *ZEB1* and *MITF* in melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE), regardless of their *BRAF*/*NRAS* mutational status ($n = 61$, $P = 4.08E-11$; Fig 1A). As expected from our previous results (Caramel *et al*, 2013), the level of *ZEB2* expression was inversely correlated with *ZEB1* and thus positively associated with *MITF* (Appendix Fig S1). In contrast, the expression of *TWIST1* showed no significant correlation with that of *MITF*

Figure 1. High levels of ZEB1 expression are correlated with low MITF levels and are associated with inherent resistance to MAPKi in *BRAF*^{V600}-mutated melanoma cell lines.

- A *MITF* mRNA expression according to ZEB1 expression levels in 61 melanoma cell lines available through the CCLE (Pearson correlation test).
- B ZEB1, ZEB2, TWIST1, and *MITF* expression in a panel of *BRAF*^{V600}-mutated melanoma cells assessed by Western blot. GLO and C-09.10 cells are patient-derived short-term cultures. Actin was used as a loading control.
- C Quantitative PCR analyses of *ZEB1*, *ZEB2*, *TWIST1*, and *MITF* in the same panel of cell lines. mRNA expression levels are represented relative to C-09.10 cells, in which the levels were arbitrarily fixed at 1 ($n = 3$, mean \pm SD). The dotted line separates *ZEB1*^{high} (left) and *ZEB1*^{low} (right) cell lines.
- D *ZEB1*, *ZEB2*, *TWIST1*, and *MITF* mRNA expression according to the IC₅₀ of the drug (μ M) administered (BRAFi/MEKi), in melanoma cell lines from the CCLE ($n = 28$) (Tukey box plot, Student's *t*-test). High *ZEB1*, low *ZEB2*, and low *MITF* expression levels were correlated with BRAFi (PLX4720) and MEKi (AZD6244) resistance. PLX4720 is an analog of PLX4032.
- E IC₅₀ values of PLX4032 (μ M) in the panel of *BRAF*^{V600} melanoma cells as determined by ATP assay ($n = 3$, mean \pm SD). For SKMEL24 and WM793, IC₅₀ was $> 8 \mu$ M.

Source data are available online for this figure.

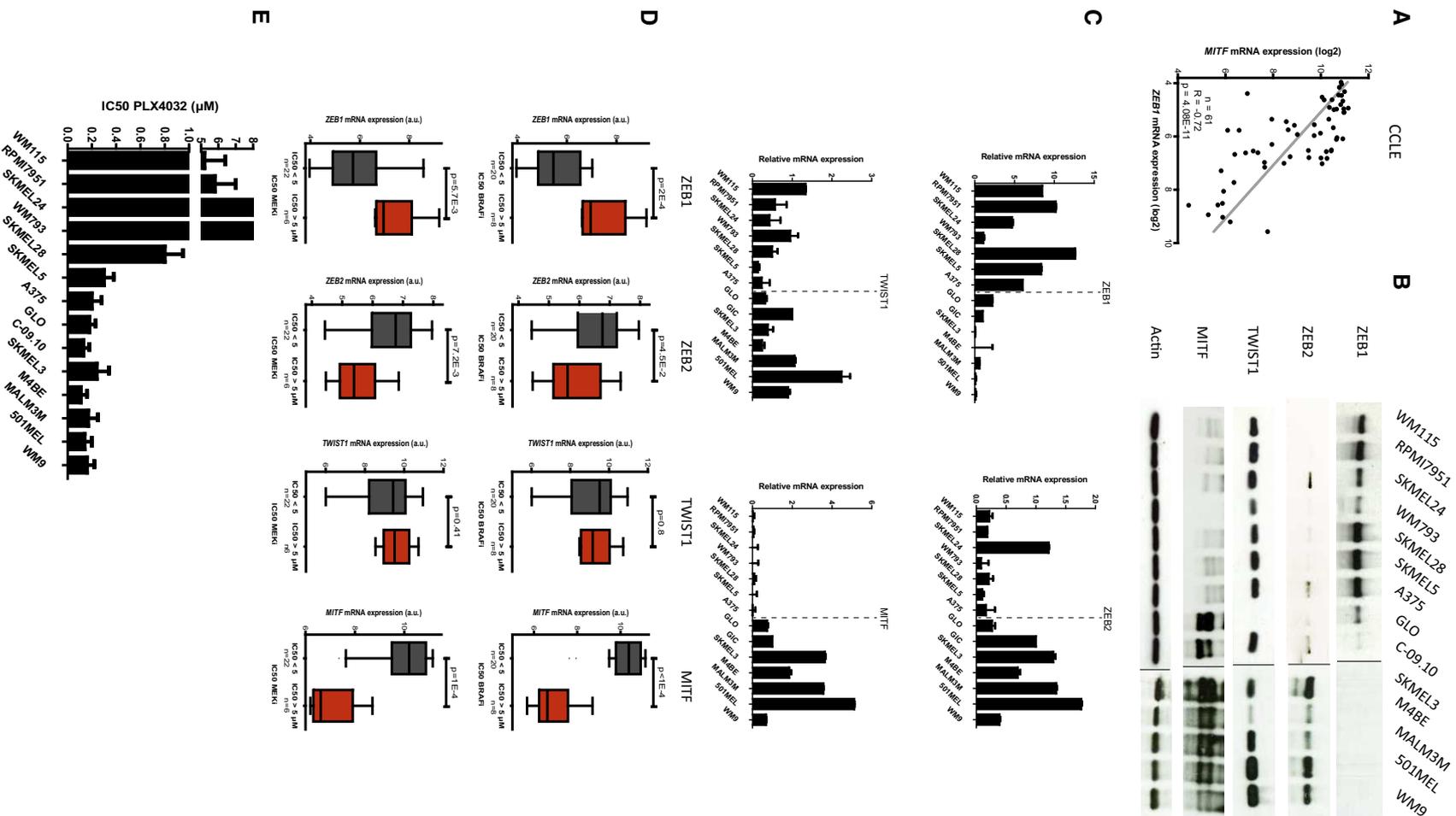


Figure 1.

(Appendix Fig S1). We then confirmed these results by conducting quantitative PCR (Q-PCR) and Western blot analyses in a panel of 14 *BRAF*^{V600}-mutated human melanoma cell lines, including two short-term cultures established from patients with melanomas displaying similar mutations (GLO and C-09.10; Fig 1B and C). We observed an inverse correlation between the levels of ZEB1 and those of ZEB2 and MITF, while TWIST1 protein levels were generally high in all of these cell lines and were not correlated with MITF (Fig 1B and C).

An increase in the expression of MITF was previously reported to contribute to tumor progression and resistance to BRAFi in a subset of melanomas (Johannessen *et al*, 2013), whereas low levels of MITF expression were shown to predict intrinsic MAPKi resistance (Konieczkowski *et al*, 2014; Muller *et al*, 2014), highlighting the dual function of this factor. We thus investigated whether the sensitivity of 28 *BRAF*^{V600}-mutated melanoma cell lines from the CCLE to BRAFi and MEKi was correlated with their EMT-TF/MITF expression profiles. We observed a significant inverse correlation between the level of *ZEB1* mRNA and sensitivity to the BRAFi PLX4720 ($n = 28$, $P = 2E-4$), with BRAFi-insensitive cell lines displaying the highest *ZEB1* expression levels (Fig 1D, Appendix Fig S1). A similar correlation was observed for *ZEB1* and inherent resistance to the MEKi AZD6244 ($P = 5.7E-3$; Fig 1D, Appendix Fig S1). In contrast, high levels of *ZEB2* expression were correlated with low levels of *ZEB1* expression and with a higher sensitivity to BRAFi and MEKi (Fig 1D, Appendix Fig S1). No correlation with *TWIST1* was observed (Fig 1D, Appendix Fig S1), indicating that not all EMT-TFs are implicated in the regulation of MAPKi sensitivity in melanomas. As previously suggested (Konieczkowski *et al*, 2014; Muller *et al*, 2014), low *MITF* levels were associated with intrinsic resistance to MAPKi in these cell lines. We then validated these findings in our panel of *BRAF*^{V600}-mutated melanoma cell lines, by determining the IC₅₀ of PLX4032. To do so, we performed ATP assays, in which melanoma cells were treated with this drug, at a dose ranging from 1 nM to 10 μM, for 72 h. The IC₅₀ for PLX4032 was generally higher in the *ZEB1*^{high}/*MITF*^{low} cell lines, compared to the *ZEB1*^{low}/*MITF*^{high} cell lines (Fig 1E). Overall, these *in silico* and *in vitro* data demonstrate that cell lines intrinsically resistant to MAPKi exhibit a *ZEB1*^{high}/*MITF*^{low} profile.

High ZEB1 and low MITF levels are associated with inherent resistance to MAPKi in *BRAF*^{V600}-mutated melanoma tumors in patients

We then investigated the relevance of these *in vitro* observations in human melanoma samples. The correlation between high *ZEB1* and

low *MITF* expression was confirmed in a collection of 467 primary and metastatic melanomas from The Cancer Genome Atlas (TCGA; Cerami *et al*, 2012; Gao *et al*, 2013; The Cancer Genome Atlas Network, 2015) ($P < 2.2E-16$; Fig 2A). Interestingly, in this cohort, *ZEB1* expression was higher in *BRAF*^{V600} or *NRAS*^{Q61R}-mutated melanomas compared to *BRAF*/*NRAS* WT tumors (Appendix Fig S2), which corroborates the involvement of the MAPK pathway in the regulation of *ZEB1*. To determine whether the levels of *ZEB1* and *MITF* were predictive of the patients' response to MAPKi, we performed immunohistochemical staining for *ZEB1*, *MITF* but also *TWIST1* on a cohort of 70 human *BRAF*^{V600} melanoma samples from patients whose response to the treatment was known. Thirty patients presented a primary resistance (initial non-responders), and 40 were initial responders but relapsed during their treatment with MAPKi (developing acquired resistance). Sixteen of those patients received combined treatment with the MEK inhibitor cobimetinib. In some cases, *ZEB1* staining was observed as a gradient from superficial to deep sites (Fig 2B), as previously described (Caramel *et al*, 2013). Interestingly, in other cases, *ZEB1* was not only detected in the invasive front but also in the bulk of the tumor (Fig 2C), suggesting that in addition to its role in promoting tumor invasion, it may also be implicated in tumor development. Regarding *MITF* staining, approximately half of the samples presented a strong and homogeneous expression of *MITF*, while heterogeneous staining was observed in the second half, with clones exhibiting a loss of or low levels of the *MITF* protein. In most of those cases, a lower level of *MITF* was found in a gradient from superficial to deep sites and was correlated with higher levels of *ZEB1* (Fig 2B). Of note, the faint *ZEB1*/*MITF* correlation obtained from the TCGA compared to that observed in cell lines may be due to *ZEB1*/*MITF* intra-tumoral heterogeneity. Interestingly, *TWIST1* was also detected in most of the *ZEB1*-positive cases, although the intensity and percentage of positive cells were generally lower for *TWIST1* compared to *ZEB1* (Fig EV1A). Once again, the *TWIST1* levels within the tumors were not correlated with *MITF* levels.

In order to correlate the variation in *ZEB1* levels with the response to treatment, a *ZEB1* staining score was defined based on the intensity and percentage of positive cells. The samples were divided into three groups (Fig 2C): "*ZEB1*^{high}" was defined as tumors with 80–100% positive cells showing a strong staining intensity, "*ZEB1*^{int}" (intermediate) included samples with 40–60% positivity with a moderate intensity and 60–80% positivity with a low intensity, whereas "*ZEB1*^{low}" corresponded to samples with fewer than 40% positive cells with a low to moderate intensity. Interestingly, most *ZEB1*^{high} melanoma samples were in the primary

Figure 2. High ZEB1 and low MITF levels are associated with inherent resistance to MAPKi in *BRAF*^{V600}-mutated melanoma tumors.

- MITF* mRNA expression levels according to *ZEB1* expression in 467 melanoma tumors from the TCGA data set (Pearson correlation test).
- Representative pictures of *ZEB1* and *MITF* immunostaining in primary melanomas. Scale bar = 40 μm. The aberrant activation of *ZEB1* in melanomas is correlated with a *MITF*^{low} phenotype.
- Representative pictures of *ZEB1* immunostaining in *BRAF*^{V600} tumors from patients, classified into *ZEB1*^{high}, *ZEB1*^{int}, and *ZEB1*^{low} subgroups based on the intensity of *ZEB1* staining and on the percentage of cells positive for *ZEB1*. Scale bar = 80 μm.
- Pie charts representing the distribution of *ZEB1* alone (upper part), or *ZEB1* and *TWIST1* (lower part) immunohistochemical staining in tumors according to their initial response to vemurafenib ± cobimetinib treatment. *ZEB1* ± *TWIST1* levels are higher in MAPKi primary resistant melanomas (initial non-responders) compared to tumors that initially respond to treatment ($n = 70$, Fisher's exact test).
- Representative pictures of *ZEB1* and *MITF* immunostainings, before and after vemurafenib treatment, in the tumor from patient 1, exhibiting primary resistance to BRAFi. Scale bar = 80 μm. Right: Magnification of *MITF*^{high} and *MITF*^{low} clones in the resistant tumor under treatment. Arrows indicate endothelial and stromal cells that also show positive staining for *ZEB1*, besides tumor cells.

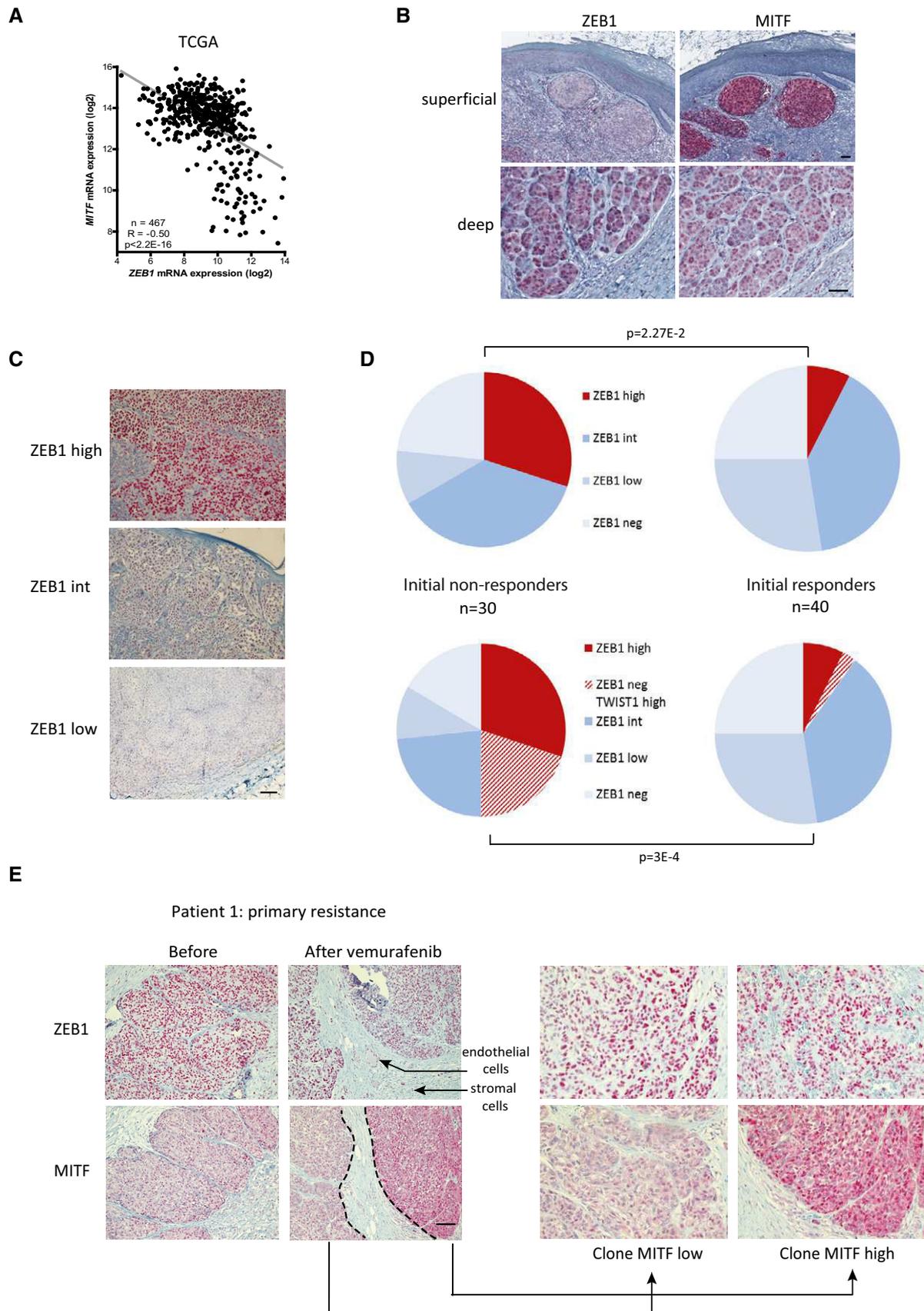


Figure 2.

resistance group (Fig 2D). Thirty percent of primary resistant melanomas exhibited high levels of endogenous ZEB1, compared to only 7.5% of the initially responding tumors ($P = 2.27E-2$; Fig 2D). Moreover, the samples with high levels of ZEB1 exhibited low levels of MITF (patient 1, before treatment, Fig 2E). Interestingly, a significant proportion of ZEB1-negative melanoma samples from patients with primary resistance displayed strong TWIST1 staining. Collectively, 50% of primary resistant melanomas exhibited a strong staining for ZEB1 and/or TWIST1. Thus, initial high levels of endogenous ZEB1 and/or TWIST1 were associated with primary resistance to treatment ($P = 3E-4$; Fig 2D). Moreover, biopsies conducted after vemurafenib treatment confirmed that a high level of ZEB1 was maintained in three of three sample pairs (patient 1, after vemurafenib, Fig 2E). Altogether, an inverse correlation was observed between ZEB1 and MITF levels in $BRAF^{V600}$ -mutated melanoma at the intra-tumoral level, and this $ZEB1^{high}/MITF^{low}$ profile showed a trend toward intrinsic resistance to MAPKi.

ZEB1 expression is activated in melanoma cell lines with acquired resistance to BRAFi and in biopsies from patients relapsing while under treatment

To investigate the putative role of ZEB1 in the development of acquired resistance to BRAFi, we established two lines of BRAFi-resistant melanoma cells. A375 and SKMEL5 human $BRAF^{V600}$ melanoma cells were treated with increasing doses of PLX4032 for 8 weeks to generate resistant cell lines, subsequently referred to as A375-R and SKMEL5-R. These cells exhibited a 10-fold increase in their IC_{50} value for PLX4032 compared with the sensitive parental cells (Fig 3A). The resistant cells displayed a strong increase in their levels of ZEB1 protein and mRNA compared to their parental counterparts (Fig 3B and C). The protein levels of the FRA1 transcription factor, a known inducer of *ZEB1* in melanomas, also increased, whereas TWIST1 was not affected. It is worth noting that *MITF* mRNA levels were lost in A375-R but increased in SKMEL5-R (Fig 3C). We also established two BRAFi-resistant short-term cultures from ascites of $BRAF^{V600}$ -mutated patients, which had acquired a resistance to vemurafenib (GOKA and ESP). These patients initially responded to BRAFi but became resistant within a few months after the onset of the treatment. These BRAFi-resistant cells exhibited a high level of ZEB1 expression equivalent to that of resistant A375-R and SKMEL5-R cells (Fig 3B and C). Immunohistochemical analyses of a metastatic melanoma sample from the patient, from whom the ESP cells were established, revealed low ZEB1 and TWIST1 protein levels before treatment (Fig EV1C), confirming the increase in ZEB1 expression upon acquisition of resistance to vemurafenib. The level of *MITF* mRNA expression was low in GOKA but remained elevated in resistant ESP cells, while ZEB1 was high in all of these *in vitro* resistant models (Fig 3C).

To assess the relevance of our findings in a physiologically more relevant setting, we investigated the levels of ZEB1 and TWIST1 expression in tumors from a cohort of patients before and after vemurafenib treatment. In five out of eight matched pre-treatment and post-relapse sample pairs of acquired resistance, either ZEB1 proteins appeared or their levels had further increased (Fig 3D). In the samples obtained from an initially responding patient, both ZEB1 and TWIST1 were present at low levels and then increased significantly in the relapsed tumor after treatment, in terms of both

the intensity and percentage of positive cells, which changed from 10% to 80% (patient 4, Figs 3D and EV1B). We observed a decrease in MITF levels after treatment in two out of eight patients (some clones of patient 1, Fig 2E), while these levels were maintained (patient 2, Fig 3D) or increased (patients 3 and 4, Fig 3D) in most melanoma relapse samples after vemurafenib treatment. High levels of ZEB1 protein could be detected in both $MITF^{high}$ and $MITF^{low}$ clones after vemurafenib treatment, even within the same tumor (patient 1, Fig 2E). Overall, our findings indicate that increased ZEB1 expression is a common event in acquiring resistance to vemurafenib but is not necessarily associated with a loss in MITF expression *in vitro* or in tumors from patients. These observations suggest that the function of ZEB1 in MAPKi resistance may be mediated by MITF-dependent and MITF-independent mechanisms. This prompted us to investigate how ZEB1 promotes intrinsic or acquired resistance to MAPKi in $BRAF^{V600}$ -mutant melanoma.

ZEB1 overexpression promotes stemness properties, tumorigenic capacity, and resistance to MAPKi

To further investigate the functions of ZEB1 in the modulation of melanoma cell plasticity and resistance to MAPKi, we selected two $ZEB1^{high}/MITF^{low}$ human melanoma cell lines (A375 and SKMEL5), two $ZEB1^{low}/MITF^{high}$ short-term cultures (C-09.10 and GLO), and one $ZEB1^{low}/MITF^{high}$ cell line (501MEL) (Fig 1B). *ZEB1* was ectopically expressed in these different models by infecting cells with *ZEB1*-expressing retroviruses. First, in A375 and SKMEL5, although already expressing ZEB1, its expression level could still be significantly increased (Fig 4A, Appendix Fig S3A) and proliferation was not affected. ZEB1 ectopic expression triggered a downregulation of *MITF* (Fig 4B and Appendix Fig S3B) as well as upregulation of *ZEB2* (Appendix Fig S4A). In addition to low levels of MITF, different markers, including ABCB5 and JARID1B (Schatten *et al*, 2008; Roesch *et al*, 2010), have been associated with the generation of melanoma-initiating cells. Therefore, we analyzed the expression of these two factors by Q-PCR and uncovered an activation following the ectopic expression of *ZEB1* (Fig 4B). Analyses of the expression of the neural crest cell marker p75/CD271, another melanoma-initiating cell marker (Boiko *et al*, 2010; Civenni *et al*, 2011), by Western blot and Q-PCR, consistently revealed its upregulation in A375 and SKMEL5 cells that overexpressed *ZEB1* (Fig 4A and B, Appendix Fig S3B). Moreover, p75 mRNA expression was positively correlated with *ZEB1* in melanoma samples from the TCGA ($R = 0.29$; $P = 1.16E-10$; Appendix Fig S5). Moreover, expression levels of some invasion markers, such as *Vimentin*, *SPARC*, or *MMP1*, were slightly induced in *ZEB1*-overexpressing cells, while *AXL* and *WNT5A* levels were not modified (Appendix Fig S4B).

We then analyzed the oncogenic functions of ZEB1 in melanoma cells. *ZEB1* overexpression promoted the growth of A375 and SKMEL5 cells in a semi-solid medium (Fig 4C, Appendix Fig S3C). A 50% increase in the number of colonies growing from cells overexpressing *ZEB1* was observed compared to control cells, and was associated with a concomitant increase in the size of the colonies. Xenograft experiments in nude mice were performed with control or *ZEB1*-overexpressing A375 cells and revealed a significant increase in tumor growth in the latter case (Fig 4D). Next, we examined whether the ectopic expression of *ZEB1* could enhance adaptive resistance to BRAFi. A375 and SKMEL5 cells were treated with

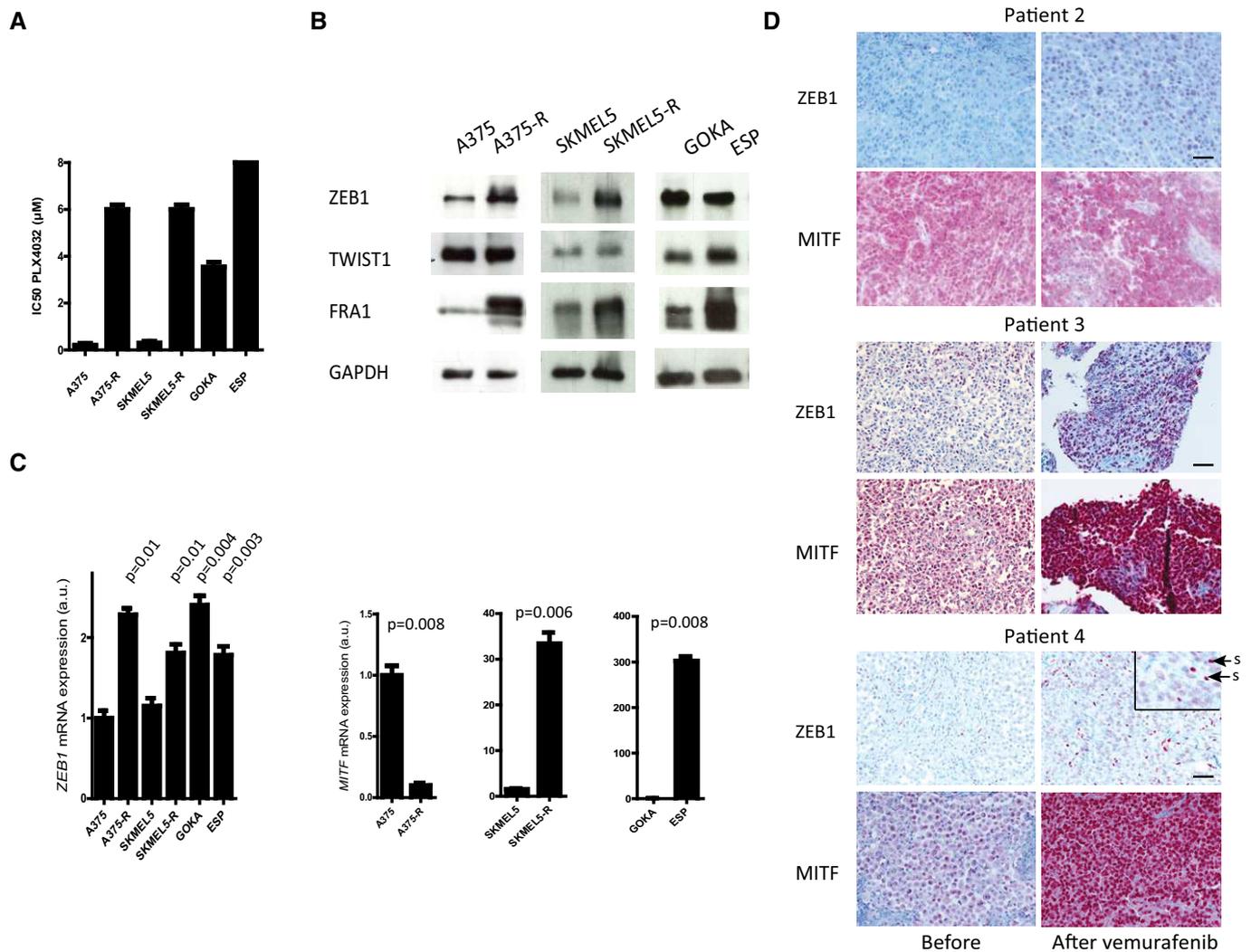


Figure 3. ZEB1 expression is activated in *BRAF*^{V600E}-mutated melanoma cell lines with acquired resistance to BRAFi and in biopsies from patients relapsing while under treatment.

A PLX4032 IC₅₀ (µM) of sensitive A375 and SKMEL5 and resistant (A375-R, SKMEL5-R) cell lines, as well as of GOKA and ESP cells, two BRAFi-resistant patient-derived short-term cultures, as determined by ATP assay ($n = 3$, mean \pm SD). For ESP, IC₅₀ was > 8 µM.

B Western blot analyses of ZEB1, TWIST1, and FRA1 in A375-R and SKMEL5-R versus the parental naive cells, and in GOKA and ESP cells. GAPDH was used as a loading control.

C Quantitative PCR analyses of *ZEB1* and *MITF* in A375-R and SKMEL5-R versus the parental naive cells, and in GOKA and ESP cells. mRNA expression levels are represented as arbitrary units (a.u.). Statistical difference relative to sensitive A375 cells is shown ($n = 3$, mean \pm SD, Student's *t*-test).

D Representative pictures of ZEB1 and MITF immunostainings in tumors from patients 2, 3, and 4, before and after vemurafenib treatment. Scale bars = 40 µm. For ZEB1 staining in patient 4, the inset shows a magnification. Arrows point at stromal cells (s). All other cells positive for ZEB1 are tumor cells.

Source data are available online for this figure.

PLX4032 at the IC₅₀ dose of the control cells (150 or 300 nM, respectively), which led to the inhibition of the MAPK pathway, as assessed by a reduction in the level of ERK phosphorylation (Fig 4E). The levels of ZEB1 and TWIST1 decreased upon treatment with PLX4032 in the control cells, whereas the level of MITF increased, which is consistent with the role of the MAPK pathway in the modulation of the two EMT-TFs. Furthermore, the level of ZEB1 remained higher in *ZEB1*-overexpressing cells compared with control cells, upon treatment with PLX4032 (Fig 4E). We then analyzed the surface distribution of p75 in the different cell

populations by flow cytometry. ZEB1-mediated conversion into a p75^{high} phenotype was significantly potentiated in A375 (Fig 4F) and SKMEL5 cells (Appendix Fig S3D) following their treatment with PLX4032 for 10 days, indicating an early adaptation to the drug. These results suggested that ZEB1 induces a reprogramming of the cells upon BRAF inhibition and that ZEB1^{high} cells are prone to induce a p75^{high} stem-like phenotype in response to treatment with PLX4032.

To investigate the role of p75 in the ZEB1-mediated phenotype, siRNA experiments against *p75* were performed in A375 cells

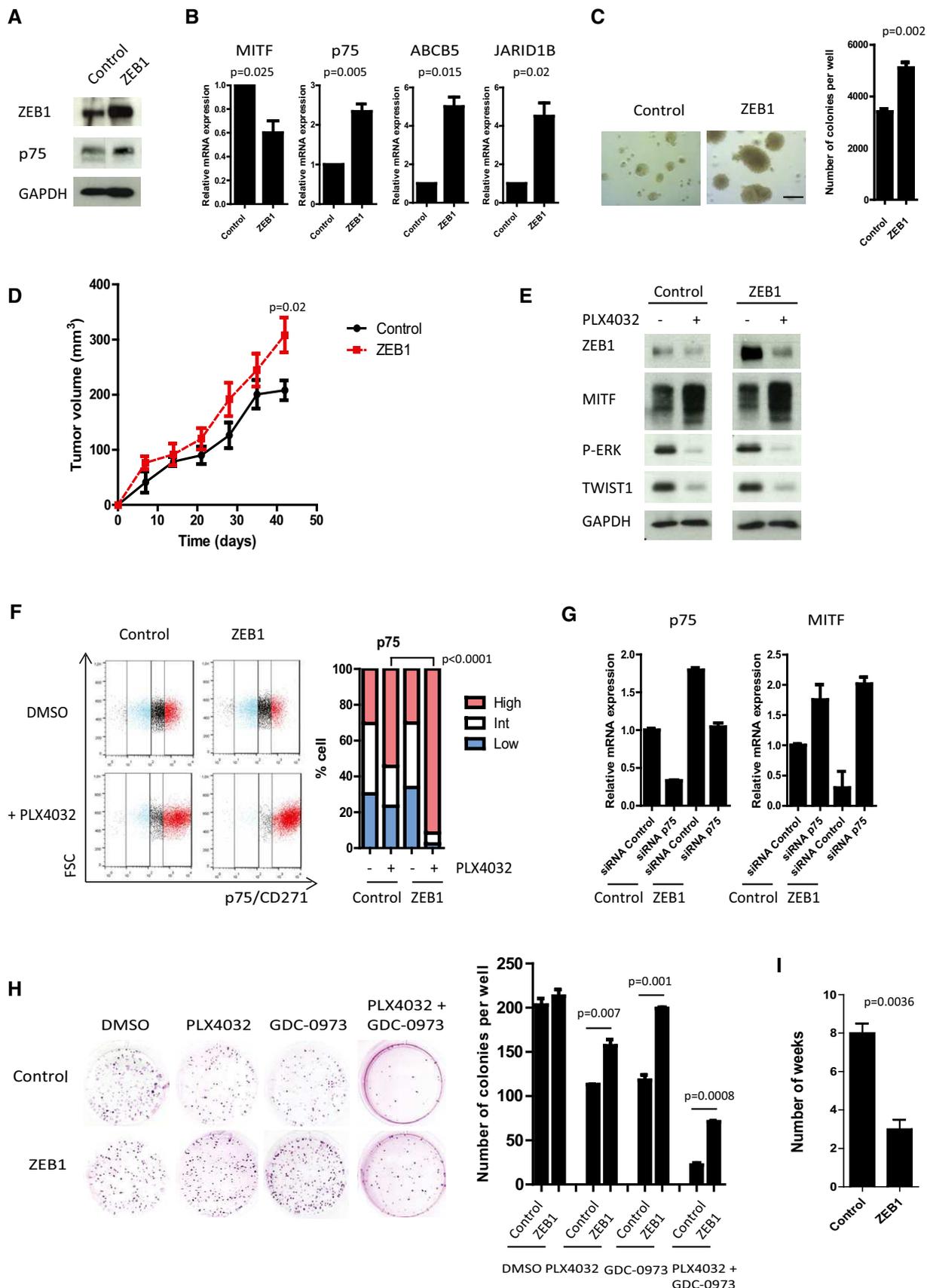


Figure 4.

Figure 4. ZEB1 overexpression in A375 melanoma cells potentiates the conversion into a MITF^{low}/p75^{high} stem-like tumor initiating phenotype, and promotes resistance to MAPKi.

- A A375 cells were infected with retroviruses expressing ZEB1. Western blot analyses of ZEB1 and p75. GAPDH was used as a loading control.
- B Quantitative PCR analyses of *MITF*, *p75*, *ABC5*, and *JARID1B* upon ZEB1 expression. mRNA expression levels are represented relative to control cells, in which the levels were fixed at 1 (mean \pm SD, $n = 3$, Student's *t*-test).
- C Soft agar colony formation assay upon ZEB1 expression. Scale bar = 200 μ m. Histograms represent quantitative analyses (mean \pm SD, $n = 3$, Student's *t*-test).
- D 2×10^6 control or ZEB1-overexpressing A375 cells were injected subcutaneously into nude mice. The mean tumor volume for five mice is represented \pm SEM (Student's *t*-test, *P*-value at 42 days).
- E Western blot analyses of ZEB1, MITF, P-ERK, and TWIST1 levels in control or ZEB1-expressing cells \pm 150 nM PLX4032 treatment for 24 h. GAPDH was used as a loading control.
- F FACS analyses of p75 cell surface expression upon ZEB1 overexpression, after 10 days with or without 150 nM PLX4032 treatment. Bar chart representing the mean percentage of p75^{high}, p75^{int}, and p75^{low} cells from two independent experiments (Fisher's exact test).
- G Control or ZEB1-overexpressing A375 cells were transfected with control or p75-siRNA. *p75* and *MITF* expression levels were analyzed by quantitative PCR after 48 h. mRNA expression levels are represented relative to cells transfected with control siRNA, in which the levels were fixed at 1 (mean \pm SD, $n = 2$).
- H Clonogenic assay \pm PLX4032 (150 nM), \pm GDC-0973 (5 nM) treatment for 10 days. The graphs represent the mean number of colonies (\pm SD) in three independent experiments (Student's *t*-test).
- I Number of weeks of chronic exposure to PLX4032 before emergence of resistance in control or ZEB1-expressing cells (mean \pm SD, $n = 3$, Student's *t*-test).

Source data are available online for this figure.

(Fig 4G). The knockdown of *p75* in ZEB1-overexpressing A375 cells resulted in a level of *p75* equivalent to that in control cells. The knockdown of *p75* induced an increase in *MITF* expression levels in ZEB1-expressing cells similar to that in control cells, thus suggesting that ZEB1-mediated downregulation of *MITF* is dependent on *p75*. We conclude that *p75* is at least responsible for part of the effects associated with ZEB1.

Next, we showed that the ability of ZEB1-overexpressing A375 and SKMEL5 cells to grow in a clonogenic assay was only moderately affected in the presence of PLX4032 over the 10-day experimental time course, whereas the number of colonies drastically decreased in the case of the control cells (Fig 4H, Appendix Fig S3E). Concordantly, chronic treatment of A375 and SKMEL5 cells with PLX4032 demonstrated that ZEB1 overexpression favored the emergence of resistance *in vitro*. Indeed, in the presence of ZEB1, the PLX4032 dose had to be increased more rapidly and led to the emergence of resistant clones after only 3 weeks, in comparison with the 8 weeks required for the control cells (Fig 4I). Finally, since MEKi are now routinely used in clinical applications in combination with BRAFi, we investigated whether ZEB1 could also promote resistance to the combined PLX4032 and GDC-0973 (cobimetinib) treatment, and found that ZEB1-expressing A375 (Fig 4H) and SKMEL5 cells (Appendix Fig S3E) were also more resistant to this combined treatment. Collectively, these data indicated that the ectopic expression of ZEB1 drives the emergence of resistance upon chronic exposure to MAPKi by exacerbating a MITF^{low}/p75^{high} stem-like phenotype insensitive to treatment.

We then investigated the consequences of ectopically expressing ZEB1 in ZEB1^{low}/MITF^{high} cells. Surprisingly, in the ZEB1^{low}/MITF^{high} cell lines, such as 501MEL, ZEB1 overexpression was not sufficient to promote p75 expression, even upon PLX4032 treatment (Fig EV2A–C). However, ZEB1 expression increased the clonogenic growth of ZEB1^{low} 501MEL and, whereas PLX4032 treatment drastically inhibited the growth of control cells in soft agar, ZEB1-overexpressing cells were less sensitive to the BRAFi in this assay (Fig EV2D), suggesting that ZEB1 can promote resistance in this model without p75 induction.

Finally, to investigate the function of ZEB1 in physiological models with low levels of ZEB1 expression, the EMT inducer was ectopically expressed in two BRAF^{V600} patient-derived short-term

cultures, C-09.10 cells and GLO (Figs 5 and EV3). ZEB1 ectopic expression in C-09.10 cells led to a significant decrease in *MITF* levels and increase in *p75* levels (Fig 5A, B and D). Similarly in GLO cells, ZEB1 ectopic expression was shown to promote the conversion into a p75^{high} state, which was potentiated upon PLX4032 treatment (Fig EV3). ZEB1-induced phenotype switching was associated with an increased capacity to form colonies in soft agar (Fig 5C) and to resistance to BRAFi as assessed by a clonogenic assay in the presence of PLX4032 (Fig 5E). Results in these two short-term culture models therefore validated the conclusions obtained in established ZEB1^{high} cell lines, in a ZEB1^{low} context.

ZEB1 knockdown in BRAF^{V600} melanoma cells promotes cell differentiation and inhibits tumor growth

To assess the benefit of targeting ZEB1 as a therapeutic strategy, ZEB1 was knocked down in the ZEB1^{high} A375 and SKMEL5 cell lines by infecting cells with an shRNA-ZEB1-encoding retrovirus. Proliferation of the cells was not affected, and neither cellular senescence nor apoptosis was observed. An increase in *MITF* as well as ZEB2 and E-cadherin expression levels, and a decrease in *p75*, *ABC5*, and *JARID1B* levels were observed upon ZEB1 knockdown in A375 (Fig 6A–C and Appendix Fig S6) and SKMEL5 cells (Fig EV4). ZEB1 knockdown triggered the conversion into a p75^{low} profile, as assessed by flow cytometry (Figs 6C and EV4B). Moreover, a fivefold decrease in the number of colonies growing in soft agar was observed upon ZEB1 knockdown in those cell lines (Figs 6D and EV4C). We then examined whether the presence of ZEB1 was a requirement for the growth of malignant melanoma cells *in vivo*. As expected from previous data in melan-a and B16F10 murine cells (Caramel *et al*, 2013; Dou *et al*, 2014), ZEB1 knockdown in A375 cells prevented tumor initiation in nude mice (Fig 6E), clearly demonstrating that ZEB1 is required for the tumorigenic capacity of melanoma cells. We thus used IPTG-inducible shRNA-ZEB1 to evaluate the impact of ZEB1 knockdown on tumor shrinkage in established tumors. Two ZEB1-targeted shRNAs that consistently reduced the levels of endogenous ZEB1 protein upon IPTG treatment *in vitro* were used (Fig 6F). The A375 cells infected with the IPTG-inducible shRNA control or shRNA-ZEB1 were injected subcutaneously into nude mice. When tumors reached a

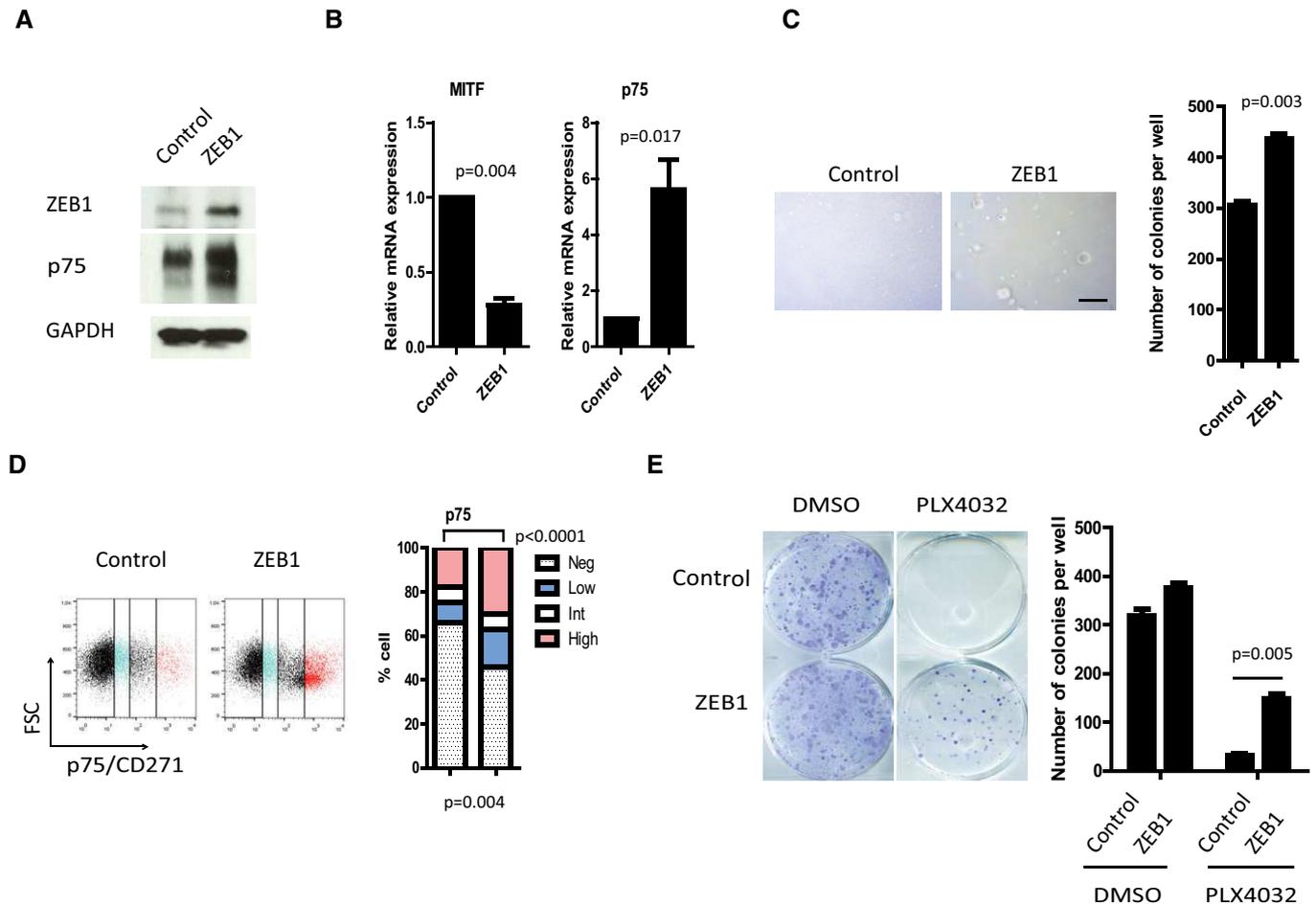


Figure 5. ZEB1 overexpression in patient-derived ZEB1^{low}/MITF^{high} short-term culture cells promotes the conversion into a MITF^{low}/p75^{high} stem-like phenotype, resistant to MAPKI.

C-09.10 short-term culture cells were infected with retroviruses expressing ZEB1.

A Western blot analyses of ZEB1 and p75. GAPDH was used as a loading control.

B Quantitative PCR analyses of *MITF* and *p75* upon ZEB1 expression. mRNA expression levels are represented relative to control cells (mean \pm SD, $n = 3$, Student's *t*-test).

C Soft agar colony formation assay following ZEB1 expression. Scale bar = 200 μ m. Histograms represent quantitative analyses (mean \pm SD, $n = 3$, Student's *t*-test).

D FACS analyses of p75 cell surface expression upon ZEB1 overexpression. Bar chart representing the mean percentage of p75^{high}, p75^{int}, p75^{low}, and p75^{negative} cells from two independent experiments (Fisher's exact test).

E Clonogenic assay \pm PLX4032 (100 nM) treatment for 10 days. The graph represents the mean number of colonies (\pm SD) in three independent experiments (Student's *t*-test).

Source data are available online for this figure.

diameter of 5 mm, the mice were given IPTG in their drinking water. ZEB1 knockdown led to a significant decrease in tumor growth, confirming the potent anti-tumor effect of ZEB1 inhibition (Fig 6F). Finally, to demonstrate the reversibility of the ZEB1-mediated phenotype switching, the expression of shRNA-ZEB1 was induced for 10 days (+IPTG) and ZEB1 expression was then reversed by removing IPTG for 10 days (-IPTG). Upon IPTG withdrawal, levels of ZEB1, MITF, and p75 returned to the basal levels in untreated cells (Fig 6G). Taken together with the results obtained following ZEB1 overexpression, our data indicate that ZEB1 drives the reversible conversion of MITF^{high}/p75^{low} differentiated into MITF^{low}/p75^{high} stem-like/initiating phenotypes, and regulates the subsequent tumorigenic capacity of melanoma cells.

ZEB1 knockdown sensitizes naive melanoma cells to BRAFi and decreases the viability of BRAFi-resistant melanoma cells

Next, we investigated whether knocking down ZEB1 in initially PLX4032-naive melanoma cell lines could increase their sensitivity to this drug. ZEB1 knockdown in sensitive ZEB1^{high} A375 and SKMEL5 melanoma cells inhibited colony formation in soft agar, to a similar extent to that observed with BRAF inhibition (60%). Importantly, the colony number was reduced by 90% in cells knocked down for ZEB1 following PLX4032 treatment, indicating a synergistic effect upon combined inhibition of BRAF and ZEB1 (Figs 7B and EV4C). This was associated with a concomitant decrease in the size of the colonies. We then analyzed the

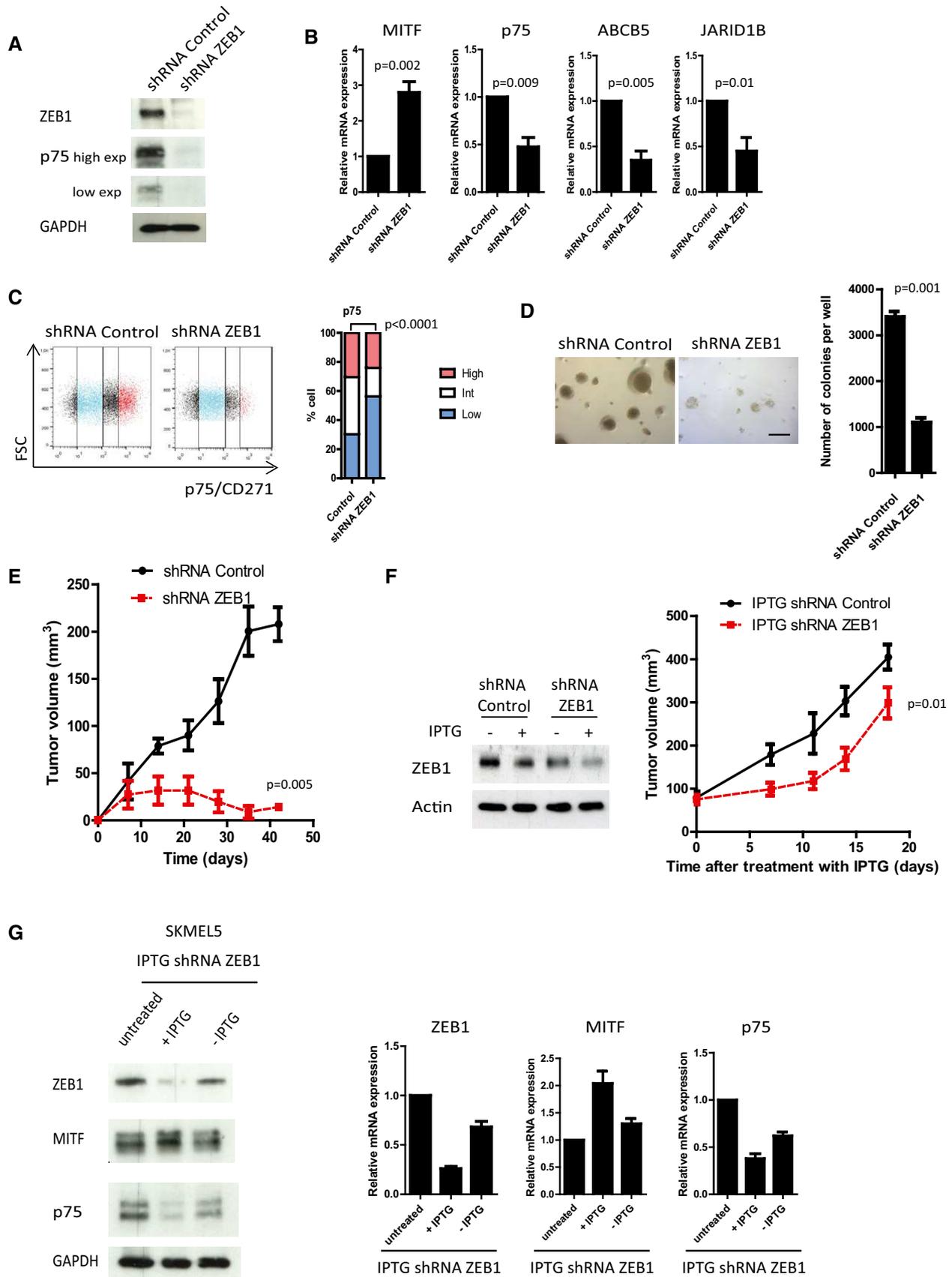


Figure 6.

Figure 6. ZEB1 knockdown in ZEB1^{high}/MITF^{low} melanoma cells promotes the reversible conversion into a MITF^{high}/p75^{low} differentiated phenotype and inhibits tumor growth *in vivo*.

A375 cells were infected with retroviruses expressing a shRNA control or shRNA-ZEB1.

- A Western blot analyses of ZEB1 and p75 upon ZEB1 knockdown. GAPDH was used as a loading control. High and low exposures (exp) for p75 are shown.
- B Quantitative PCR analyses of *MITF*, *p75*, *ABC5*, and *JARID1B* upon ZEB1 knockdown. mRNA expression levels are represented relative to shRNA control cells (mean \pm SD, $n = 3$, Student's *t*-test).
- C FACS analyses of p75 expression upon ZEB1 knockdown. Bar chart representing the mean percentage of p75^{high}, p75^{int}, and p75^{low} cells from two independent experiments (Fisher's exact test).
- D Soft agar colony formation assay upon ZEB1 knockdown. Scale bar = 200 μ m. Histograms represent quantitative analyses (mean \pm SD, $n = 3$, Student's *t*-test).
- E 2×10^6 shRNA control or shRNA-ZEB1 A375 cells were injected subcutaneously into nude mice. The mean tumor volume for five mice is represented (\pm SEM) (Student's *t*-test, *P*-value at 42 days).
- F A375 cells were infected with an IPTG-inducible shRNA-ZEB1. Left panel: Western blot analyses of ZEB1 expression \pm IPTG (100 μ M) treatment for 6 days. Actin was used as a loading control. Right panel: 2×10^6 IPTG-inducible shRNA control or shRNA-ZEB1 A375 cells were injected subcutaneously into nude mice. When the tumor reached 5 mm in diameter, ZEB1 expression was silenced by adding IPTG (10 mM) into the drinking water for 20 days. The mean tumor volume for five mice is represented (\pm SEM). (Student's *t*-test, *P*-value at 18 days).
- G SKMEL5 cells expressing an IPTG-inducible shRNA-ZEB1 were treated with IPTG (100 μ M) for 10 days (+IPTG), and then IPTG was removed (-IPTG) and ZEB1, MITF, and p75 expression levels were analyzed by Western blot and/or quantitative PCR analyses. GAPDH was used as a protein loading control, and mRNA expression levels are represented relative to untreated cells, in which the levels were fixed at 1 (mean \pm SD, $n = 2$).

Source data are available online for this figure.

efficacy of such a combination *in vivo* in SKMEL5 xenografts. Mice were treated with vemurafenib through daily oral administration. ZEB1 knockdown alone was as efficient as vemurafenib treatment in decreasing SKMEL5 xenografted tumor growth, but the combined inhibition of BRAF and ZEB1 did not lead to a further significant decrease in tumor growth (Fig EV4D). This finding does not preclude the hypothesis that ZEB1 inhibition prevents the emergence of resistant cells *in vivo*. Indeed, we could show *in vitro* that ZEB1 knockdown prevented the emergence of resistance upon chronic exposure to PLX4032 in A375 cells, with a significant delay until the emergence of resistant cells (Fig 7C).

Finally, we investigated whether ZEB1 expression was necessary for the survival of resistant melanoma cells. The consequences of ZEB1 knockdown were analyzed in a cell line intrinsically resistant to vemurafenib, the RPMI7951, which exhibits high levels of ZEB1 expression (Fig 1, Appendix Fig S1) as well as in the vemurafenib-acquired resistant cell lines A375-R and SKMEL5-R, and patient-derived GOKA and ESP cells. ZEB1 expression was rapidly downregulated following PLX4032 treatment in the parental naive A375 cells (Fig 7A), whereas a high level of ZEB1 expression was maintained in the resistant A375-R cells in the presence of 3 μ M PLX4032 (Fig 7D). In all these models, ZEB1 knockdown increased the sensitivity to PLX4032, resulting in a decreased clonogenic capacity (Fig 7E), which was associated with an apoptotic response upon co-treatment with BRAFi, as shown by an increase in the abundance of cleaved PARP in A375-R (Fig 7D). Moreover, p75 expression was decreased and MITF expression was increased upon ZEB1 knockdown in resistant ESP cells (Fig 7F). shRNA control or shRNA-ZEB1 ESP cells were then xenografted into nude mice and orally treated with IPTG \pm vemurafenib. While vemurafenib did not affect tumor growth of control resistant cells, ZEB1 inhibition alone or in combination with vemurafenib led to a significant decrease in tumor growth (Fig 7G). The efficacy of ZEB1 knockdown *in vivo* was assessed by Western blot and immunostaining directly in the tumors (Fig 7H). Overall, these data demonstrate that ZEB1 knockdown decreases the viability of resistant melanoma cells in both MITF^{low} (RPMI7951, A375-R, GOKA) and MITF^{high} (SKMEL5-R, ESP) cellular contexts.

Discussion

The aberrant activation of an epithelial–mesenchymal transition and the subsequent generation of a cancer stem cell phenotype are generally believed to foster therapy resistance in carcinoma (Singh & Settleman, 2010). Such a relationship was not previously investigated in melanoma, where the characterization of resistance mechanisms to BRAF and/or MEK inhibitors remains a major issue. Melanomas harbor a high level of intra-tumoral heterogeneity that relies on exacerbated cell plasticity, which drives the highly efficient reversible conversion between non-tumorigenic and tumorigenic states (Quintana *et al*, 2008, 2010; Meacham & Morrison, 2013). According to the concept of phenotype switching, tumor progression does not necessarily rely on clonal evolution but rather on the reversible reprogramming of signaling networks in large populations of cells. In parallel to “genetic” resistance to MAPKi, due to the acquisition of genetic mutations, affecting *NRAS* or *MEK* (Nazarian *et al*, 2010; Van Allen *et al*, 2014), the present study emphasizes melanoma cell plasticity as a potent driver of “phenotypic” resistance (Roesch, 2015). Our findings demonstrate that the ZEB1 transcription factor is a key determinant of melanoma phenotypic plasticity, tumorigenicity, and resistance to MAPKi, by fostering the adaptation to the therapeutic drugs. Data from cell lines and patients indicate that a subset of mutated BRAF melanomas with high levels of ZEB1 expression may be intrinsically insensitive to BRAFi and MEKi, suggesting that melanoma patients with high levels of ZEB1 expression may not benefit from MAPKi treatment. Analyses of larger patient cohorts are required to validate the use of ZEB1 as a predictive marker in order to stratify BRAF-mutated melanoma into MAPKi-sensitive and MAPKi-resistant subgroups. Moreover, ZEB1 increased expression is frequently observed after acquisition of resistance following chronic treatment with BRAFi. Functional studies revealed that ZEB1 overexpression is sufficient to drive the emergence of resistance to BRAFi alone or in combination with MEKi, whereas ZEB1 inhibition sensitizes naive melanoma cells to BRAFi, prevents the emergence of resistance upon chronic exposure *in vitro*, and decreases the viability of resistant cells. Since IC₅₀ values for PLX4032 were only moderately modified upon ZEB1 overexpression after 3 days of treatment in sensitive A375, C-09.10, or

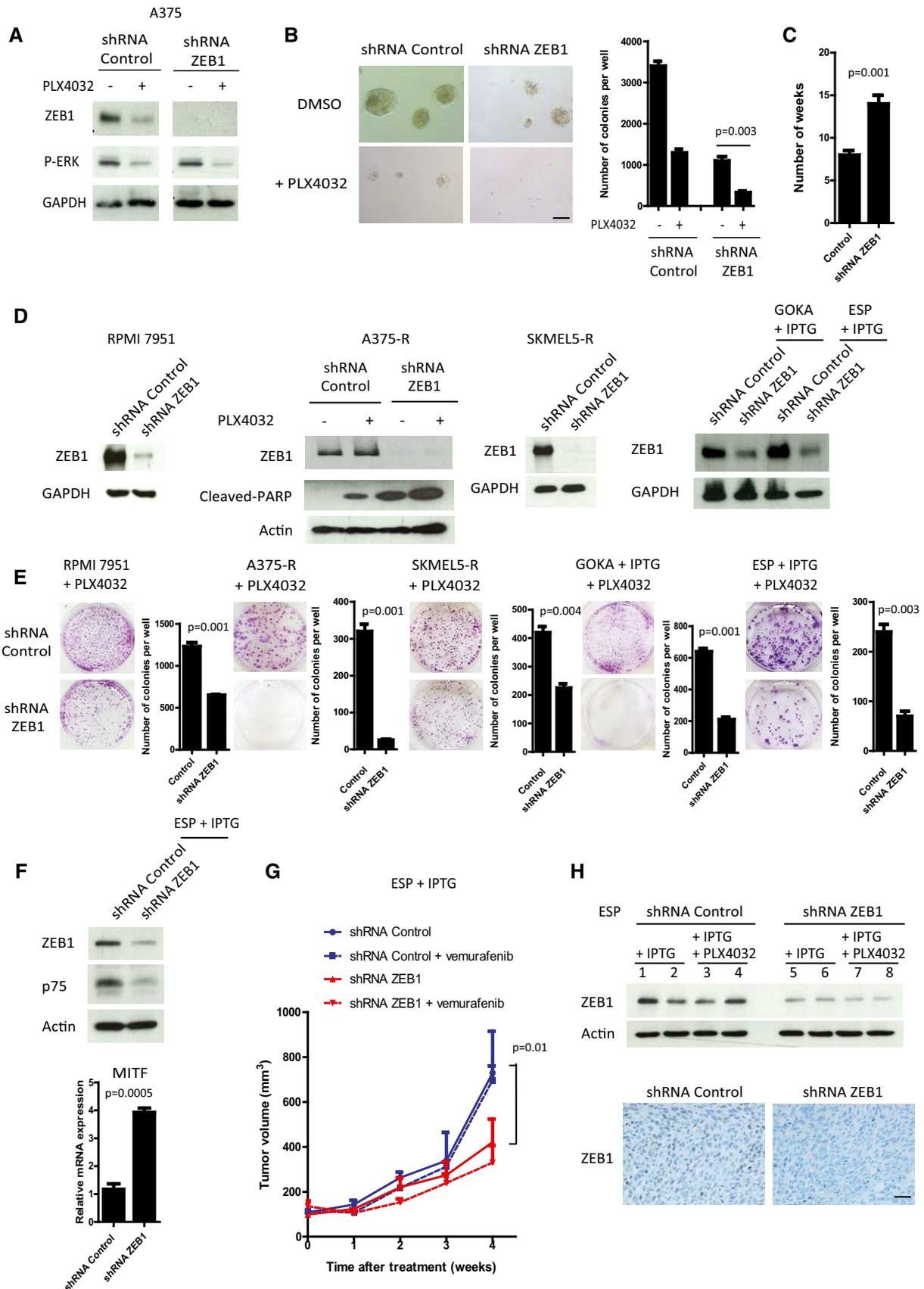


Figure 7. ZEB1 knockdown sensitizes naive melanoma cells to BRAFi and induces cell death in BRAFi-resistant melanoma cells.

- A Western blot analyses of ZEB1 and P-ERK in shRNA control or shRNA-ZEB1-expressing A375 cells \pm 150 nM PLX4032 treatment for 24 h. GAPDH was used as a loading control.
- B Soft agar colony formation assay in A375 cells in the presence or absence of PLX4032 (150 nM). Scale bar = 100 μ m. Histograms represent quantitative analyses (mean \pm SD, $n = 3$, Student's t -test).
- C Number of weeks of chronic exposure to PLX4032 before emergence of resistance in shRNA control or shRNA-ZEB1-expressing cells (mean \pm SD, $n = 3$, Student's t -test).
- D RPMI7951, A375-R, and SKMEL5-R were infected with a retrovirus encoding a constitutive shRNA-ZEB1. Short-term cultures of GOKA and ESP cells, derived from vemurafenib-resistant patients, were infected with a lentivirus encoding an IPTG-inducible shRNA-ZEB1. Western blot analyses showing efficient ZEB1 knockdown in the different models, \pm IPTG (200 μ M), \pm PLX4032 (3 μ M) as indicated. Induction of cell death was assessed by PARP cleavage. GAPDH or actin was used as loading control.
- E Clonogenic assays in the presence of 3 μ M PLX4032, and with or without IPTG (200 μ M) as indicated. The graphs represent the mean number of colonies (\pm SD) in three independent experiments (Student's t -test).
- F Western blot analyses of ZEB1 and p75 and quantitative PCR analyses of MITF in shRNA control or shRNA-ZEB1 ESP vemurafenib-resistant patient-derived short-term culture cells. Actin was used as a loading control. mRNA expression levels are represented relatively to control cells (mean \pm SD, $n = 3$, Student's t -test).
- G 2.5×10^6 shRNA control or shRNA-ZEB1 vemurafenib-resistant ESP cells were injected subcutaneously in nude mice. When the tumor reached 5 mm in diameter, ZEB1 expression was silenced by providing mice with IPTG (10 mM) in their drinking water and orally administering vemurafenib (50 mg/kg) daily for 4 weeks. The mean tumor volume for five mice is represented (\pm SEM) (Student's t -test, P at 4 weeks).
- H Upper part: Western blot analyses of ZEB1 in shRNA control (1 to 4) or shRNA-ZEB1 (5 to 8) ESP xenograft tumors, showing efficient ZEB1 knockdown directly in the tumors, after IPTG \pm PLX4032 treatment *in vivo*. Lower part: Representative pictures of ZEB1 immunostaining in shRNA control or shRNA-ZEB1 tumors, after IPTG treatment *in vivo*. Scale bar = 40 μ m.

Source data are available online for this figure.

GLO cells (Appendix Fig S7), this further indicates that ZEB1 effects rely on a process of drug-induced phenotype adaptation that requires at least one week of treatment. Moreover, cell death was observed upon ZEB1 knockdown in A375-R cells even in the absence of PLX4032 treatment (Fig 7D), indicating that these resistant cells are addicted to ZEB1.

Our *in vitro* investigation of the underlying mechanisms uncovered that ZEB1 regulates the reversible transitions from a drug-sensitive differentiated state to a drug-resistant stem-like phenotype, associated with a downregulation of MITF and direct or indirect activation of several melanoma-initiating cell markers, including the neural crest cell marker p75/CD271, a crucial determinant of the colony formation of melanoma cells, and of tumorigenicity (Boiko *et al*, 2010; Civenni *et al*, 2011; Redmer *et al*, 2014). However, knockdown experiments demonstrated that p75 was only responsible for part of the effects associated with ZEB1, since the ZEB1-mediated decrease in *Tyrosinase* was not reverted after the knockdown of p75. Moreover, ZEB1 expression promoted resistance to BRAFi in 501MEL cells without induction of p75, suggesting that ZEB1 can promote resistance by other mechanisms. The expression of two other markers that do not necessarily overlap with p75 (Cheli *et al*, 2014), namely the ABCB5 transporter and the histone demethylase JARID1B (Schatton *et al*, 2008; Roesch *et al*, 2010), was also regulated upon ZEB1 modulation. Overall, ZEB1, as a transcription factor which can act as a transcriptional repressor or activator thanks to the binding to specific cofactors, is responsible for the modulation of a large panel of targets, including downregulation of melanocyte differentiation markers and upregulation of melanoma-initiating cell markers that cooperate in mediating resistance to MAPKi.

ZEB1 ectopic expression was sufficient to increase p75 levels in ZEB1^{high} established cell lines (A375, SKMEL5), and ZEB1^{low} patient-derived short-term cultures (C-09.10 and GLO), and this effect was potentiated upon BRAFi treatment. However, in ZEB1^{low}/MITF^{high} established melanoma cell lines, such as 501MEL, ZEB1 overexpression was not sufficient to promote p75 expression, even upon PLX4032 treatment. This may be due to epigenetic modifications acquired during the establishment of these cell lines that may block the promoter in a closed chromatin configuration.

We found a potent correlation between high levels of ZEB1 and low levels of MITF expression in various settings in both cell lines and patient-derived samples. The ZEB1^{high}/MITF^{low} profile was associated with intrinsic resistance to MAPKi. Invasive MITF^{low} cells with high levels of expression of WNT5A or of the receptor tyrosine kinase AXL were recently shown to be more resistant to MAPKi (Anastas *et al*, 2014; Konieczkowski *et al*, 2014; Muller *et al*, 2014), supporting our own model. AXL, a known target of FRA1 that promotes EMT in epithelial cells (Sayan *et al*, 2012), exhibit high levels of expression in our resistant melanoma models (Appendix Fig S8). However, neither AXL nor WNT5A levels were induced upon ZEB1 ectopic expression, suggesting that ZEB1 function in resistance may be independent of these pathways. ZEB1 is obviously not the only factor influencing sensitivity to MAPKi treatment and we do not exclude the putative co-occurrence of other mechanisms of resistance that could account for the differential sensitivity to treatment observed in established cell lines *in vitro*. Both ZEB1 and MITF are at least in part regulated by the MAPK pathway. Although ZEB1 is downregulated by PLX4032 at an early stage, it is strongly upregulated in resistant cells, indicating drug adaptation. We previously showed that ZEB1 expression levels are not only regulated at the transcriptional level by the FRA1 transcription factor, but also at the posttranslational level (Caramel *et al*, 2013). This may explain why ZEB1 levels are still decreasing in cells that ectopically express ZEB1 upon PLX4032 treatment. MITF is upregulated after a short treatment with PLX4032 but may be lost in resistant cells, in favor of a role for lower MITF expression in resistance to MAPKi. However, the role of MITF is complex, since both high and low levels of MITF can be found in cells with acquired resistance, even within the same tumor in different clones, suggesting that MITF may or may not be required for the acquisition and maintenance of resistance to MAPKi (Wellbrock & Arozarena, 2015). Concordantly, we observed that cell lines and patient-derived samples with intrinsic or acquired resistance to MAPKi could display a ZEB1^{high}/MITF^{high} profile. Furthermore, ZEB1 knockdown decreased the viability of resistant melanoma cells in both MITF^{low} and MITF^{high} contexts, suggesting that ZEB1 partly functions through MITF-independent mechanisms.

High levels of ZEB1 expression undoubtedly promote an invasive phenotype in melanoma, including decreased *E-cadherin* and increased expression of *Vimentin*, *SPARC*, and *MMPs* (Caramel et al, 2013; Verfaillie et al, 2015) (Appendix Fig S4). Our results reinforce the notion that ZEB1 additionally displays intrinsic oncogenic functions. ZEB1 is expressed in the bulk of primary melanoma. Its ectopic expression promotes stemness and tumorigenic features in melanoma cell lines, and its knockdown drastically decreases the tumorigenic growth of melanoma cells *in vivo*. Our results thus demonstrate that ZEB1 is a major driver of phenotype switching-mediated resistance to MAPKi and highlight that it is not the EMT phenotype or invasive status itself but the specific functions of EMT-TFs that cause resistance in melanoma cells. In contrast, ZEB2 is associated with low levels of ZEB1 expression and a differentiated MAPKi-sensitive phenotype. As previously reported for their respective tumorigenic capacities (Caramel et al, 2013), ZEB2 could therefore play an antagonistic function to ZEB1 in terms of resistance to treatment in melanoma. Interestingly, specific functions of EMT-TFs in resistance to treatment were previously reported in carcinoma, corroborating our own model. As an example, ZEB1 was previously shown to induce radioresistance through EMT-independent, Chk1-dependent mechanisms (Zhang et al, 2014, 2015). Moreover, invasive phenotypes and stemness properties can be uncoupled in carcinomas, since ZEB1 and TWIST1 exhibit a dose-dependent role in malignant progression. A lower threshold of ZEB1 or TWIST1 is sufficient to induce stemness and tumor initiation, whereas further induction is necessary for EMT induction, invasion, and tumor metastasis (Liu et al, 2014; Beck et al, 2015). Of note, while the ectopic expression of *ZEB1/ZEB2* has been associated with attenuated cell proliferation in carcinoma models (Mejlvang et al, 2007), we did not observe any proliferation defect upon *ZEB1* expression in melanoma cells, further highlighting cell-type-specific functions of ZEB1 and ZEB2 in melanoma compared to carcinoma, as we previously reported (Caramel et al, 2013; Puisieux et al, 2014).

While our study was mainly focused on ZEB1, TWIST1 is also frequently activated in melanoma. However, the ectopic expression of *TWIST1* did not significantly stimulate the colony formation capacity of melanoma cell lines (Appendix Fig S9), suggesting that ZEB1 is a stronger oncogenic factor than TWIST1 in this tumor type. Nevertheless, if the ectopic expression of *TWIST1* is unable to confer resistance to PLX4032 in *ZEB1*^{high} cell lines (A375/SKMEL5), our results indicate that TWIST1 can drive resistance in a *ZEB1*^{low} context (501MEL cells, Fig EV2). When combined with the observation that a significant number of primary resistant ZEB1-negative melanomas exhibit high levels of TWIST1 expression, these results suggest that ZEB1 is the main driver of BRAFi resistance, but that TWIST1 may complement ZEB1 when this factor is not activated, and may thus constitute a potential therapeutic target in a subset of melanomas.

Finally, a better understanding of the function of EMT-TFs in melanoma cell plasticity should lead to the design of novel combination therapies targeting specific EMT-TFs and the MAPK pathway. Even if the aberrant expression of ZEB1 is more frequently found in *BRAF*^{V600}-mutated tumors (54%), it may be beneficial to target ZEB1 as a mediator of cell plasticity in a subset of *NRAS*^{Q61R}-mutated (29%) or *BRAF* and *NRAS* WT tumors (16%) with high levels of ZEB1 expression (Appendix Fig S2). ZEB1 inhibition was

shown to increase sensitivity to MAPKi, prevent the emergence of resistance, and induce cell death in various melanoma cells with intrinsic or acquired resistance to BRAFi. Since the targeting of transcription factors is challenging, a strategy may consist in identifying ZEB1 gene targets or epigenetic mechanisms regulating ZEB1-driven plasticity to overcome ZEB1-associated drug resistance. In this context, the class I HDAC inhibitor mocetinostat was recently shown to inhibit the expression of ZEB1, to upregulate its target, miR-203, and to restore sensitivity to chemotherapy in pancreatic cancer cells (Meidhof et al, 2015).

Materials and Methods

Human tumor samples and immunohistochemical analyses

Melanoma tumor samples were obtained through the Biological Resource Center of the Hôpital Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, and of the Hôpital Saint Louis, AP-HP, Paris. Human tumor samples were used with the patient's written informed consent. This study was approved by the scientific board of the Hospices Civils de Lyon. Immunohistochemical studies were conducted on a cohort of 70 melanomas with a *BRAF*^{V600} mutation, for which clinical data and response to vemurafenib ± cobimetinib treatment were known. Of the 70 patients, 16 received the combination therapy. Patients were referred to as "initially responding" when regression of the tumor was observed (40) and referred to as "initially non-responding" when the tumor progressed or remained stable (30) according to RECIST criteria. In addition, biopsies were performed before and after vemurafenib treatment ($n = 12$), on non-responding ($n = 3$) or relapse ($n = 9$) patients. Specimens were formalin-fixed, paraffin-embedded, and 3- μ m-thick tissue sections were cut. The sections underwent IHC staining using steam heat-induced epitope retrieval, the Ventana Benchmark XT platform (Ventana-Roche Tissue Diagnostics, Meylan France), Ultraview red detection and commercially available antibodies against ZEB1 (H102, rabbit polyclonal, 1/800, Santa Cruz), MITF (C5/D5, mouse monoclonal, 1/200, Roche), and TWIST1 (Twist2C1a, mouse monoclonal, 1/50, Abcam, Cambridge, MA, USA). For all three antibodies, the staining was nuclear. A blinded evaluation of the staining was carried out by experienced pathologists. The IHC staining was scored evaluating the intensity (1, 2, 3) and the percentage of positive cells.

CCLC and TCGA data sets

Data set analyses

The levels of mRNA expression of 61 melanoma cancer cell lines obtained from the "CCLC_Expression_Entrez_2012-10-18.res" file available through the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLC) were analyzed. In addition, the drug response profile of 28 *BRAF*^{V600}-mutated melanoma cancer cell lines obtained from the "CCLC_NP24.2009_Drug_data_2015.02.24.csv" file (CCLC) was also analyzed (Barretina et al, 2012).

Furthermore, the levels of mRNA expression of 467 human melanomas obtained from the level 3 data *UNC IlluminaHiSeq_RNASeqV2* of the Skin Cutaneous Melanoma study provided by The Cancer Genome Atlas (TCGA) were analyzed. The mutational status of *BRAF* and *NRAS* genes of 341 human

melanomas obtained from the cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) were also analyzed (Cerami *et al*, 2012; Gao *et al*, 2013; The Cancer Genome Atlas Network, 2015). TCGA level 3 RNA sequencing data were normalized using the DESeq method with the R software (version 3.1.2; the R core Team R: a language and environment for statistical computing, 2008; <http://www.R-project.org>) (Anders & Huber, 2010).

TCGA mRNA expression data processing

For the TCGA samples, the levels of *ZEB1* mRNA expression exceeding the 80th percentile were referred to as “High”, while *ZEB1* expression levels inferior to the 20th percentile were referred to as “Low”. The remaining samples were classified as “Intermediate”.

Mouse injections

Experiments using mice were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP). Mice were housed and bred in a specific pathogen free animal facility “AniCan” at the CRCL, Lyon, France. Single cell suspensions of A375 cell lines (2×10^6 cells), SKMEL5 (2×10^6 cells), or ESP (2.5×10^6 cells) in PBS/Matrigel (BD Biosciences, Oxford, UK) (1/1) were injected subcutaneously into the flank of six-week-old female athymic Swiss nude mice (Charles River Laboratories). Five mice were included in each experimental group, in separate cages (IPTG alone or IPTG + vemurafenib). No blinding was done. For the IPTG-inducible models, when the tumor reached 5 mm in diameter, *ZEB1* expression was silenced by adding IPTG (10 mM) (Sigma) to the drinking water. BRAF was inhibited by orally administering vemurafenib (50 mg/kg) or vehicle (DMSO/PBS) daily for 2–5 weeks. Tumor growth was monitored during 4–6 weeks post-injection. Tumors grew up to 1.5 cm in diameter, at which point animals were euthanized. Tumors were embedded in paraffin and *ZEB1* staining was performed using the anti-*ZEB1* antibody (IHC-00419, 1/300, Bethyl), and DAB detection and counterstaining with hematoxylin.

Cell culture and reagents

WM115, RPMI7951, SKMEL24, WM793, SKMEL28, SKMEL5, A375, SKMEL3, and MALM3M human melanoma cell lines were purchased from ATCC. 501MEL and WM9 cell lines were kindly provided by Dr Robert Ballotti and M4BE cell line by Dr Thibault Voeltzel (Centre Léon Bérard). All these *BRAF*^{V600} human melanoma cell lines were cultured in DMEM complemented with 10% FBS (Cambrex) and 100 U/ml penicillin–streptomycin (Invitrogen). In order to authenticate the cell lines, the expected major genetic alterations were verified by NGS sequencing. The absence of mycoplasma contamination was checked every 3 weeks with the MycoAlert detection kit (Lonza). Patient-derived short-term cultures (< 10) were established from *BRAF*^{V600} metastatic melanomas, before treatment for GLO and C-09.10, or after acquisition of resistance to vemurafenib for ESP and GOKA. C-09.10 were kindly provided by Dr Robert Ballotti (Nice). These short-term cell cultures were grown in RPMI complemented with 10% FBS and 100 U/ml penicillin–streptomycin. PLX4032/vemurafenib and GDC0973/cobimetinib were purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX,

USA) and reconstituted in DMSO. Generation of A375-R and SKMEL5-R resistant models was performed by treating cells chronically with increasing doses of PLX4032 for 2–3 months. All BRAFi-resistant cell lines were permanently cultured in the presence of 3 μ M PLX4032.

Retroviral and lentiviral infection

Human embryonic kidney 293T cells (4×10^6) were transfected with retroviral or lentiviral expression constructs (10 μ g) in combination with GAG-POL (5 μ g) and ENV expression vectors (10 μ g) using GeneJuice (Millipore). Viral stocks were collected 48 h post-transfection, filtered (0.45 μ m membrane), and placed in contact with 2×10^6 melanoma cells for 8 h in the presence of 8 μ g/ml polybrene. Forty-eight hours post-infection, cells were selected in the presence of puromycin (1 μ g/ml) (Invitrogen). The following constructs: HA-*ZEB1*, Flag-TWIST1, shRNA control, and shRNA-*ZEB1* were described previously in pBabe-Puro vector (Caramel *et al*, 2013). IPTG-inducible shRNA control and shRNA-*ZEB1* (TRCN0000369266 and TRCN0000369267) in pLKO_IPTG_3xLacO were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). For activation of shRNA expression, IPTG (Sigma) was added to the culture medium (100–200 μ M) every two days. For reversion experiments, IPTG was removed and analyses performed after 10 days.

siRNA transfections

For inactivation of *p75* by small interference RNA, 3×10^5 cells were seeded in 6-well plates. Control or *p75*-siRNA (Life Technologies) (Silencer select human NGFR s194654, #4392420) were transfected into A375 cells (with a final concentration of 50 pM) using Lipofectamine following the manufacturer's instructions (Life Technologies). mRNA were extracted 48 h after transfection.

Immunoblot analyses

Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) containing CaCl₂ and then lysed in a 100 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8.0 RIPA buffer supplemented with a complete protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Protein expression was examined by Western blot using the anti-*ZEB1* (H102, 1/200, Santa Cruz), anti-*ZEB2* (1/500, Sigma), anti-TWIST1 (Twist2C1a, 1/100, Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-P-ERK1/2 (#9106, 1/2,000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-MITF (clone C5, ab80651, 1/500, Abcam), anti-FRA1 (sc-605, 1/400, Santa Cruz), anti-p75 (1/200, Alomone Labs, Jerusalem), anti-AXL (AF154, 1/1,000, R&D Systems), and anti-PARP (cleaved form, 29 kDa) (ab6079, 1/200, Abcam) antibodies for primary detection. Loading was controlled using the anti- β -actin (clone AC-15, 1/10,000, Sigma-Aldrich), anti-GAPDH (1/20,000, Millipore), or anti- α -tubulin (T5168, 1/5,000, Sigma-Aldrich) antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse, goat anti-rabbit, and donkey anti-goat polyclonal antibodies (Dako, Glostrup, Denmark) were used as secondary antibodies. Western blot detections were conducted using the Luminol reagent (Santa Cruz). For *ZEB1* level analyses in mouse tumors, proteins were

extracted from frozen tumors in liquid nitrogen by homogenizing tissue in RIPA buffer.

Q-PCR

Total RNA was isolated using RNeasy Kit (QIAGEN) and reverse-transcribed using a high cDNA capacity reverse transcription kit following the manufacturer's instructions (Fisher Scientific). Real-time PCR intron-spanning assays were designed using the ProbeFinder software (Roche). All reactions, including no-template controls and RT controls, were performed in triplicate on a CFX96 (Bio-Rad) and were analyzed with the Bio-Rad CFX manager software. Human *HPRT1* was used for normalization. The primers used were as follows: human *ZEB1* AGG GCA CAC CAG AAG CCA G and GAG GTA AAG CGT TTA TAG CCT CTA TCA; human *ZEB2* AAG CCA GGG ACA GAT CAG C and GCC ACA CTC TGT GCA TTT GA; human *TWIST1* GGC TCA GCT ACG CCT TCT C and CCT TCT CTG GAA ACA ATG ACA TCT; human *MITF* CAT TGT TAT GCT GGA AAT GCT AGA and TGC TAA AGT GGT AGA AAG GTA CTG C; human *p75*, TCA TCC CTG TCT ATT GCT CCA and TGT TCT GCT TGC AGC TGT TC; human *ABC5* TTG AAA CCT TCG CAA TAG CC and TGG AAA AGT TAT CTA TAC TGG GTT TCT; human *JARID1B* AGC AGA CTG GCA TCT GTA AGG and GAA GTT TAT CAA CAT CAC ATG CAA; and *HPRT1* TGA CCT TGA TTT ATT TTG CAT ACC and CGA GCA AGA CGT TCA GTC.

Flow cytometry analyses

To analyze the expression of the p75/CD271 cell surface markers, cells were incubated with an Alexa Fluor 647-conjugated anti-CD271 antibody (BD Pharmingen) for 1 h before being counted on a FACSCalibur. Data were analyzed using the FlowJo 7.5.5 software.

Soft agar colony formation assay

Melanoma cell lines were transduced with cDNA or shRNA retroviral or lentiviral expression vectors and selected with puromycin. Plates were prepared by coating with 0.75% low-melting agarose (Lonza) in growth medium and then overlaid with cell suspension in 0.45% low-melting agarose (5×10^3 cells/well). Plates were incubated for 2–3 weeks at 37°C. Colonies were stained with crystal violet (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) and counted under microscope.

Viability assays

For short-term viability assays, the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (ATP assay) (Promega) was used, based on quantitation of the ATP present, which signals the presence of metabolically active cells. 1,000 cells in 96-well plates were treated with the indicated drugs for 72 h in a final volume of 100 μ l. Three by threefold PLX4032 dilutions resulted in concentrations ranging from 1 nM to 10 μ M. After 72 h, the CellTiter-Glo reaction solution (Promega) was added and luminescence was measured (Tekan). Control wells with DMSO were used for normalization. IC₅₀ values were determined with the Compusyn software. For long-term viability assays, 800 cells in 6-well plates were treated with the indicated drugs at the IC₅₀ concentration. Medium was changed every 2–3 days, and colonies were fixed and stained with crystal violet after 10–15 days.

The paper explained

Problem

Targeted therapies with MAPK inhibitors (MAPKi) are faced with severe problems of innate and acquired resistance in *BRAF*-mutant melanoma. No clear mutational mechanism is found in up to forty percent of resistant melanomas, indicating that transcriptomic or epigenetic alterations may underly acquired MAPKi resistance. In parallel to the acquisition of genetic mutations, melanoma cells may also adapt to the drugs through phenotype switching. Therefore, identification of non-genomic mechanisms by which melanoma cells reprogram their epigenome/transcriptome to evade MAPKi therapy may lead to the design of more efficient combination therapies.

Results

We herein uncovered the role of the EMT-inducing transcription factor (EMT-TF) ZEB1 as a major driver of phenotype switching in melanoma cells, providing them with a resistance to MAPKi. We showed that high ZEB1 expression levels were associated with inherent resistance to BRAF inhibitors (BRAFi) in *BRAF*^{V600}-mutated cell lines and tumors. Moreover, ZEB1 expression level was increased in melanoma cell lines with acquired resistance to BRAFi and in biopsies from patients relapsing while under BRAFi treatment. We further demonstrated that *ZEB1* overexpression in melanoma cell lines triggered the emergence of resistance to MAPKi by promoting the reversible conversion of a MITF^{high}/p75^{low} differentiated state into a MITF^{low}/p75^{high} stem-like and tumorigenic state. Consequently, the inhibition of ZEB1 sensitized naive melanoma cells to BRAFi, prevented the emergence of resistance following chronic exposure to BRAFi *in vitro*, and induced cell death in resistant melanoma cells.

Impact

Our work shows that mutated *BRAF* melanoma patients with high levels of ZEB1 expression may not benefit from MAPKi treatment and that ZEB1 could serve as a predictive marker in order to stratify *BRAF*-mutated melanoma into MAPKi-sensitive and MAPKi-resistant subgroups. Moreover, a better understanding of the function of EMT-TFs in melanoma cell plasticity should pave the way for the design of novel combination therapies targeting specific EMT-TFs and the MAPK pathway in order to prevent the emergence of resistance.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software and Microsoft Excel 2010, except statistical analyses of TCGA and CCLE data that were performed using the R software (version 3.1.2; the R core Team R: a language and environment for statistical computing, 2008; <http://www.R-project.org>). To assess the significant correlation between *ZEB1*, *MITF*, and *NGFR* expression in the CCLE and TCGA data sets, a Pearson's correlation coefficient was performed. To assess the significant associations between the level of *ZEB1* expression and *BRAF*- or *NRAS*-mutated status in TCGA data set, a Wilcoxon signed-rank test was performed. All experiments were performed at least in triplicate. Data are presented as mean \pm s.d. or \pm s.e.m. as specified in the figure legends. To determine significant differences between two groups, parametric data were analyzed using a two-tailed *t*-test or a Fisher's exact test. The *P*-values obtained were considered significant < 0.05.

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

The authors would like to thank Brigitte Manship for critical reading, Michelle Houang, Sophie Leon, and Nicolas Gadot (Anipath) for their help with immunohistochemical stainings, and Frédérique Fauvet for her help with the generation of cell lines. Our team is funded by the Ligue Nationale contre le Cancer. The work was additionally supported by the Institut National du Cancer (INCa PAIR melanoma D22044), the Fondation de France (project no. 2012 00029143), and the Société Française de Dermatologie, SFD (JC). GR and ML were supported by the LABEX DEVWeCAN of the University of Lyon (ANR-10-LABX-0061) and by a fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer (GR). AB and MPM are recipients of fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

Author contributions

GR and MAM performed and analyzed most *in vitro* and *in vivo* studies. ML and RBar contributed to *in vitro* experiments and JC contributed to *in vivo* experiments in mice. SD, AB, MPM, GT, and LT provided human samples and clinical data and analyzed data from the human sample experiments. AF and LD performed the pathological examination of the stainings. RMP and ET performed statistical analyses of the TCGA and CCLE data. SM, MB, and CL provided human biopsies and helped to interpret data. SA helped to interpret data. CB and RBar provided cell lines and helped to interpret data. SD, AP, and JC conceived the project, designed experiments, and interpreted data. JC supervised the whole project and wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Anastas JN, Kulikauskas RM, Tamir T, Rizos H, Long GV, von Euw EM, Yang PT, Chen HW, Haydu L, Toroni RA *et al* (2014) WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. *J Clin Invest* 124: 2877–2890
- Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11: R106
- Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D *et al* (2012) The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483: 603–607
- Beck B, Lapouge G, Rorive S, Drogat B, Desaedelaere K, Delafaille S, Dubois C, Salmon I, Willekens K, Marine JC *et al* (2015) Different levels of Twist1 regulate skin tumor initiation, stemness, and progression. *Cell Stem Cell* 16: 67–79
- Boiko AD, Razorenova OV, van de Rijn M, Swetter SM, Johnson DL, Ly DP, Butler PD, Yang GP, Joshua B, Kaplan MJ *et al* (2010) Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 466: 133–137
- Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A, Saldanha G, Osborne J, Hutchinson P, Tse G *et al* (2013) A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* 24: 466–480
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E *et al* (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2: 401–404
- Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, Bell G, Kleer CG, Reinhardt F, D'Alessio AC, Young RA, Weinberg RA (2013) Poised Chromatin at the ZEB1 Promoter Enables Breast Cancer Cell Plasticity and Enhances Tumorigenicity. *Cell* 154: 61–74
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M *et al* (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364: 2507–2516
- Cheli Y, Bonnazi VF, Jacquet A, Allegra M, De Donatis GM, Bahadoran P, Bertolotto C, Ballotti R (2014) CD271 is an imperfect marker for melanoma initiating cells. *Oncotarget* 5: 5272–5283
- Civenni G, Walter A, Kobert N, Mihic-Probst D, Zipser M, Belloni B, Seifert B, Moch H, Dummer R, van den Broek M *et al* (2011) Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res* 71: 3098–3109
- Denecker G, Vandamme N, Akay O, Koludrovic D, Taminau J, Lemeire K, Gheldof A, De CB, Van GM, Brochez L *et al* (2014) Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ* 21: 1250–1261
- Dou J, He X, Liu Y, Wang Y, Zhao F, Wang X, Chen D, Shi F, Wang J (2014) Effect of downregulation of ZEB1 on vimentin expression, tumour migration and tumorigenicity of melanoma B16F10 cells and CSCs. *Cell Biol Int* 38: 452–461
- Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N *et al* (2012) Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 367: 1694–1703
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E *et al* (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6: p11
- Hoek KS, Goding CR (2010) Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 746–759
- Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M (2014) Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer* 14: 455–467
- Hugo W, Shi H, Sun L, Piva M, Song C, Kong X, Moriceau G, Hong A, Dahlman KB, Johnson DB *et al* (2015) Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell* 162: 1271–1285
- Johannessen CM, Johnson LA, Piccioni F, Townes A, Frederick DT, Donahue MK, Narayan R, Flaherty KT, Wargo JA, Root DE *et al* (2013) A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature* 504: 138–142
- Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A, Frederick DT, Barzily-Rokni M, Straussman R, Haq R *et al* (2014) A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov* 4: 816–827
- Lito P, Rosen N, Solit DB (2013) Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 19: 1401–1409
- Liu Y, Lu X, Huang L, Wang W, Jiang G, Dean KC, Clem B, Telang S, Jensen AB, Cuatrecasas M *et al* (2014) Different thresholds of ZEB1 are required for Ras-mediated tumour initiation and metastasis. *Nat Commun* 5: 5660
- Long GV, Fung C, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Hyman J, Shahheydari H, Tembe V, Thompson JF, Saw RP *et al* (2014) Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nat Commun* 5: 5694
- Mallini P, Lennard T, Kirby J, Meeson A (2014) Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance. *Cancer Treat Rev* 40: 341–348
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M *et al* (2008) The epithelial-

- mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704–715
- Meacham CE, Morrison SJ (2013) Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501: 328–337
- Meidhof S, Brabletz S, Lehmann W, Preca BT, Mock K, Ruh M, Schuler J, Berthold M, Weber A, Burk U et al (2015) ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Mol Med* 7: 831–847
- Mejlvang J, Krijavetska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Bex G, Mellon JK, Tulchinsky E (2007) Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 18: 4615–4624
- Miow QH, Tan TZ, Ye J, Lau JA, Yokomizo T, Thiery JP, Mori S (2015) Epithelial-mesenchymal status renders differential responses to cisplatin in ovarian cancer. *Oncogene* 34: 1899–1907
- Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 3: e2888
- Morel AP, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, Wierinckx A, Devouassoux-Shisheboran M, Treilleux I, Tissier A, Gras B et al (2012) EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet* 8: e1002723
- Moriceau G, Hugo W, Hong A, Shi H, Kong X, Yu CC, Koya RC, Samatar AA, Khanlou N, Braun J et al (2015) Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. *Cancer Cell* 27: 240–256
- Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, Kong X, Possik PA, Cornelissen-Steijger PD, Foppen MH et al (2014) Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 5: 5712
- Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H et al (2010) Melanomas acquire resistance to B-Raf(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468: 973–977
- Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265–273
- Puisieux A, Brabletz T, Caramel J (2014) Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 16: 488–494
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ (2008) Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456: 593–598
- Quintana E, Shackleton M, Foster HR, Fullen DR, Sabel MS, Johnson TM, Morrison SJ (2010) Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell* 18: 510–523
- Redmer T, Welte Y, Behrens D, Fichtner I, Przybilla D, Wruck W, Yaspo ML, Lehrach H, Schafer R, Regenbrecht CR (2014) The nerve growth factor receptor CD271 is crucial to maintain tumorigenicity and stem-like properties of melanoma cells. *PLoS One* 9: e92596
- Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, Lichinitser M, Dummer R, Grange F, Mortier L et al (2015) Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 372: 30–39
- Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, Basu D, Gimotty P, Vogt T, Herlyn M (2010) A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 141: 583–594
- Roesch A (2015) Tumor heterogeneity and plasticity as elusive drivers for resistance to MAPK pathway inhibition in melanoma. *Oncogene* 34: 2951–2957
- Sayan AE, Stanford R, Vickery R, Grigorenko E, Diesch J, Kulbicki K, Edwards R, Pal R, Greaves P, Jariel-Encontre I et al (2012) Fra-1 controls motility of bladder cancer cells via transcriptional upregulation of the receptor tyrosine kinase AXL. *Oncogene* 31: 1493–1503
- Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C et al (2008) Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451: 345–349
- Shirley SH, Greene VR, Duncan LM, Torres Cabala CA, Grimm EA, Kusewitt DF (2012) Slug expression during melanoma progression. *Am J Pathol* 180: 2479–2489
- Singh A, Settleman J (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29: 4741–4751
- Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY, Thiery JP (2014) Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med* 6: 1279–1293
- The Cancer Genome Atlas Network (2015) Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161: 1681–1696
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871–890
- Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C et al (2008) Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res* 68: 937–945
- Tulchinsky E, Pringle JH, Caramel J, Ansieau S (2014) Plasticity of melanoma and EMT-TF reprogramming. *Oncotarget* 5: 1–2
- Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, Place CS, Taylor-Weiner A, Whittaker S, Kryukov GV et al (2014) The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov* 4: 94–109
- Verfaillie A, Imrichova H, Atak ZK, Dewaele M, Rambow F, Hulselmans G, Christiaens V, Svetlichnyy D, Luciani F, Van den Mooter L et al (2015) Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun* 6: 6683
- Wellbrock C, Arozarena I (2015) Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 28: 390–406
- Zhang P, Wei Y, Wang L, Debeb BG, Yuan Y, Zhang J, Yuan J, Wang M, Chen D, Sun Y et al (2014) ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat Cell Biol* 16: 864–875
- Zhang P, Sun Y, Ma L (2015) ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* 14: 481–487



License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ARTICLE 2

Le traitement des mélanomes par immunothérapies anti-PD-1 doit également faire face à de sévères problèmes de résistance. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus majeur de plasticité des cellules cancéreuses connu pour favoriser la tumorigenèse, l'induction de propriétés souches, l'échappement au système immunitaire et la résistance aux traitements des carcinomes. Dans le mélanome, le facteur de transcription inducteur d'EMT ZEB1 joue un rôle oncogénique majeur. Nous avons déjà montré qu'il induit la résistance aux thérapies ciblées. Nous étudions maintenant si et comment l'expression oncogénique de ZEB1 par les cellules de mélanome pourrait favoriser l'évasion immune des mélanomes et le remodelage du microenvironnement immunitaire.

- L'analyse de l'infiltrat immunitaire à partir de biopsies de mélanome a démontré que de forts niveaux d'expression de ZEB1 par les cellules tumorales sont associés à de faibles niveaux d'infiltration par les lymphocytes T CD8.
- L'implémentation d'approches gain et perte de fonction *in vivo* dans les modèles de mélanome murins syngéniques démontre que ZEB1 régule la croissance tumorale et modifie la composition de l'infiltrat immunitaire en contrôlant notamment le recrutement des T CD8 au cœur de la tumeur.
- Au niveau moléculaire, une production amoindrie des chémokines attractrices des CD8 dans le sécrétome de tumeurs exprimant fortement ZEB1 pourrait expliquer le défaut de recrutement des T CD8.
- Enfin, ce remodelage du microenvironnement immunitaire a des conséquences sur la réponse aux anti-PD-1. L'inactivation de ZEB1 synergise avec le traitement par anti-PD-1 en induisant la régression tumorale des tumeurs murines.

Ainsi, nous avons mis en évidence le rôle majeur de ZEB1 dans le remodelage du microenvironnement immunitaire et ouvert de nouvelles perspectives de combinaison thérapeutiques avec les anti-PD-1.

Melanoma-intrinsic ZEB1 signaling impairs CD8+ T cells recruitment

Maud Ligier¹, Valentin Benboubker¹, Maxime Grimont¹, Justine Berthet^{2,3}, Laurie Tonon⁴, Jonathan Lopez¹, Myrtille Le-Bouar⁵, Brigitte Balme⁵, Garance Tondeur⁵, Lionel Larue⁶, Alain Puisieux⁶, Nathalie Bendriss-Vermare^{2,3}, Bertrand Dubois^{2,3}, Christophe Caux^{2,3}, Stéphane Dalle^{1,5}, Julie Caramel^{1,*}.

¹ Cancer Research Center of Lyon, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, “Cancer cell Plasticity in Melanoma” team.

² Cancer Research Center of Lyon, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, “Tumor immune surveillance and therapeutic targeting” team.

³ Laboratory of Immunotherapy of Cancer of Lyon (LICL), Lyon, France.

⁴ Fondation Synergie Lyon Cancer, Plateforme de bioinformatique Gilles Thomas, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

⁵ Dermatology Unit, Hospices Civils de Lyon, CH Lyon Sud, 165 chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite Cedex, France.

⁶ Institut Curie, PSL Research University, Paris, France.

*Correspondence: julie.caramel@lyon.unicancer.fr

Running title: ZEB1 and immune escape in melanoma

Keywords: melanoma; immune microenvironment; EMT-TF; plasticity

Total character count: 63 163 (excluding references)

Abstract

The treatment of metastatic melanoma with targeted and immunotherapies is still faced with severe problems of resistance. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a major cancer cell plasticity process driving tumorigenesis, stemness, immune escape and resistance to treatment in carcinoma. In melanoma, the EMT inducing transcription factor ZEB1 plays a major oncogenic role and drives resistance to MAPK targeted therapies. We now investigated whether and how ZEB1 intrinsic signaling in melanoma cells may promote the immune evasion of melanoma cells and the remodeling of the immune microenvironment. Analyses of the immune infiltrate in a cohort of human melanoma samples demonstrate that high ZEB1 expression in tumor cells is associated to a decreased infiltration by CD8+ T lymphocytes. ZEB1 gain or loss of function approaches were then implemented *in vivo* in syngeneic melanoma mouse models and showed that ZEB1 regulates tumor growth and modifies the composition of the immune infiltrate, by controlling CD8+ T cells recruitment in the tumor. This may be explained at the molecular level by a decreased production of CD8 T cells attracting chemokines in the secretome of ZEB1-high tumors. Finally, this remodeling of the immune microenvironment has consequences on the response to anti-PD1. ZEB1 targeting was shown to synergize with anti-PD1 in inducing regression of mouse tumors. Overall, our work demonstrates the major role of ZEB1-mediated cancer cell plasticity in melanoma immune microenvironment remodeling and opens new avenues in terms of combination strategies with immunotherapy.

Introduction:

Metastatic melanoma is the most aggressive type of skin cancer with about 15,000 new cases in France each year. Its treatment has been recently revolutionized with the advent of targeted therapies (BRAF + MEK inhibitors for BRAFV600-mutated melanoma) and immunotherapies (anti-CTLA4 and anti-PD1). However, resistance to targeted therapies invariably occurs. While sustained responses may be observed with anti-PD1 (Larkin et al., 2019; Wolchok et al., 2017), around 60% of patients still do not benefit from these treatments or may develop resistance.

Mechanisms of resistance to targeted therapies have been extensively studied in the recent years, and in parallel to genomic alterations (leading to reactivation of the MAPK pathway), resistance development has been attributed to phenotypic adaptations through transcriptional and epigenetic processes (Arozarena and Wellbrock, 2019; Hugo et al., 2015; Rambow et al., 2019). The mechanisms of resistance to immunotherapies involve both immune cells and tumor cells characteristics (Sharma et al., 2017). Besides inefficient CD8⁺ T cell response, other immune parameters such as the presence of T regulators (Tregs), myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), M2 macrophages (M Φ), and other inhibitory immune checkpoints, may contribute to inhibition of anti-tumor immune responses. Tumor-cell-intrinsic mechanisms of resistance have been associated with genetic alterations (JAK1/2 mutations) which decrease Interferon γ (IFN γ) sensitivity of melanoma cells, but may also rely on transcriptomic/phenotypic alterations, as shown for activation of the WNT/ β -catenin pathway (Abril-Rodriguez et al., 2020; Spranger et al., 2015), or loss of PTEN expression, which lead to T cell exclusion (Peng et al., 2016). The EZH2 histone methyltransferase was also shown as a major player in the adaptive resistance to immunotherapy in melanoma (Zingg et al., 2017). A major challenge is thus to identify novel tumor alterations, whose targeting would allow to recruit T cells and to restore response to anti-PD1.

Therefore, a complete understanding of cellular and molecular mechanisms underlying phenotypic adaptations and thus, the exceptional capacity of melanoma cells to develop resistance

to current therapeutic strategies, is required in order to define biomarkers of response and new combination therapies.

Melanomas display a high degree of inter and intratumoral heterogeneity as evidenced by gene expression analyses of tumors at the single cell level (Rambow et al., 2018; Tirosh et al., 2016). Melanoma plasticity relies on a phenotype switching between a proliferative/differentiated and an invasive/stem-like state (Hoek and Goding, 2010; Verfaillie et al., 2015). Loss of Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF), the master regulator of melanocyte differentiation, induces a reprogramming towards an invasive and stem-like phenotype in melanoma cells (Cheli et al., 2011). We previously showed that the epithelial-mesenchymal-transition (EMT)-inducing transcription factor (EMT-TF) ZEB1 (Caramel et al., 2018; Puisieux et al., 2014) regulates phenotype switching towards a MITF^{low} invasive and stem-like state (Caramel et al., 2013) and favors the acquired resistance to BRAF/MEK targeted therapies (Richard et al., 2016). Data in carcinoma (NSCLC, breast cancer) demonstrated the role of EMT factors in immune evasion through various mechanisms ranging from inhibition of antigen presentation by Major Histocompatibility Complex (MHC), to activation of immune checkpoint ligands expression (PD-L1) (Dongre et al., 2017; Terry et al., 2017). These data suggested that EMT-mediated cancer cell plasticity may promote resistance to immunotherapy (Shibue and Weinberg, 2017) but this remains to be precisely addressed in the context of melanoma, since EMT-TFs display specific roles in neural-crest derived malignancies (Tang et al., 2020). Given the pleiotropic roles of the ZEB1 transcription factor (Caramel et al., 2018), we investigated whether its expression in melanoma cells may allow escape from therapy and host immune surveillance.

Herein, we studied the crosstalk of tumor cells with the immune microenvironment in human melanoma samples by *in situ* and RNA-seq analyses, and demonstrated that ZEB1 expression in melanoma cells is associated with decreased CD8⁺ T cells infiltration. By manipulating ZEB1 expression *in vivo* in mouse models we then demonstrated that ZEB1 promotes

immune evasion and T cell exclusion. Moreover, ZEB1 targeting, by promoting CD8+ T cells infiltration, synergizes with anti-PD1 in promoting tumor regression. Finally, we provide evidence for a cell autonomous molecular mechanism mediated by decreased secretion of chemokines.

Results

High ZEB1 expression in tumor cells is associated with decreased CD8+ T cells infiltration in a cohort of human melanoma samples

In order to investigate the putative correlation of ZEB1 expression in melanoma cells with the composition of the immune infiltrate, we analyzed a cohort of 60 melanoma patient samples (Table 1). Only cutaneous biopsies were selected, either primary tumors or cutaneous metastases, but no lymph node metastasis in order to preclude contamination by immune cells. RNA-sequencing (RNA-seq) was performed on FFPE samples from this cohort (n=56; 4 samples did not pass the RNA quality control). To estimate the relative abundances and diversity of the different immune cells present in the tumor biopsies, deconvolution of immune cells was performed with Xcell. ZEB1 expression was strongly correlated with cancer associated fibroblasts (CAF) and endothelial cells scores (Fig. 1A). This is consistent with the observation that ZEB1 expression is not only found in tumor cells but also in stromal cells, endothelial cells, and some immune cell subsets (Scott and Omilusik, 2019). Indeed, through the reanalysis of the published scRNA-Seq dataset from Jerby Arnon et al. (Jerby-arnon et al., 2018), we showed that ZEB1 is expressed in almost 50% of Cancer Associated Fibroblast (CAF) and Endothelial cells, about 20% of T cells, 15% of B cells, 10% of macrophages and 8% of NK cells (Supp. Fig. 1). No correlation between ZEB1 expression and immune scores, especially T cell scores (Fig. 1A), was found but conclusions may be severely biased in these conditions.

In order to analyze ZEB1 expression specifically in tumor cells, we performed multi-immunofluorescence stainings in this cohort of cutaneous melanoma samples. A 7-color panel was designed in order to analyze both ZEB1 expression in tumor cells (defined by the expression of the SOX10 marker), and the adaptive immune response, namely T cell infiltration and function (CD8, CD4, PD1, KI67). Quantification of the percentage of ZEB1-expressing cells among SOX10-positive tumor cells allowed to segregate tumors in ZEB1^{high} (n=13) and ZEB1^{low} (n=41) subgroups (Fig. 1B and Supp. Fig. 2A). ZEB1 protein expression in tumor cells was poorly correlated with ZEB1 mRNA expression in the whole tumor (Supp. Fig. 2B). More precisely, a significant part of tumors classified as ZEB1 high according to the RNA-seq data, actually displayed no or low expression of ZEB1 in tumor cells, most ZEB1 high cells being stromal cells or endothelial cells (which display the highest scores) (Supp. Fig. 1-2).

We then analyzed the immune infiltration status by focusing on CD8+ T lymphocytes. CD8+ T cells quantification was represented as a percentage of CD8+ cells among total nuclei in the tumor zone. A cut-off (CD8+ T cells <1,5% of total nuclei) was applied to define the “immune desert”. The localization of CD8+ T cells was further analyzed and defined as invasive margin or intra-tumoral, allowing to classify the tumors as “excluded” or “infiltrated” respectively (Fig. 1B, Table 1).

Poorly infiltrated tumor samples (CD8+ T cells excluded pattern) were enriched in ZEB1-high melanoma cells compared to infiltrated tumors (41% versus 14%, i.e. 3-fold increase) (Fig. 1B-C). 70% of ZEB1^{high} tumors (instead of 36%, i.e. 2-fold increase) of ZEB1^{low} tumors presented a CD8+ T cells excluded pattern (Fig. 1D). Quantitative analyses further demonstrated a significant lower infiltration of ZEB1^{high} tumors by CD8+ T cells, compared to ZEB1^{low} tumors (p=0,0162) (Fig. 1E).

Moreover, quantification of PD1⁺CD8⁺ T cells (Supp. Fig. 3A) indicate that CD8+ T cells in the margin of excluded tumors are not PD1 positive. In contrast a significant proportion of CD8+

T cells that infiltrate the tumor zone display a PD1⁺ state (20-40%) (Supp. Fig. 3B). Regarding CD4⁺ T cells, no significant difference was observed between ZEB1^{high} and ZEB1^{low} tumors (Supp. Fig. 3C).

RNA-Seq data were then analyzed again using the ZEB1 classification derived from IF analyses. Decreased CD8 score as well as IFN score in ZEB1^{high} tumors compared to ZEB1^{low} tumors was validated (Fig. 1F, Supp. Fig. 4 A-C), confirming the requirement for complementary *in situ* analyses. More importantly, high ZEB1 expression did not correlate with activation of the Beta-Catenin pathway, thus emphasizing that these two pathways may be uncoupled (Supp. Fig. 4D).

Finally, a cohort of validation was stained for ZEB1 and CD8 in immunohistochemistry (N=22) and confirmed an enrichment in the proportion of CD8⁺ T cells excluded pattern in ZEB1^{high} tumors (Supp. Fig. 5). Overall, our results clearly demonstrate that high ZEB1 expression in melanoma cells is associated to a decreased infiltration by CD8⁺ T cells within the tumor zone.

Given recent studies suggesting that mesenchymal tumors may be more resistant to immunotherapy (Dongre et al., 2017; Hugo et al., 2016), we investigated a putative correlation of ZEB1 expression with the response to anti-PD1. All patients from our cohort were treated with anti-PD1 immunotherapy (Table 1), but we focused on the 38 first-line samples. All melanoma cutaneous metastases biopsies were performed no longer than 1 year before anti-PD1 treatment. RNA-Seq analyses on these pre-treatment/baseline samples confirmed as expected, that responding tumors display a higher CD8⁺ T cells infiltration as analyzed by XCell or the microenvironment cell population counter (MCP-Counter) (Supp. Fig. 6). T cell and IFN γ signatures also showed a tendency towards increase in responding patients. However, neither ZEB1 expression nor EMT score were elevated in non-responding patients biopsies compared to responding biopsies (Table 1 and Supp. Fig. 6). Even when using the ZEB1 melanoma cell score obtained by IF (Fig. 1), no tendency towards increased resistance to anti-PD1 of ZEB1^{high} tumors was found.

ZEB1 ectopic expression in melanoma cells increases tumor growth in immunocompetent mice by impairing the recruitment of CD8+ T cells

In order to investigate the role of ZEB1 in immune escape and CD8+ T cells exclusion, we manipulated its expression in syngeneic melanoma mouse models. Melanoma cell lines were established in our lab from *BrafV600; TyrCRE-ERT2* (B16M3, B25F4, B42M6) (Dhomen et al., 2009) as well as from *Tyr:NrasQ61* (N6.1) (Ackermann et al., 2005) melanoma bearing mice. In contrast to highly pigmented MITF^{high} NRAS-mutated cells, *BRAF^{V600}* cell lines display a MITF^{low} dedifferentiated phenotype, as previously described in similar models (Cooper et al., 2014) (Supp. Fig. 7) and exhibited gradient levels of expression of ZEB1.

We ectopically expressed ZEB1 in one MITF^{low} BRAFV600 and one MITF^{high} NRASQ61 cell line, in order to analyze a non-pigmented and a pigmented model (Fig. 2A). ZEB1-expressing melanoma cells exhibited increased tumor growth upon subcutaneous injection in syngeneic immunocompetent C57BL6/J mice but not in C57BL6/J RAG KO mice (Fig. 2B). These results indicate the major role of the immune system in the control of tumor growth. In accordance with these results, we showed that ZEB1-expression mediates drastic modifications in the composition of the immune infiltrate in the tumors growing in C57BL6/J immunocompetent mice, as assessed by multi-parametric flow cytometry. The CD45 infiltrate was decreased in ZEB1^{high} tumors (Fig. 2C). In these syngeneic models, the immune infiltrate is composed of about 30% T cells, 15% NK cells and 55% myeloid cells (Supp. Fig. 8).

Further immuno-histochemical and multi-parametric flow cytometry analyses demonstrated that the number of CD8+ T cells (/mm² or /g of tumor) was severely impaired (13 fold) in ZEB1^{high} tumors at day 14 (Fig. 3A-C). CD4+ T cells number also showed a tendency toward diminution in ZEB1^{high} tumors at day 14 (Fig. 3D), and the percentage of regulatory T cells

(FOXP3+CD4+) increased after 21 days (+25%) (Fig. 3 E, G). As a consequence, the CD8+ T cells / Treg ratio was severely decreased (Fig. 3F).

To go further, we then evaluated the activation state of CD8+ T cells by performing Perforin/Granzyme B, PD1 and KI67 stainings. While Perforin/Granzyme B and KI67 were not significantly altered, PD1 expression by CD8+ T cells was decreased in ZEB1^{high} tumors suggesting a decreased activation (Supp. Fig.9). Finally, in order to exclude a putative defect in lymphocyte activation within the draining lymph node, we analyzed CD8+ T cells from the draining lymph nodes at day 4 and showed no significant difference in their activation based on CD62L/CD44 markers (Fig. 3H). Overall, these results argue for a prominent role of ZEB1 in preventing the recruitment and maybe the activation of CD8+ T cells, based on PD1 expression.

***Zeb1* knock-out in melanoma cells strongly reduces tumor growth, favors CD8+ T cells infiltration and improves the response to immune checkpoint blockade**

In order to further analyze the role of ZEB1, we then knocked it out by lentiviral infection (CRISPR-Cas9) in a BRAF^{V600} cell line. *Zeb1* KO was validated by western-blot and Sanger sequencing (Fig. 4A). One scramble and one KO clone were selected, which displayed similar proliferation rate *in vitro*. Tumor growth of *Zeb1* KO melanoma cells was impaired in syngeneic immunocompetent C57BL6/J mice but not in C57BL6/J RAG KO mice (Fig. 4B and C), confirming again the role of the immune system and the absence of intrinsic proliferation defect. Absence of ZEB1 expression in tumor cells was validated by immunohistochemical stainings of the tumors (Fig. 4D). Consistent with the decreased infiltration by CD8+ T cells observed in ZEB1-overexpressing tumors, *Zeb1* KO tumors exhibited increased CD8+ T cells infiltration (3-fold increase) as assessed by immunohistochemical analyses (Fig. 4D). Importantly, similar conclusions regarding ZEB1-mediated CD8 T cells dependent tumor growth were obtained from experiments implemented with another pair of scramble-*Zeb1* KO clones (Supp. Fig.10).

Our observations that *Zeb1* KO increases CD8+ T cells infiltration gave a rationale to investigate whether *Zeb1* KO increased sensitivity to anti-PD1. As previously described for other syngeneic BRAF models (Meeth et al., 2016), B16M3, B25F4 and B42BM6 *BRAFV600* cells were found to be poorly sensitive to anti-PD1, in contrast to BP cells (Cooper et al., 2014). The growth of *Zeb1* KO cells is already reduced compared to control cells, but treatment with anti-PD1 resulted in a complete regression of the tumors (Fig. 4B). Overall, these data suggest that targeting ZEB1, by increasing T cell infiltration, may synergize with anti-PD1 treatment. ZEB1 may thus constitute a putative target to increase efficacy of immunotherapy.

ZEB1 melanoma cell autonomous secretome impairs CD8+ T cells attraction

In order to investigate by which mechanisms high ZEB1 expression in melanoma cells impairs the recruitment of CD8+ T cells in the tumors, we analyzed the secretome of the tumors. The composition of the supernatant of dilacerated tumors was analyzed by MSD multiplex technology (35 analytes). High ZEB1 expression in melanoma tumors was associated with a decreased expression of CD8+ T cells attracting chemokines (CXCL9, 10, CCL3, 4) in the supernatant of tumors (Fig. 5A-B). Of note, an increased secretion of TGF β (TGF β 2) was found in ZEB1^{high} tumors (Fig. 5B). Magnetic sorting of CD45 negative cells (mostly melanoma cells) from the tumors validated the decreased production of CXCL10 by ZEB1^{high} melanoma cells (Fig. 5C). Importantly, increased production of CXCL10 was evidenced in *Zeb1* KO cells by ELISA (Fig. 5D). Overall, melanoma cell intrinsic ZEB1 impairs secretion of CXCL10, which may contribute to a defective CD8+ T cells recruitment.

Discussion

Despite recent progress in the treatment of metastatic melanoma provided by immunotherapy, a major challenge remains to identify melanoma cell-intrinsic mechanisms of immune escape, whose targeting would allow to recruit T cells and to restore response to immunotherapy.

While previous data in carcinoma (NSCLC, breast cancer) demonstrated the role of EMT factors in immune evasion (Dongre et al., 2017; Terry et al., 2017), their roles remained to be precisely addressed in the context of melanoma, since EMT-TFs display cell-type specific roles in neural-crest derived malignancies (Caramel et al., 2013; Tang et al., 2020). We herein focused on ZEB1, given its prominent oncogenic function in melanoma, compared to TWIST1 or SNAIL. The specific role of ZEB1 in remodeling the immune microenvironment was not previously investigated in melanoma, where the characterization of immune escape mechanisms remains a major issue.

The present study demonstrates the prominent role of the expression of the ZEB1 transcription factor by melanoma cells in impairing CD8⁺ T cells recruitment, both in human samples and mouse models. Our findings identify ZEB1 as a key determinant of melanoma immune escape. Our results clearly demonstrate that high ZEB1 expression in melanoma cells is associated to a decreased infiltration by CD8⁺ T cells within the tumor zone in a large cohort of human cutaneous melanoma. Importantly, our study emphasizes the requirement for *in situ* analyses of tumors, allowing to tackle the issue of ZEB1 intra-tumoral heterogeneity. We indeed developed multi-immunofluorescence stainings enabling to specifically quantify ZEB1-expressing melanoma cells. We were thus able to exclude other ZEB1-expressing cells from the microenvironment, including cancer-associated fibroblasts (CAFs), endothelial cells, but also immune cells (T cells, macrophages and NK cells) (Scott and Omilusik, 2019), which significantly biased bulk RNA-Seq analyses. Our strategy combining *in situ* and RNA-Seq analyses allowed to reliably address the crosstalk between melanoma cells and immune cells.

Further work in several syngeneic mouse models demonstrate that ZEB1 regulates the tumor microenvironment by suppressing CD8+ T cells accumulation at the tumor site, thus, leading to an increased tumor growth. Consistently, *ZEB1* KO was able to favor CD8+ T cells recruitment and subsequent decrease in tumor growth.

Our work contributes to increase our knowledge of melanoma cell-intrinsic T cell exclusion mechanisms. Importantly, our results suggest that ZEB1 pathway may be non-redundant / independent from the Beta-Catenin pathway, a major T cell exclusion mechanism in melanoma (Supp. Fig. 4). We verified that high ZEB1 expression in melanoma does not correlate with Beta-catenin pathway activation. Overall, ZEB1 activation would be another mechanism of T cell exclusion present in about 25% of cutaneous melanoma patients, in addition to Beta-Catenin activation or PTEN loss of function (Kalbasi and Ribas, 2020; Peng et al., 2016; Spranger et al., 2015) which may be each found in about 20% of patients.

Investigation of the underlying mechanisms uncovered that the prominent role of ZEB1 is to prevent CD8+ T cells recruitment. CD8+ T cells activation state, evidenced by analyses of the PD1 immune checkpoint and the proliferation marker KI67, was not significantly modified in human samples, while a tendency toward decreased PD1 expression by CD8 T cells was shown in ZEB1^{high} tumors in mice. In contrast, we demonstrate a defective secretion of CXCL10, a T cell attracting chemokine, by ZEB1^{high} melanoma cells, suggesting the intrinsic role of ZEB1 in regulating the secretome and subsequent immune cells attraction. Indeed, as a transcription factor, ZEB1 has been shown to bind to the promoters of several inflammatory cytokines by ChIP-Seq in carcinoma models (Katsura et al., 2017). ZEB1 may thus directly regulate / inhibit the transcription of CXCL10 or other chemokines. However, one cannot exclude an indirect effect mediated by the negative regulation of MITF by ZEB1. In line with this hypothesis, MITF knockdown was shown to reduce the expression of CXCL10 in B16F10 melanoma cells (Wiedemann et al., 2019). However, our data also showed that ZEB1 is able to regulate CD8+ T cells recruitment in both a

MITF^{high} and a MITF^{low} background. MITF expression level was not significantly altered upon ZEB1 ectopic expression in the NRAS mouse model and the strong pigmentation was not decreased. These results suggest that ZEB1 may be able to regulate CD8+ T cells dependent tumor growth at least in part independently from MITF-mediated phenotype switching.

While our results point to an intrinsic role of ZEB1 in regulating the secretome of melanoma cells, it is still possible that a cooperation with chemokines produced by other immune cells from the microenvironment contributes to generate an amplification loop. Indeed, a cooperation between constitutive (CCL5 produced by tumor cells) and inducible (CXCL9 produced by dendritic cells DC and macrophages) chemokines has been described in many tumor types (Dangaj et al., 2019). Accordingly, Beta-Catenin activation was shown to impair T cell recruitment because of defective secretion of CXCL10 by DC (Spranger et al., 2017).

Our study focused on the impact on CD8+ T cells, but the proportion of other immune populations may also be modified by ZEB1. Indeed, the proportion of T regulators was increased upon ZEB1 expression in accordance with previous results obtained with SNAIL (Kudo-Saito et al., 2009). This may be linked to the increased secretion of TGFβ (TGFβ2) observed in ZEB1^{high} tumors. The balance between M1 and M2 macrophages which has previously been described in carcinoma models to be deregulated upon SNAIL expression (Dongre et al., 2017), will also need to be further investigated.

Regarding the resistance to immune checkpoint blockade, preliminary data suggested that EMT-mediated cancer cell plasticity may promote resistance to immunotherapy (Shibue and Weinberg, 2017). Results obtained in transplanted mouse models of carcinomas suggested that mesenchymal tumors may display increased resistance to immunotherapy compared to epithelial tumors (Dongre et al., 2017). Analyses of our own cohort of melanoma patients treated in first-line with anti-PD1 suggest that ZEB1 expression alone may not be a biomarker of response to immunotherapy, even if the size of the cohort is still rather small to draw definitive conclusion.

However, it is worth mentioning that activation of the Beta-Catenin pathway is not associated to resistance to immunotherapy in human melanoma cohorts. A combination of markers may thus be required. In melanoma, the Innate PD1 Resistance IPRES signature described by the team of Antoni Ribas (Hugo et al., 2016) pointed at the “MAPK inhibitors induced EMT” mesenchymal signature as the second more significant differentially expressed geneset in the non-responding vs. responding tumors. This signature includes mesenchymal genes such as AXL, ROR2, WNT5A, LOXL2, TWIST2, TAGLN AND FAP but neither the ZEB nor the SNAIL family members. However, this cohort included a significant proportion of post-BRAFi samples, and as previously mentioned, bulk RNA-seq analyses have limitations and may be biased since EMT-TFs are expressed in many cell types in the tumor microenvironment. In line with this observation, the EMT score was not statistically different in our own cohort between responders and non-responders. In this respect, inactivation of endothelial ZEB1 expression was recently shown to sensitize tumors to anti-PD1, pointing to a putative cooperative role of various ZEB1-expressing cell types from the microenvironment (Fu et al., 2020).

Finally and importantly, our results suggest that targeting ZEB1 would be an interesting approach to foster the recruitment of CD8+ T cells within the tumor and increase the response to immunotherapy in melanoma. ZEB1 may thus constitute a putative target to increase efficacy of immunotherapy.

Figures legends

Figure 1: High ZEB1 expression in tumor cells is associated with decreased CD8+ T cells infiltration in a cohort of human melanoma samples

A) Heatmap of RNA-Seq data on 56 cutaneous melanoma samples. Patients are in column. First line: ZEB1 expression (TPM). Following lines: Xcell scores of endothelial cells (Endo), cancer associated fibroblasts (CAF), CD8+ naive T cells, CD8+ T cells, NK cells, NK T cells, CD4+ T cells (non-regulatory), CD4+ Th1 T cells, CD4+ Th2 T cells, regulatory T cells (Tregs), M1 Macrophages and M2 Macrophages. ZEB1 expression is correlated with the endothelial and CAF scores ($R^2=0,55$; p-value < 0,0001 and $R^2=0,48$; p-value < 0,0001 respectively). B) Representative pictures of multi-immunofluorescence OPAL stainings for ZEB1 (red), CD8 (green) and SOX10 (White) of a ZEB1 low / CD8 infiltrated (upper panel) and a ZEB1 high / CD8 excluded (lower panel) tumor. Blue: DAPI. Note that in the ZEB1 low tumor, ZEB1 high cells are not SOX10 positive. Scale bars = 100 μ m. Whole tumor regions were reconstructed using the R software (Right panel). Melanoma cells are represented following a color gradient (green, orange, red, black) corresponding to ZEB1 nuclear intensity in melanoma cells (respectively <1; [1;3]; [3;10]; >10). Reconstruction of CD8 location is plotted in blue. The black insets correspond to the pictures. C) Pie charts representing the proportion of ZEB1 low (green) and ZEB1 high (red) tumors within CD8 excluded (n=19) and CD8 infiltrated (n=21) tumors. D) Stacked bar representing the percentage of CD8 excluded (light blue) and CD8 infiltrated (dark blue) tumors within ZEB1 low and ZEB1 high tumors. E) Percentage of CD8 T cells as quantified by IF in ZEB1 low (green, n=28) and ZEB1 high (red, n=10) tumors (Mean with SD, Mann Whitney test). F) Heatmap of combined RNA Seq and IF analyses on 50 cutaneous melanoma samples. Patients are in column. First two lines: IF analysis-based classification in ZEB1 high (red) or ZEB1 low (green) melanoma and CD8 infiltrated (dark blue) or CD8 excluded (light blue) pattern. Following lines: Xcell scores of endothelial cells (Endo), cancer associated fibroblasts (CAF), naive CD8+ T cells, CD8+ T cells.

Figure 2: ZEB1 ectopic expression in melanoma cells increases tumor growth in immunocompetent mice and remodels the composition of the immune infiltrate

A) B16M3 and N6.1 murine melanoma cells were infected with retroviruses expressing ZEB1. Western blot analyses of ZEB1. GAPDH was used as a loading control. B) 3×10^6 B16M3 (Left) or N6.1 (Right) control (green) or ZEB1 overexpressing (red) cells were injected subcutaneously into C57BL6 immunocompetent mice (upper panel) or in immunodeficient RAG KO mice (lower panel). The mean tumor volume is represented (+/- SEM, Mann Whitney test). B16M3: n=17-19; N6.1: n=5. C) FACS analyses of CD45 infiltration two weeks after injection in immunocompetent C57BL6 mice of B16M3 (left) or N6.1 (right) models: control (green); ZEB1 ectopic expression (red), n=4-5 per group. Bar chart representing the number of CD45+ cells / g of tumors (Mean with SD, Mann Whitney test).

Figure 3: ZEB1 ectopic expression in melanoma cells impairs the recruitment of CD8+ T lymphocytes

A) Representative pictures of Hematoxylin and Eosin coloration (H&E), ZEB1 and CD8 immunostainings in B16M3 (left) and N6.1 (right) control and ZEB1-overexpressing tumors collected two weeks after injection in C57BL6 mice. Purple chromogene was used for revelation of IHC in pigmented N6.1 tumors instead of brown DAB for non-pigmented B16M3 tumors. Scale bars = 50 μ m. Arrows indicate purple positive CD8+ T cells. B) Quantification of CD8+ T cells infiltration in B16M3 and N6.1 control versus ZEB1-overexpressing tumors. Bar chart representing the number of CD8 T cell per mm^2 of tumor (n=5-6, mean with SD, Mann Whitney test). C-D-E-F) FACS analyses of CD8+, CD4+ and FOXP3+ CD4+ T regulators (Treg) infiltration in B16M3 and N6.1 control and ZEB1-overexpressing tumors. Bar charts representing the number of CD8+ (C) or CD4+ (D) T cells per gram of tumor. E) Bar charts representing the percentage of Treg

among CD4⁺ T cells in B16M3 control (green) and ZEB1 overexpressing (red) tumors, 14 (left) and 21 (right) days after injection (Mean with SD, Mann Whitney test). F) Bar chart representing the ratio between the number of CD8⁺ T cells and the number of Treg in B16M3 control and ZEB1-overexpressing tumors (Mean with SD, Mann Whitney test). G) Representative pictures of FOXP3 immunostainings in B16M3 control and ZEB1-overexpressing tumors. Tumors were collected two weeks after injection. Scale bars = 50 μ m. H) FACS analyses of CD8 T cells activation within the draining lymph node 4 days after injection of N6.1 control (left, n = 3) or ZEB1-overexpressing (right, n = 3) cells. Stacked bar representing the percentage of CD8 T cells CD62L⁺ CD44⁻ (blue: inactivated), CD62L⁺ CD44⁺ (orange: in activation) and CD62L⁻ CD44⁺ (red, activated).

Figure 4: *Zeb1* knock-out in melanoma cells strongly reduces tumor growth, favors CD8⁺ T cells infiltration and improves the response to immune checkpoint blockade

A) B25F4 murine melanoma cells were infected with lentiviruses expressing the Cas9 and guide RNA (sgRNA) targeting *Zeb1* or scramble sgRNA. 25C13: scramble clone. 25Z22: *Zeb1* KO clone. Western blot analyses of ZEB1. GAPDH was used as a loading control. B) $2,5 \times 10^6$ 25C13 (orange) or 25Z22 (blue) cells were injected subcutaneously into immunocompetent mice and treated with either anti-PD1 (dashed lines) or control isotype (solid lines) 5, 7 and 9 days after injection. The mean tumor volume for 5 mice is represented (+/- SD, Mann Whitney test). C) $2,5 \times 10^6$ 25C13 (orange) or 25Z22 (blue) cells were injected subcutaneously into immunocompetent C57BL6 (n=4-5) or RAG KO (n=3) mice. The mean tumor volume is represented (+/- SD, Mann Whitney test). D) Representative pictures of ZEB1 and CD8 immunostainings in 25C13 (scramble) and 25Z22 (*Zeb1* KO) tumors. Scale bars = 50 μ m. Arrows show stromal and endothelial cells expressing ZEB1, while tumor cells are *Zeb1* KO. Right panel: Quantification of CD8 infiltration

in 25C13 (scramble) and 25Z22 (*Zeb1* KO) tumors. Bar chart representing the number of CD8 T cell per mm² of tumor (Mean with SD, Mann Whitney test).

Figure 5: ZEB1 melanoma cell autonomous secretome impairs CD8+ T cells attraction

A) Heatmap representing the relative quantity of 35 analytes measured using the Meso Scale Diagnostics (MSD) technology in supernatant of dilaceration of control (n=5) or ZEB1-overexpressing (n=8) B16M3 tumors. TGF- β isoforms were also quantified with the same technology in respectively n=6 and n=8 control or ZEB1-overexpressing tumors. B) Bar charts representing the concentration of CXCL10 and TGF- β 2 (pg/mL) in the supernatant of dilacerated B16M3 control (n=5) and ZEB1 overexpressing (n=8) tumors (Mean with SD, Mann Whitney test). C) CD45⁻ cells were sorted from B16M control (n = 3, green) or ZEB1-overexpressing (n = 4, red) tumors and RNA were extracted. Bar chart representing the relative expression of CXCL10 (Mean with SD, Mann Whitney test). D) Quantification of CXCL10 by ELISA *in vitro* in the supernatant of two pairs of scramble or *Zeb1* KO clones.

Supplementary Figures:

Supplementary Figure 1: Analyses of the melanoma single cell RNA-Seq data set from (Jerby-Arnon et al.). ZEB1 mRNA expression (TPM) within cell types: B cells (n=818), Cancer Associated Fibroblast (CAF, n=106), endothelial cells (Endo, n=104), macrophages (n=420), malignant cells (Mal, n=2018), NK cells (n=92), CD4 T cells (n=856), CD8 T cells (n=1759) and T cells (n=706). Mean with SD.

Supplementary Figure 2: ZEB1 immunofluorescence quantification in melanoma cells

A) ZEB1 immunofluorescence quantification in melanoma cells. Example of ZEB1 nuclear quantification specifically in melanoma cells in a ZEB1 low and two ZEB1 high melanoma tumors. Melanoma cells are stained using SOX10 (white, nuclear staining). ZEB1 appears in red and nucleus are stained with Dapi (blue). First line: overview of the entire tumor. Second line: SOX10 and DAPI. Third line: ZEB1 and DAPI. Arrows show ZEB1 staining in stromal cells. Forth line: merge ZEB1, SOX10, DAPI. Bellow: tumor reconstitution using the R software. Melanoma cells are represented following their nuclear expression level of ZEB1. In green: ZEB1 intensity < 1. In orange: ZEB1 intensity in between 1 and 3. In red: ZEB1 intensity in between 3 and 10. In black ZEB1 intensity > 10.

B) Correlation of ZEB1 IF and RNA-seq score. ZEB1 expression level (RNA Seq, TPM) in ZEB1 low and ZEB1 high melanoma samples, as assessed by IF analysis (SOX10+). In green: tumor classified as ZEB1 low using the RNA-Seq approach (the 70% of lowest ZEB1 TPM values). In red: tumors classified as ZEB1 high using the RNA-Seq approach (the 30% of the ZEB1 top values). Grey area: ZEB1 expression levels range where tumors can be missclassified. 16 tumors / 50 (32%) are missclassified.

Supplementary Figure 3: Multi-immunofluorescence analyses of CD8, CD4, PD1 and KI67.

A) Representative CD8 staining (in green) (left) and additionnal markers PD1 (in yellow) and Ki67 (in magenta). Melanoma cells ara stained using SOX10 (in white) and nucleus are stained using DAPI (in blue). Scale bar = 100 μ m. B) Percentages of CD8 cells expressing PD1 (left, CD8+PD1+) and CD8 cells co-expressing PD1 and Ki67 (right, CD8+PD1+KI67+) in excluded (in green) versus infiltrated (in red) tumors. (Mean with SD, Mann Whitney test). C) Representative CD4 staining (in orange, left) and additionnal markers PD1 (in yellow) and Ki67 (in magenta). Melanoma cells ara stained using SOX10 (in white) and nucleus are stained using DAPI (in blue). Scale bar =

100µm. D) Percentages of CD4 T cells (on the left) and CD4 expressing PD1 (on the right) in ZEB1 low (in green) versus ZEB1 high (in red) tumors. (Mean with SD, Mann Whitney test, ns).

Supplementary Figure 4: Immune and melanoma signatures analyses from RNA-seq data

A) Tumors were segregated in ZEB1 high or low tumors based on ZEB1 TPM expression. ZEB1 high represent the 30% of the ZEB1 top values. CD8 T cell Xcell score in ZEB1 low (in green, n = 41) and ZEB1 high (in red, n = 15) tumors is represented (Mean with SD, Mann Whitney test). B-C-D) Tumors were segregated in ZEB1 high or low tumors based on IF analysis. CD8 T cell Xcell score (B), IFN-γ ssGSEA score (C), and Beta-catenin ssGSEA score (D) in ZEB1 low (in green, n = 38) and high (in red, n = 12) tumors (Mean with SD, Mann Whitney test).

Supplementary Figure 5: ZEB1 and CD8 immunohistochemical stainings in a validation cohort of n=22 cutaneous melanoma samples. A) Representative pictures of ZEB1 (red) and CD8 (brown DAB) immunostainings in a ZEB1 low / CD8 infiltrated and a ZEB1 high / CD8 excluded tumor. B) Pie charts representing the proportion of ZEB1 low (green) and ZEB1 high (red) tumors within CD8 excluded (n=11) and CD8 infiltrated (n=11) tumors. C) Stacked bar representing the percentage of CD8 excluded (light blue) and CD8 infiltrated (dark blue) tumors within ZEB1 low (n=13) and ZEB1 high (n=9) tumors.

Supplementary Figure 6: Immune and melanoma signatures analyses from RNA-Seq data of responders versus non-responders patients to anti-PD1 immunotherapy

A) Pie charts representing the number of responders (R) versus non-responders (NR) in desert (n=12), CD8 excluded (n=14) or CD8 infiltrated (n=12) melanoma tumors. B) CD8A expression (TPM, log2), CD8 T cell score (Xcell), CD8 T cell score (MCP Counter), CD8 T cell ssGSEA

score (Gajewski), IFN γ ssGSEA score (Ayers et al.), B-catenin ssGSEA score (Spranger) and EMT ssGSEA score in responders (n=17) versus non-responders (n=21) (Mean with SD, Mann Whitney test). C) Percentages of CD8 PD1+ and CD4 PD1+ quantified in IF in responders (n=16) versus non-responders (n=21). (Mean with SD, Mann Whitney test).

Supplementary Figure 7: Western blot analyses of ZEB1, MITF and PTEN in murine melanoma cell lines B16M3, B25F4, B42M6, BP and N6.1. GAPDH was used as a loading control. PTEN expression is maintained in the BRAFV600 cell lines.

Supplementary Figure 8: Pie chart showing the composition of a representative immune infiltrate of a B16M3 (left) and a N6.1 (right) tumor.

Supplementary Figure 9: Analyses of CD8+ T cells activation in mouse tumors

A) Representative flow cytometry characterization of CD8 T cells. Vertical axis: CD8. Horizontal axis: Granzyme B (GrB), Ki67 and PD1 respectively. B) Percentages of GrB+, Ki67+ and PD1+ CD8 T cells in control (green, n = 5) and ZEB1-overexpressing (red, n = 5) B16M3 tumors. (Mean with SD, Mann Whitney test). C) Percentages of GrB+, Ki67+ and PD1+ CD8 T cells in control (green, n = 6) and ZEB1-overexpressing (red, n = 5) N6.1 tumors (Mean with SD, Mann Whitney test).

Supplementary Figure 10: *Zeb1* knock-out in melanoma cells strongly reduces tumor growth and favors CD8+ T cells infiltration

A) B42M6 murine melanoma cells were infected with lentiviruses expressing the Cas9 and guide RNA (sgRNA) targeting *Zeb1* or scramble sgRNA. 42C1 is a scramble clone and 42Z6 is a *Zeb1* knock-out clone. Western blot analyses of ZEB1. GAPDH was used as a loading control. B) 2,5 \times

10^6 42C1 (orange) or 42Z6 (blue) cells were injected subcutaneously into C57BL6 immunocompetent mice (left, n=6-10 per group) or into RAG KO mice (right, n=2 per group). The mean tumor volume is represented (+/- SD, Mann Whitney test). C) Representative pictures of ZEB1 and CD8 immunostainings (brown, DAB) in 42C1 (scramble) and 42Z6 (*Zeb1* KO) tumors. Scale bars = 50 μ m. Quantification of CD8 infiltration in 42C1 (scramble) and 42Z6 (*Zeb1* KO) tumors. Bar chart representing the number of CD8+ T cell per mm² of tumor (Mean with SD, Mann Whitney test).

Materials and Methods

Human tumor samples

Melanoma tumor samples were obtained through the Biological Resource Center of the Hôpital Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon. Human tumor samples were used with the patient's written informed consent. This study was approved by the scientific board of the Hospices Civils de Lyon. A first cohort of n=60 cutaneous melanoma patients, for which clinical data and response to anti-PD1 treatment were known was used for RNA-seq and multi-immunofluorescence analyses: 38 patients received first-line anti-PD1, while 17 patients received second-line immunotherapy (after first-line anti-CTLA4 or BRAF/MEKi for BRAFV600 mutated patients). All cutaneous melanoma biopsies (primary melanoma or cutaneous metastases) were performed no longer than 1 year before anti-PD1 treatment. Patients were referred to as "responding" when regression of the tumor was observed and referred to as "non-responding" when the tumor progressed or remained stable after 3 months of treatment, according to RECIST criteria. A cohort of n=22 melanoma patients previously stained and scored for ZEB1 expression was used to validate the inverse correlation with CD8+ T cells infiltrate by IHC (Richard et al., 2016).

RNA sequencing analyses

RNA was extracted from FFPE sections with the RNeasy FFPE Kit (Qiagen). Libraries were prepared from 100ng RNA with the TruSeq RNA exome kit (Illumina) and sequencing was performed on the CLB genomic platform, on an Illumina NextSeq machine with a paired-end protocol (2x75bp, 64Mp reads). Raw sequencing reads were aligned on the human genome (GRCh38) with STAR (v2.7.3a), with the annotation of known genes from gencode v33. Gene expression was quantified using Salmon (1.1.0) and the annotation of protein coding genes from gencode v33. RNA-seq quality controls and analyses were performed on the Gilles Thomas

Bioinformatic platform. Pathway-enrichment analyses were conducted using MSigDB gene sets from msigdb R package. GSEAs were carried out using fgsea R package. ssGSEA scores were computed through gsva R package. Hallmark EMT transcriptomic signature, defined by Liberzon et al., was used to compute EMT score for each sample (292). Estimation of immune and non-immune enrichments from tumor microenvironment were determined through gene expression analysis using XCell deconvolution method.

ZEB1 mRNA expression (TPM) was also analyzed in the melanoma single cell RNA-Seq data set from (Jerby-arnon et al., 2018).

7-color immunofluorescence multiplex analyses and immunohistochemical stainings

3- μ m tissue sections were cut from formalin-fixed paraffin-embedded human melanoma specimens. The sections underwent immunofluorescence staining using the OPAL™ technology (Akoya Biosciences) on a Leica Bond RX. A 7-color panel was designed. DAPI was used for nuclei detection.

| Antibody | Description | Opal | Reference | Dilution | Staining localization |
|--------------|----------------------|------|----------------------|----------|-----------------------|
| ZEB1 | | 570 | HPA02752 Sigma | 1/100 | Nuclear |
| SOX10 | Melanoma cell marker | 480 | sc-365692 Santa Cruz | 1/1000 | Nuclear |
| CD8 | CD8+ T Lymphocytes | 620 | M7103 DAKO | 1/40 | Membrane |
| CD4 | CD4+ T Lymphocytes | 520 | 104R-16 Sigma | 1/30 | Membrane |
| PD1 | Immune Checkpoint | 780 | Ab137132 Abcam | 1/300 | Membrane |
| Ki67 | Proliferation marker | 690 | M7240 DAKO | 1/100 | Nuclear |

Sections were numerized with a Vectra Polaris scanner (Perkin Elmer, USA). An autofluorescence treatment of images was carried out using the Inform software (Perkin Elmer). A blinded evaluation of the staining was carried using the HALO™ Image Analysis Software (Indica Labs). Number of SOX10, ZEB1, CD8, CD4 positive cells were quantified using the HighPlex module. ZEB1+SOX10+ cells were assigned as ZEB1+ melanoma cells. Further data analyses were performed using the R software. For CD8, a cut-off (<1,5% of total nuclei) was applied to define the “immune desert”. The localization of CD8+ T cells was further analyzed and defined as

invasive margin or intra-tumoral, allowing to classify the tumors as “excluded” or “infiltrated” respectively.

For the validation cohort, sections underwent immunohisto-chemical staining with an antibody against CD8, using steam heat-induced epitope retrieval, the Ventana Benchmark XT platform (Ventana-Roche Tissue Diagnostics, Meylan France) and DAB detection. The number of CD8 was quantified using HALO.

Mouse injections

Experiments using mice were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee and the french MESRI (CECCAPP-2018-022 #17220). Mice were housed and bred in a specific pathogen free animal facility “AniCan” at the CRCL, Lyon, France. Single cell suspensions of B16M3, B25F4, B42M6 cell models ($2.5-3 \times 10^6$ cells), in PBS/Matrigel (BD Biosciences, Oxford, UK) (1/1) were injected subcutaneously into the flank of six-week old male C57BL/6 J mice (Charles River laboratories). RAG2 KO (kindly provided by Julien Marie) were bred in house. Tumor growth was monitored during 2-6 weeks post-injection. Tumors grew up to 1.5 cm in diameter, at which point animals were euthanized.

For anti-PD1 treatment, 5 days after injection, mice were treated with intra-peritoneal injection of 200 μ g of anti-PD1 rat anti-mouse PD1 clone RMP1-14 (BP0146, Bio X Cell) or with the control isotype two times a week for two weeks.

Mouse tumor samples IHC staining analyses

Tumors were embedded in paraffin and ZEB1 staining was performed using the anti-ZEB1 antibody (IHC-00419, 1/500, Bethyl) as well as the anti-CD8 antibody (clone 4SM15, 14-0808-82, 1/500, Invitrogen), the anti-CD4 antibody (clone 4SM95, 14-9766-82, 1/1000, Invitrogen), the anti-FOXP3 antibody (clone FJK-16s, 14-5773-82, 1/50, Invitrogen), DAB (brown) or purple

chromogene (for heavily pigmented tumors) detection and counterstaining with hematoxylin. Images were numerized with a 3DHistech Panoramic SCAN2 scanner. Quantification was done with HALO™ Image Analysis Software (Indica Labs).

Cell culture and reagents

B16M3, B25F4, B42M6 mouse melanoma cell lines were established from the *LSL-BrafV600E;Tyr::CreERT2*^{+/-o} mouse model (Dhomen et al., 2009). N6.1 was established from *Tyr:NrasQ61* (Ackermann et al., 2005) melanoma bearing mice. Both mouse models were kindly provided by Lionel Larue. BrafV600E mutation was induced in melanocytes by administrating Tamoxifen (Sigma) on the back skin. Established B16M3, B25F4, B42M6, N6.1 mouse melanoma cell lines were then culture in RPMI 1640 Glutamax (61870044, Life Technologies) complemented with 10% FBS (Cambrex) and 100 U/ml penicillin-streptomycin (15140148, Gibco). The absence of Mycoplasma contamination was checked every 3 weeks with the MycoAlert detection kit (LT07-318, Lonza).

Mouse tumors samples immunophenotyping using flow cytometry

Tumors were dissociated, digested 20 minutes at 37°C in a digestion medium composed of DnaseI type II (D4527, 10µg/mL, Sigma), Collagenase A (COLLA-RO 11088793001, 2mg/mL, Sigma) in RPMI complemented with 2% FBS and filtered using MACS SmartStrainer 70µm (Miltenyi). Dying cells were first stained using the Fixable Viability Dye eFluor™ 506 (65-0866-18, 1/400, eBioscience) for 20 minutes at room temperature in the dark. $1 \cdot 10^6$ cells per conditions were then stained for extracellular markers for 1 hour at 4°C in the dark. After 3 washes in PBS complemented with 0.5mM EDTA and 2% FBS, streptavidin staining was done for 20 minutes at 4°C in the dark. After 3 washes, cells were fixed and permeabilized 40 minutes at 4°C in the dark (Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set, 00-5523, eBioscience). After one wash in the

permeabilizing buffer, cells were stained for intracellular staining overnight at 4°C in the dark. After 3 wash in permeabilizing buffer, cells were counted on a BD LSRFortessa™ Flow Cytometer (BD Biosciences-IN). Data were analyzed using the FlowJo_V10 software.

| Marker | Fluo | Dilution | Reference | Company |
|-------------------|--------------|-----------------|------------------|----------------|
| CD11b | BV650 | 1/100 | 563402 | BD |
| CD19 | PE-Dazzle594 | 1/200 | 115554 | Biolegend |
| CD3 | BV650 | 1/200 | 564378 | BD |
| CD3 | PE-Dazzle594 | 1/200 | 100348 | Biolegend |
| CD4 | AF 700 | 1/100 | 56-0042-82 | eBioscience |
| CD45 | APC-Cy7 | 1/400 | 557659 | BD |
| CD45 | AF 700 | 1/400 | 103128 | Biolegend |
| CD8 | BV711 | 1/100 | 100747 | Biolegend |
| CXCR3 | BV450 | 1/100 | 126521 | Biolegend |
| F4/80 | BV450 | 1/100 | BLE123132 | Biolegend |
| FoxP3 | PE Cy7 | 1/200 | 25-5773-82 | eBioscience |
| Granzyme B | APC | 1/100 | 515406 | Biolegend |
| Ki67 | AF488 | 1/100 | 652417 | Biolegend |
| LY6c | APC-Cy7 | 1/100 | 560596 | BD |
| NKP46 | APC | 1/50 | BLE137608 | Biolegend |
| PD1 | PE-Dazzle594 | 1/100 | 562523 | BD |

Cytokines quantification in the supernatant of dilacerated tumors

14 days after subcutaneous injection of melanoma mouse cell lines in C57BL6/J mice, mice were euthanized, tumors were dissected and dissociated in RPMI complemented with 2% FBS at the concentration of 500mg tumor per mL. Supernatant of dilacerations were centrifuged at 1000 RPM 5 minutes and stored at -80°C. EPO, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10,

IL-12/IL-23p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-17A/F, IL-17C, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27p28/IL-30, IL-31, IL-33, IP-10, KC/GRO, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, MIP-3 α , TNF- α , VEGF-A and TGF- β isoforms 1, 2 and 3 quantities were measured using the Meso Scale Diagnostics technology (K15083K, U-PLEX Biomarker Group 1 (ms) 35-Plex and K15242K, U-PLEX TGF- β Combo (ms)).

Viral infections

For ZEB1-overexpression using retroviral infection, Platinum-E Retroviral Packaging cells PLAT-E (4×10^6) were transfected with retroviral expression constructs (10 μ g) using Genejuice (Millipore). HA-Zeb1 in a pBabe-puro vector was previously described (reference Caramel et al; 2013). For *Zeb1* knock-out, human embryonic kidney 293T cells (4×10^6) were transfected with lentiviral expression constructs (10 μ g) in combination with GAG-POL (5 μ g) and ENV expression vectors (10 μ g). The constructs allowed the insertion in an all in one manner of the Cas9 nuclease and the guide RNA scramble or targeting ZEB1 in a pLenti-Puro vector (pLenti-All-in-one-U6-sgRNA mouse *Zeb1* (target2) or scramble -SFFV-Cas9 nuclease-2A-Puro) (Applied Biological Materials Inc., Richmond, Canada). The sequence of the sgRNA targeting ZEB1 are the following: GCCTCTATCACAAATACGGGC (forward), GCCCGTATTGTGATAGAGGC (reverse). Viral supernatants were collected 48 h post-transfection, filtered (0.45 μ m membrane) and placed in contact with 2×10^6 melanoma cells for 8 h in the presence of 8 μ g/ml polybrene. Forty-eight hours post-infection, cells were selected in the presence of puromycin (1 μ g/ml) (Invitrogen). Knock-out clones were screened by western-blot and Sanger Sequencing.

Immunoblot analyses

Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) containing CaCl₂ and then lysed in a 100 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8.0 RIPA buffer supplemented with a

complete protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Protein expression was examined by Western blot using the anti-ZEB1 (HPA027524, 1/200, Sigma) antibodies for primary detection. Loading was controlled using the anti-GAPDH (1/20000, Millipore) antibody. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibodies (Glostrup) was used as secondary antibodies. Western blot detections were conducted using the Luminol reagent (Santa Cruz). Western Blot Digital Imaging was performed with ChemiDoc™ MP Imager (Bio-Rad).

RT-Q-PCR

Total RNA was isolated using RNeasy Kit (QIAGEN) and reverse transcribed using a high cDNA capacity reverse transcription kit following the manufacturer's instructions (Fisher Scientific). Real-time PCR intron-spanning assays were designed using the ProbeFinder software (Roche). All reactions, including no-template controls and RT controls were performed in triplicate on a CFX96 (Bio-Rad) and were analyzed with the Bio-Rad CFX manager software. Mouse *HPRT1* was used for normalization. The primers used were:

CXCL10 F: 5' CAT CCT GCT GGG TCT GAG TG 3' ; R : 5' ATT CTC ACT GGC CCG TCA TC 3' ; ZEB1 F : GAG GTA AAG CGT TTA TAG CCT CTA TCA ; R : AGG GCA CAC CAG AAG CCA G.

ELISA CXCL10

2.10⁵ B25F4 (scramble C13, *Zeb1* KO Z22) and B42M6 (scramble C1, *Zeb1* KO Z6) cells were plated in 24-well culture plate and cultivated in RPMI 1640 Glutamax (61870044, Life Technologies) complemented with 2% FBS and 100 U/ml penicillin-streptomycin (15140148, Gibco) for 3 days. Supernatants were then collected, centrifuged at 1000 RPM for 5 minutes and frozen until ELISA was performed. All reagents were purchased from R&D Systems and ELISA was performed according to the manufacturer's protocol (Mouse CXCL10/IP-10 DuoSet, DY466-

05; DuoSet Ancillary Kit 2, DY008). The results were determined by measuring the absorbance at 450nm with a microplate reader CFX.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) or R software (version 3.6.1) (Ref). All experiments were performed at least in triplicate. Data are presented as mean \pm s.d. or \pm s.e.m as specified in the figure legends. To assess significant correlation between signatures, a Pearson's correlation coefficient was performed. To determine significant differences between two groups, parametric data were analysed using a Mann Whitney test. All statistical tests were two-tailed. The p-values obtained were considered significant <0.05 .

Heatmaps were generated with Excel.

Data availability (RNA-Seq data).

Acknowledgements

The authors would like to thank Brigitte Manship for critical reading, Amélien Sanlaville for his help with FACS analyses, Julien Marie for RagKO mice and Frédérique Fauvet for her help with the generation of KO cell lines. This work was funded by the Ligue Nationale contre le Cancer, the LABEX DEVweCAN of the University of Lyon (ANR-10-LABX-0061), the Lyon Integrated Research Institute in Cancer (LYRICAN XX). The work was additionally supported by the Institut National contre le Cancer (INCa PAIR melanoma D22044, PRTK Melpredict), the Fondation de France (project 67134), ARC (Sign'it grant), the Société Française de Dermatologie (SFD), the association Melarnaud and Vaincre le Mélanome. ML was supported by a fellowship from “Région Rhône Alpes” and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

Author contributions

ML performed and analyzed all experiments with the help of VB and MG. JB contributed to IF stainings and analyses. LT performed RNA-Seq bioinformatics analyses. SD, JL, ML, GT provided human samples and clinical data from the human sample experiments. BB performed the pathological examination of the stainings. LR provided mouse models. NBV, BD and CC helped to design and interpret data. AP provided grant support and advices. ML, JC and SD conceived the project, designed experiments, and interpreted data. JC supervised the whole project and wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that no conflict of interest exists.

References

- Abril-Rodriguez, G., Torrejon, D.Y., Liu, W., Zaretsky, J.M., Nowicki, T.S., Tsoi, J., Puig-Saus, C., Baselga-Carretero, I., Medina, E., Quist, M.J., et al. (2020). PAK4 inhibition improves PD-1 blockade immunotherapy. *Nat. Cancer* *1*, 46–58.
- Ackermann, J., Fruttschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A., and Beermann, F. (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* *65*, 4005–4011.
- Arozarena, I., and Wellbrock, C. (2019). Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer* *19*, 377–391.
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Sborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., et al. (2013). A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* *24*, 466–480.

Caramel, J., Ligier, M., and Puisieux, A. (2018). Pleiotropic roles for ZEB1 in cancer. *Cancer Res.* 78, 30–35.

Cheli, Y., Giuliano, 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.

Cheli, Y., Giuliano, S., Fenouille, N., Allegra, M., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Lacour, J.-P., Tartare-Deckert, S., Bertolotto, C., et al. (2012). Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene* 31, 2461–2470.

Cooper, Z.A., Juneja, V.R., Sage, P.T., Frederick, D.T., Piris, A., Mitra, D., Lo, J.A., Hodi, F.S., Freeman, G.J., Bosenberg, M.W., et al. (2014). Response to BRAF inhibition in Melanoma is enhanced when combined with immune checkpoint blockade. *Cancer Immunol. Res.* 2, 643–654.

Dangaj, D., Bruand, M., Grimm, A.J., Ronet, C., Barras, D., Duttagupta, P.A., Lanitis, E., Duraiswamy, J., Tanyi, J.L., Benencia, F., et al. (2019). Cooperation between Constitutive and Inducible Chemokines Enables T Cell Engraftment and Immune Attack in Solid Tumors. *Cancer Cell* 35, 885-900.e10.

Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell* 15, 294–303.

Dongre, A., Rashidian, M., Reinhardt, F., Bagnato, A., Keckesova, Z., Ploegh, H.L., and Weinberg, R.A. (2017). Epithelial-to-mesenchymal transition contributes to immunosuppression in breast carcinomas. *Cancer Res.* 77, 3982–3989.

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.

Fu, R., Lu, T., Wu, Z., Fu, R., Li, Y., Jiang, N., Ren, B., Zang, C., Liu, L., Lv, W., et al. (2020). Inactivation of endothelial ZEB1 impedes tumor progression and sensitizes tumors to conventional therapies. *J. Clin. Invest.* *130*, 1252–1270.

Hoek, K.S., and Goding, C.R. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* *23*, 746–759.

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

Hugo, W., Zaretsky, J.M., Sun, L., Song, C., Moreno, B.H., Hu-Lieskovan, S., Berent-Maoz, B., Pang, J., Chmielowski, B., Cherry, G., et al. (2016). Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* *165*, 35–44.

Jerby-arnon, L., Shah, P., Cuoco, M.S., Rodman, C., Su, M., Melms, J.C., Leeson, R., Kanodia, A., Mei, S., Lin, J., et al. (2018). A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Cell* *175*, 984–997.

Kalbasi, A., and Ribas, A. (2020). Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nat. Rev. Immunol.* *20*, 25–39.

Katsura, A., Tamura, Y., Hokari, S., Harada, M., Morikawa, M., Sakurai, T., Takahashi, K., Mizutani, A., Nishida, J., Yokoyama, Y., et al. (2017). ZEB1-regulated inflammatory phenotype in breast cancer cells. *Mol. Oncol.* *11*, 1241–1262.

Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T., and Kawakami, Y. (2009). Cancer Metastasis Is Accelerated through Immunosuppression during Snail-Induced EMT of Cancer Cells. *Cancer Cell* *15*, 195–206.

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Rutkowski, P., Lao, C.D., Cowey, C.L., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., et al. (2019). Five-year survival with combined

nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* *381*, 1535–1546.

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

Peng, W., Chen, J.Q., Liu, C., Malu, S., Creasy, C., Tetzlaff, M.T., Xu, C., McKenzie, J.A., Zhang, C., Liang, X., et al. (2016). Loss of PTEN promotes resistance to T cell–mediated immunotherapy. *Cancer Discov.* *6*, 202–216.

Puisieux, A., Brabletz, T., and Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat. Cell Biol.* *16*, 488–494.

Rambow, F., Rogiers, A., Marin-bejar, O., Aibar, S., Femel, J., and Dewaele, M. (2018). Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* 1–13.

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

Richard, G., Dalle, S., Monet, M.-A., Ligier, M., Boespflug, A., Pommier, R.M., de la Fouchardière, A., Perier-Muzet, M., Depaepe, L., Barnault, R., et al. (2016). ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors. *EMBO Mol. Med.* *8*, 1143–1161.

Scott, C.L., and Omilusik, K.D. (2019). ZEBs: Novel Players in Immune Cell Development and Function. *Trends Immunol.* *40*, 431–446.

Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* *168*, 707–723.

Shibue, T., and Weinberg, R.A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*, 611–629.

Spranger, S., Bao, R., and Gajewski, T.F. (2015). Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 523, 231–235.

Spranger, S., Dai, D., Horton, B., and Gajewski, T.F. (2017). Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell* 31, 711–723.

Tang, Y., Durand, S., Dalle, S., and Caramel, J. (2020). EMT-Inducing Transcription Factors, Drivers of Melanoma Phenotype Switching , and Resistance to Treatment. *Cancers (Basel)*. 12, 2154.

Terry, S., Savagner, P., Ortiz-Cuaran, S., Mahjoubi, L., Saintigny, P., Thiery, J.P., and Chouaib, S. (2017). New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Mol. Oncol.* 11, 824–846.

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

Verfaillie, A., Imrichova, H., Atak, Z.K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., Christiaens, V., Svetlichnyy, D., Luciani, F., Van den Mooter, L., et al. (2015). Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat. Commun.* 6, 1–16.

Wiedemann, G.M., Aithal, C., Kraechan, A., Heise, C., Cadilha, B.L., Zhang, J., Duewell, P., Ballotti, R., Endres, S., Bertolotto, C., et al. (2019). Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) Regulates Immune Cell Migration into Melanoma. *Transl. Oncol.* 12, 350–360.

Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J.-J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P.F., et al. (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 377, 1345–1356.

Zingg, D., Arenas-ramirez, N., Sahin, D., Haeusel, J., Sommer, L., Boyman, O., Zingg, D., Arenas-

ramirez, N., Sahin, D., Rosalia, R.A., et al. (2017). The Histone Methyltransferase Ezh2 Controls Mechanisms of Adaptive Resistance to Tumor Article The Histone Methyltransferase Ezh2 Controls Mechanisms of Adaptive Resistance to Tumor Immunotherapy. *CellReports* 20, 854–867.

Figure 1

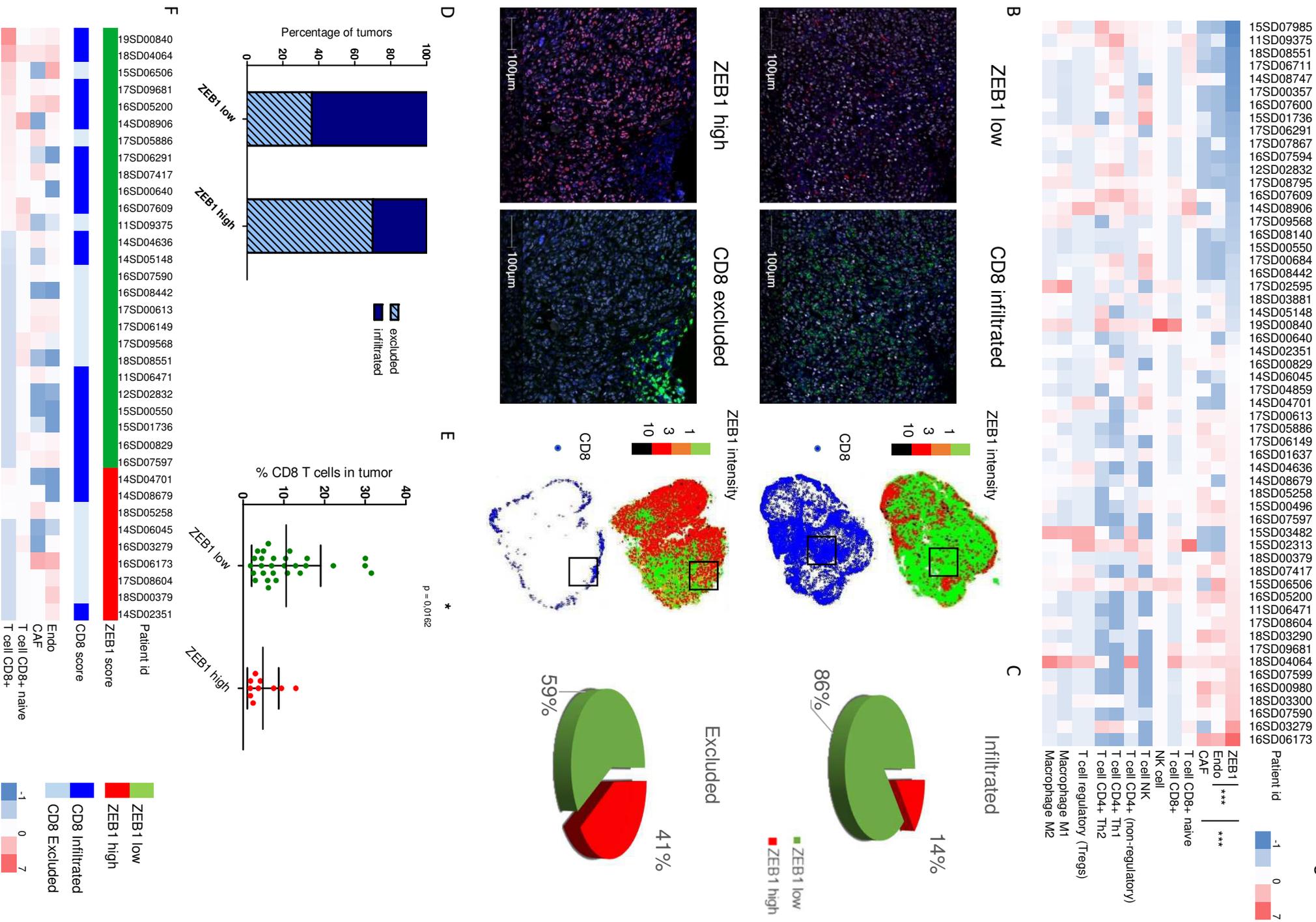


Figure 2

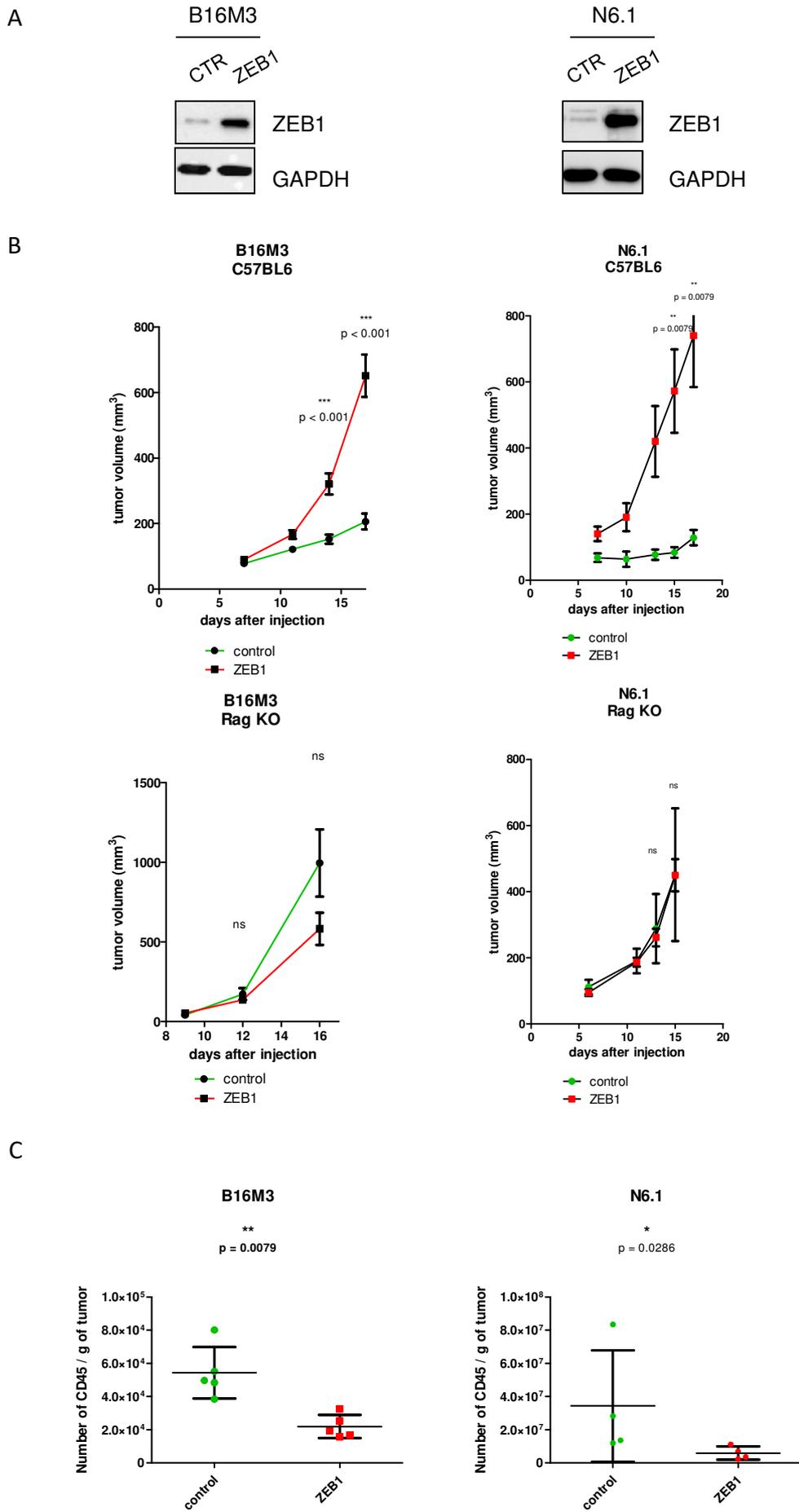


Figure 3

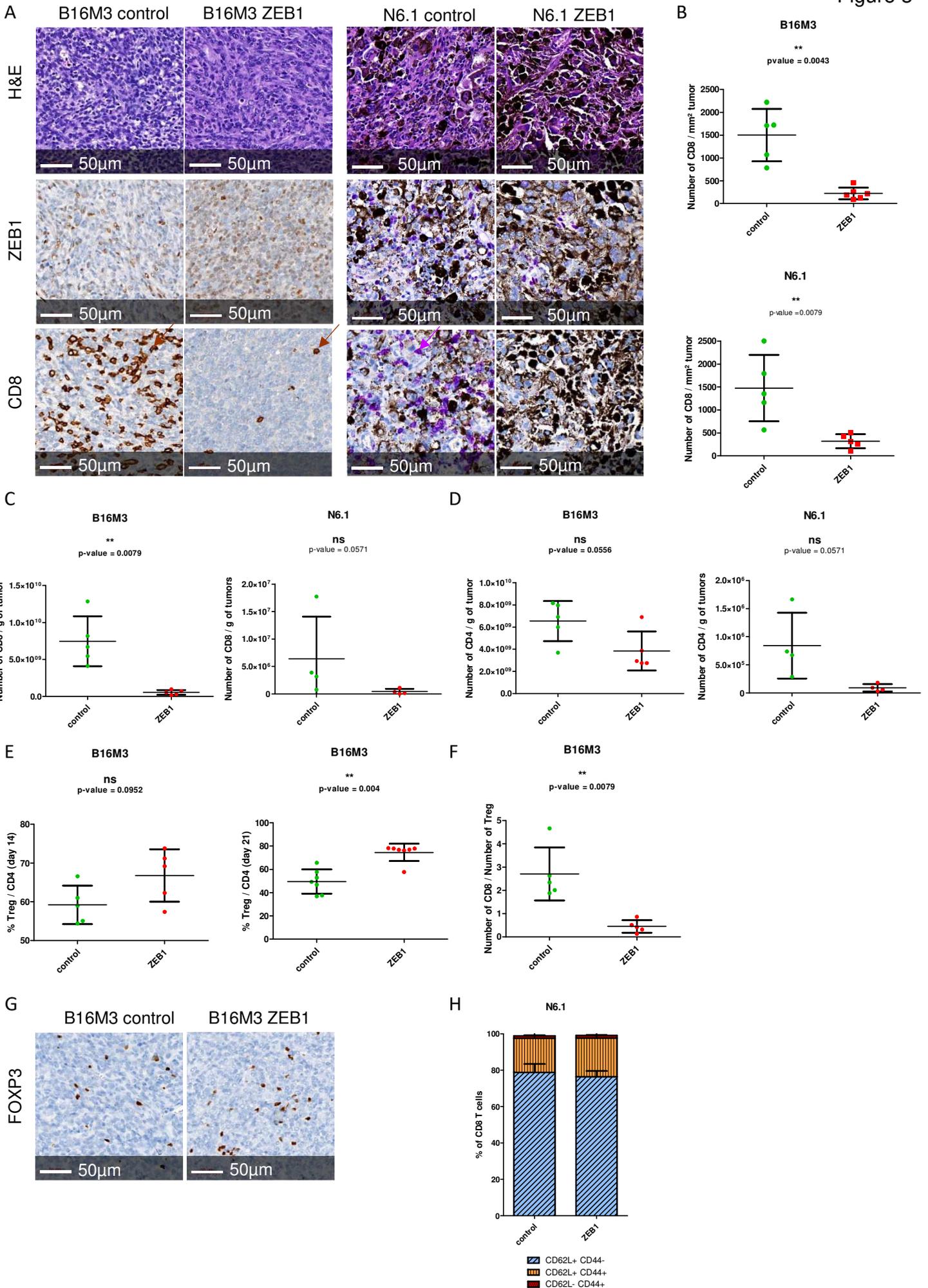


Figure 4

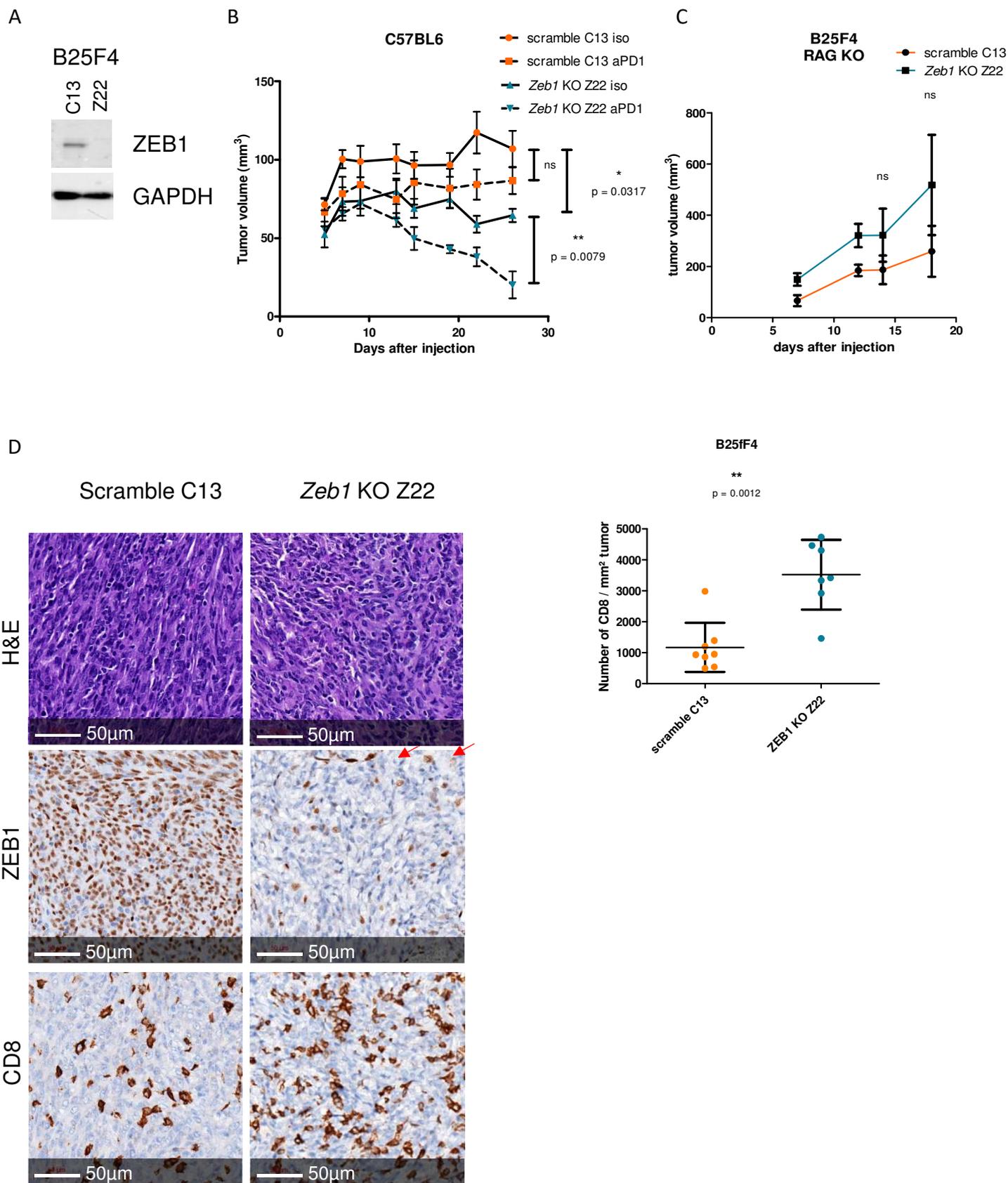


Figure 5

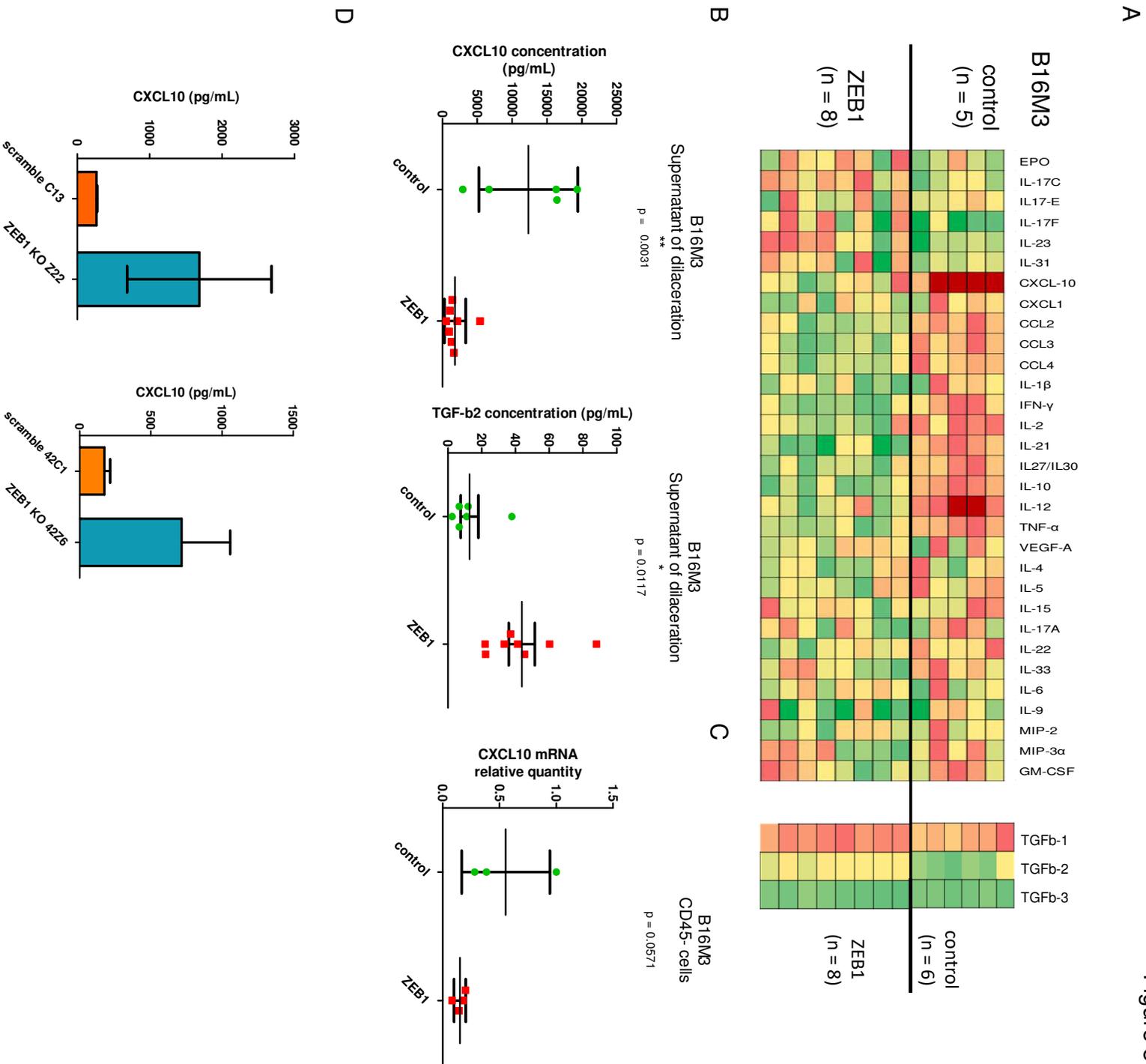
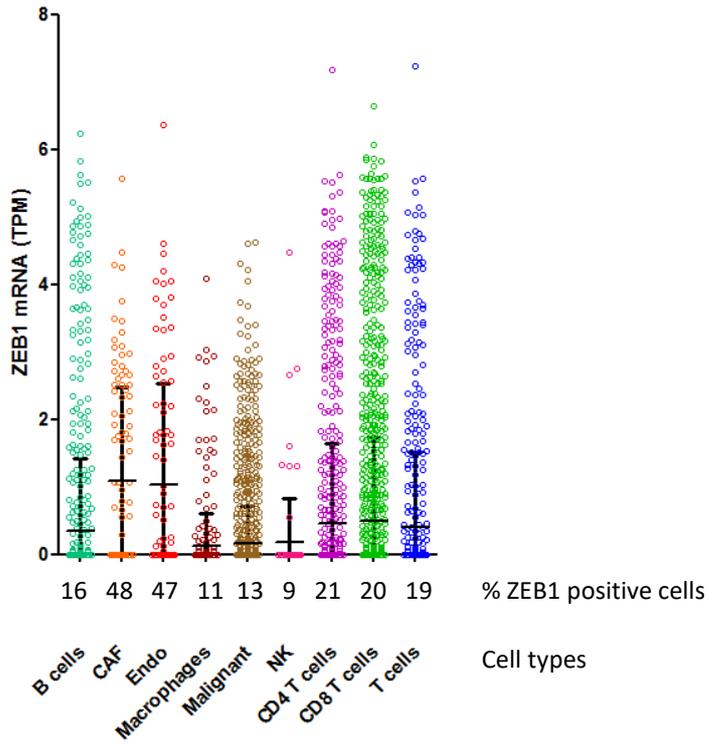


Table 1

| id_patient | RNA-Seq | IF | ZEB1 statut | CD8 Statut | Treatment | Response |
|-------------------|----------------|-----------|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|
| 14SD04701 | available | available | high | Infiltrated | first line anti-PD1 | R |
| 16SD00980 | available | available | high | Desert | first line anti-PD1 | NR |
| 16SD01637 | available | available | high | Desert | first line anti-PD1 | NR |
| 16SD03279 | available | available | high | Excluded | first line anti-PD1 | R |
| 16SD06173 | available | available | high | Excluded | first line anti-PD1 | R |
| 17SD08604 | available | available | high | Excluded | first line anti-PD1 | R |
| 18SD00379 | available | available | high | Excluded | first line anti-PD1 | NR |
| 18SD03300 | available | available | high | Desert | first line anti-PD1 | NR |
| 18SD05258 | available | available | high | Excluded | first line anti-PD1 | R |
| 12SD05363 | NA | available | high | Excluded | second line anti-PD1 | - |
| 14SD02351 | available | available | high | infiltrated | second line anti-PD1 | - |
| 14SD06045 | available | available | high | Excluded | second line anti-PD1 | - |
| 14SD08679 | available | available | high | infiltrated | second line anti-PD1 | - |
| 14SD04636 | available | available | low | infiltrated | first line anti-PD1 | NR |
| 14SD05148 | available | available | low | infiltrated | first line anti-PD1 | NR |
| 15SD00496 | available | available | low | Desert | first line anti-PD1 | NR |
| 15SD06506 | available | available | low | Excluded | first line anti-PD1 | R |
| 15SD07985 | available | available | low | Desert | first line anti-PD1 | NR |
| 16SD00640 | available | available | low | Infiltrated | first line anti-PD1 | R |
| 16SD00829 | available | available | low | Infiltrated | first line anti-PD1 | NR |
| 16SD05200 | available | available | low | Infiltrated | first line anti-PD1 | NR |
| 16SD08140 | available | available | low | Desert | first line anti-PD1 | R |
| 16SD08442 | available | available | low | Excluded | first line anti-PD1 | NR |
| 17SD00357 | available | available | low | Desert | first line anti-PD1 | NR |
| 17SD00613 | available | available | low | Excluded | first line anti-PD1 | NR |
| 17SD04859 | available | available | low | Desert | first line anti-PD1 | NR |
| 17SD05886 | available | available | low | Excluded | first line anti-PD1 | R |
| 17SD06149 | available | available | low | Excluded | first line anti-PD1 | R |
| 17SD06291 | available | available | low | Infiltrated | first line anti-PD1 | NR |
| 17SD06711 | available | available | low | Desert | first line anti-PD1 | NR |
| 17SD07867 | available | available | low | Desert | first line anti-PD1 | NR |
| 17SD08795 | available | available | low | Desert | first line anti-PD1 | R |
| 17SD09568 | available | available | low | Excluded | first line anti-PD1 | NR |
| 17sd09681 | available | available | low | Infiltrated | first line anti-PD1 | NR |
| 18SD03290 | available | available | low | Desert | first line anti-PD1 | NR |
| 18SD03881 | available | available | low | Desert | first line anti-PD1 | NR |
| 18SD04064 | available | available | low | infiltrated | first line anti-PD1 | R |
| 18SD07417 | available | available | low | Infiltrated | first line anti-PD1 | R |
| 18SD08551 | available | available | low | Excluded | first line anti-PD1 | R |
| 19SD00840 | available | available | low | Infiltrated | first line anti-PD1 | R |
| 19SD07475 | NA | available | low | Desert | first line anti-PD1 | R |
| 16SD06937 | NA | available | low | infiltrated | first line anti-PD1 | NR |
| 15SD06183 | NA | available | low | Excluded | NA | - |
| 11SD06471 | available | available | low | Infiltrated | second line anti-PD1 | - |
| 11SD09375 | available | available | low | Excluded | second line anti-PD1 | - |

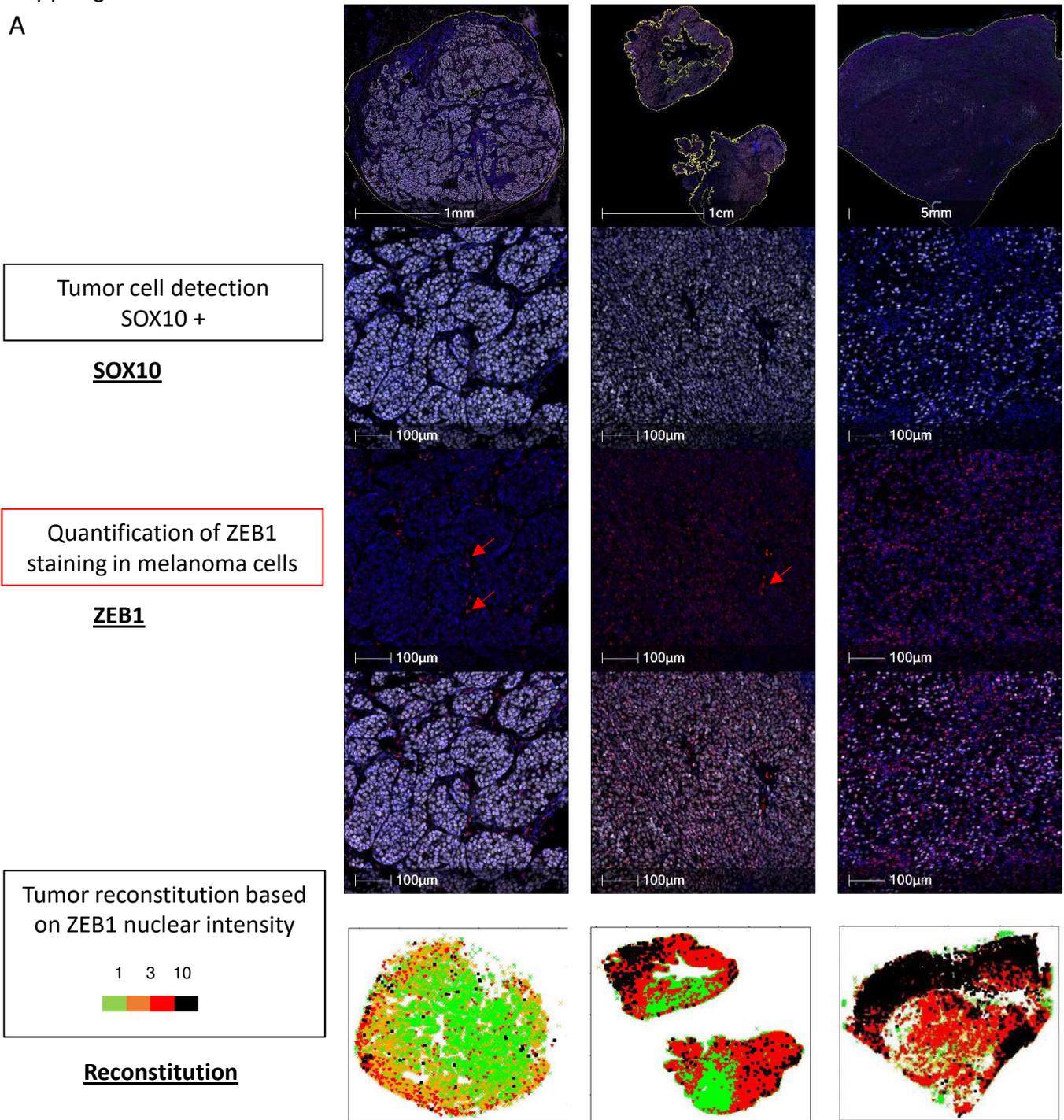
| | | | | | | |
|-----------|-----------|-----------|-----|-------------|----------------------|---|
| 12sd02832 | available | available | low | infiltrated | second line anti-PD1 | - |
| 14SD08906 | available | available | low | Infiltrated | second line anti-PD1 | - |
| 15SD00550 | available | available | low | Infiltrated | second line anti-PD1 | - |
| 15SD01736 | available | available | low | Infiltrated | second line anti-PD1 | - |
| 16SD07590 | available | available | low | Excluded | second line anti-PD1 | - |
| 16SD07597 | available | available | low | Infiltrated | second line anti-PD1 | - |
| 16SD07600 | available | available | low | Desert | second line anti-PD1 | - |
| 16SD07609 | available | available | low | Infiltrated | second line anti-PD1 | - |
| 17SD00684 | available | available | low | Desert | second line anti-PD1 | - |
| 14SD08747 | available | NA | NA | NA | first line anti-PD1 | R |
| 17SD02595 | available | NA | NA | NA | first line anti-PD1 | R |
| 15SD02313 | available | NA | NA | NA | second line anti-PD1 | - |
| 15SD03482 | available | NA | NA | NA | second line anti-PD1 | - |
| 16SD07594 | available | NA | NA | NA | second line anti-PD1 | - |
| 16SD07599 | available | NA | NA | NA | second line anti-PD1 | - |

Supp Fig 1

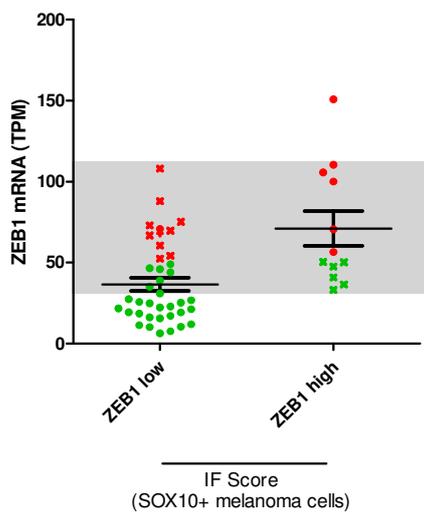


Supp Fig 2

A

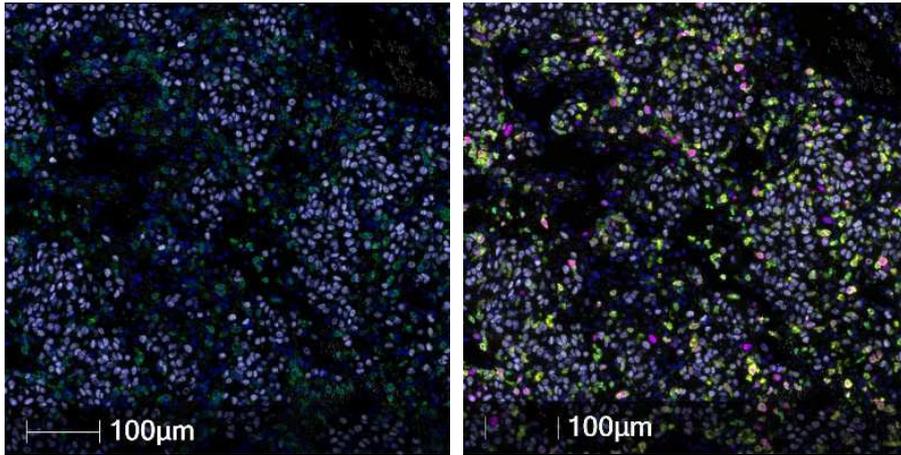


B

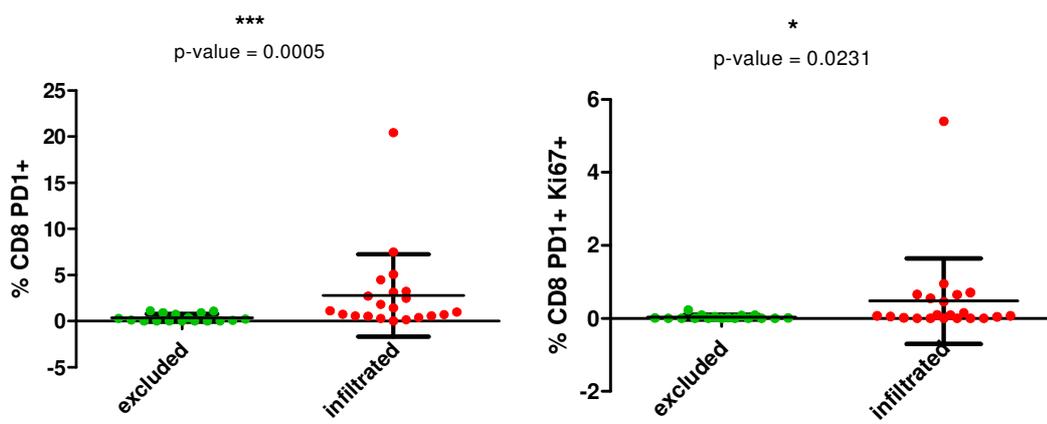


Supp Fig 3

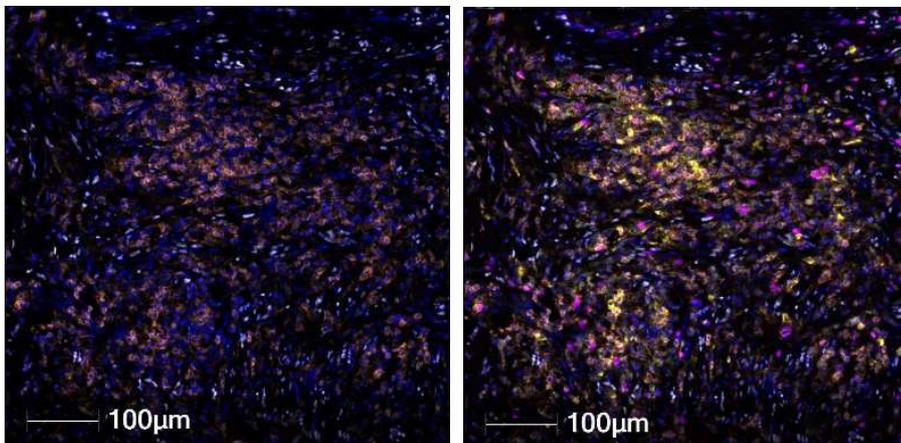
A



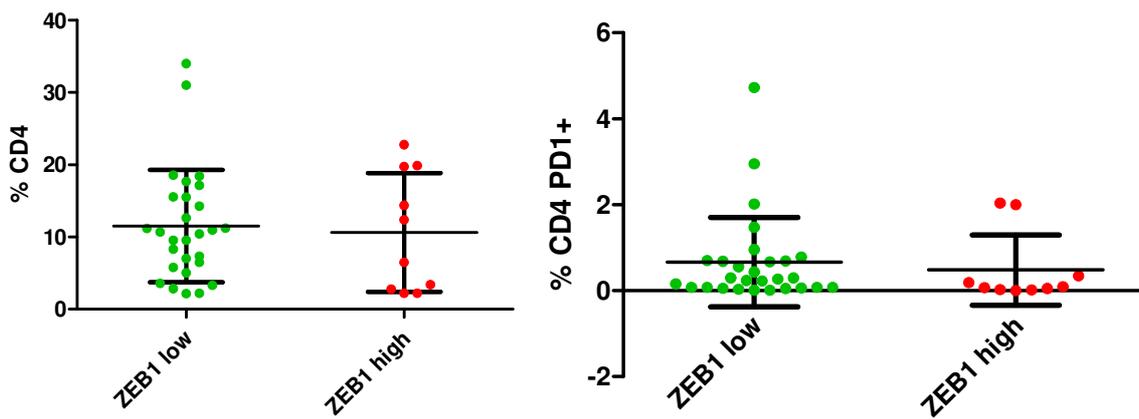
B



C

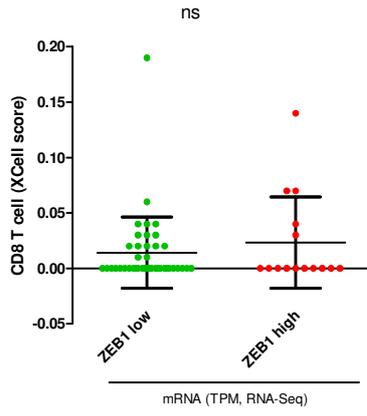


D

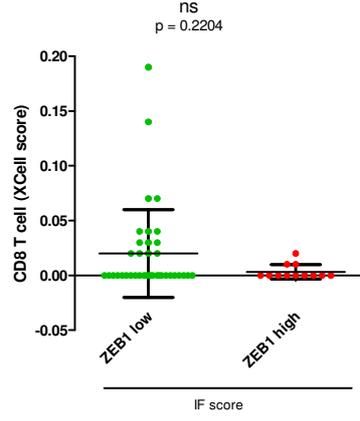


Supp Fig 4

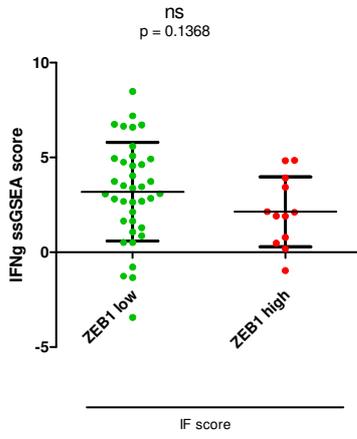
A



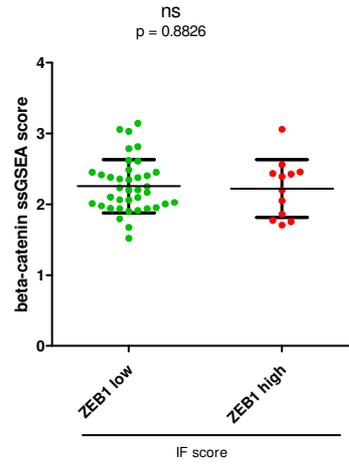
B



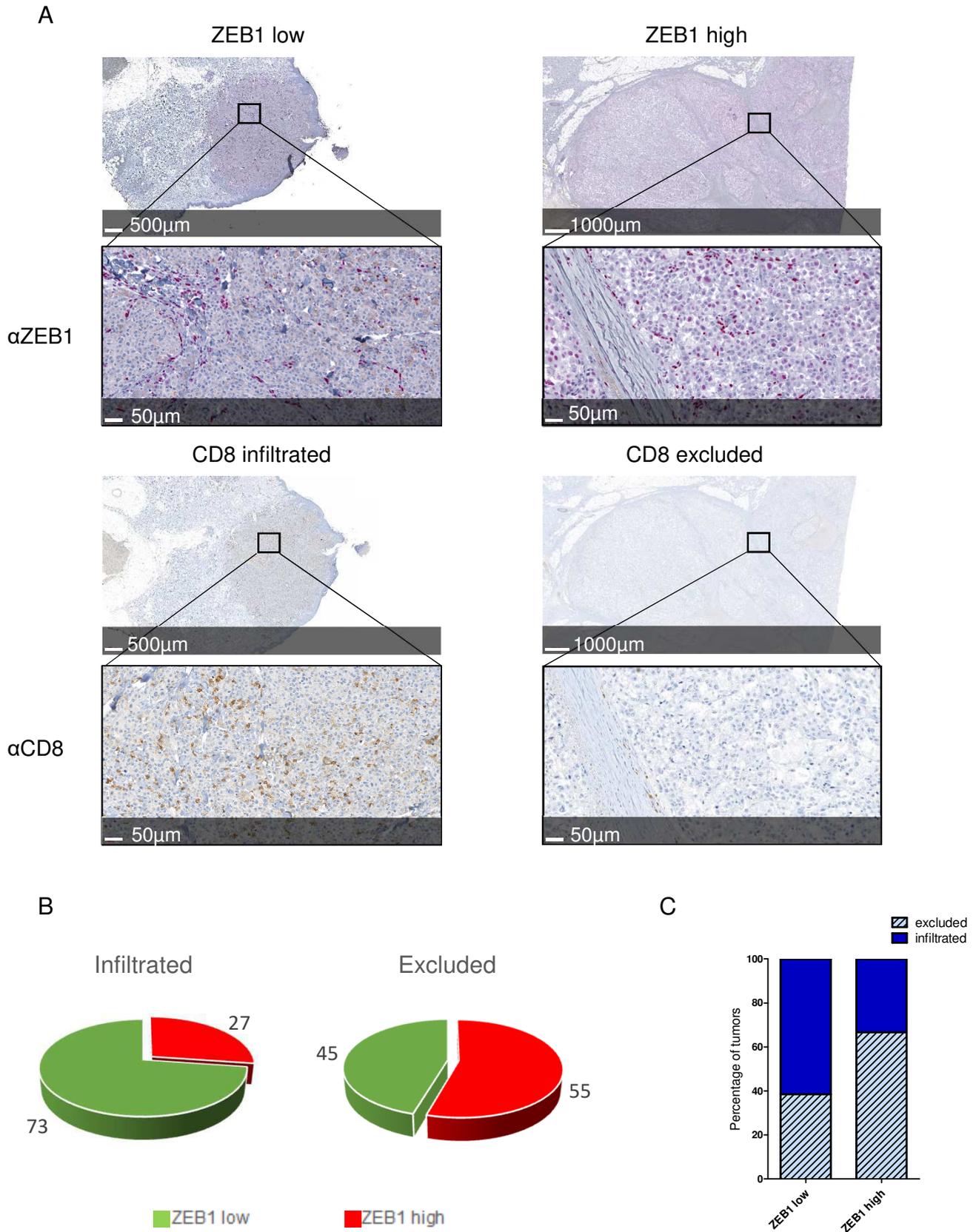
C



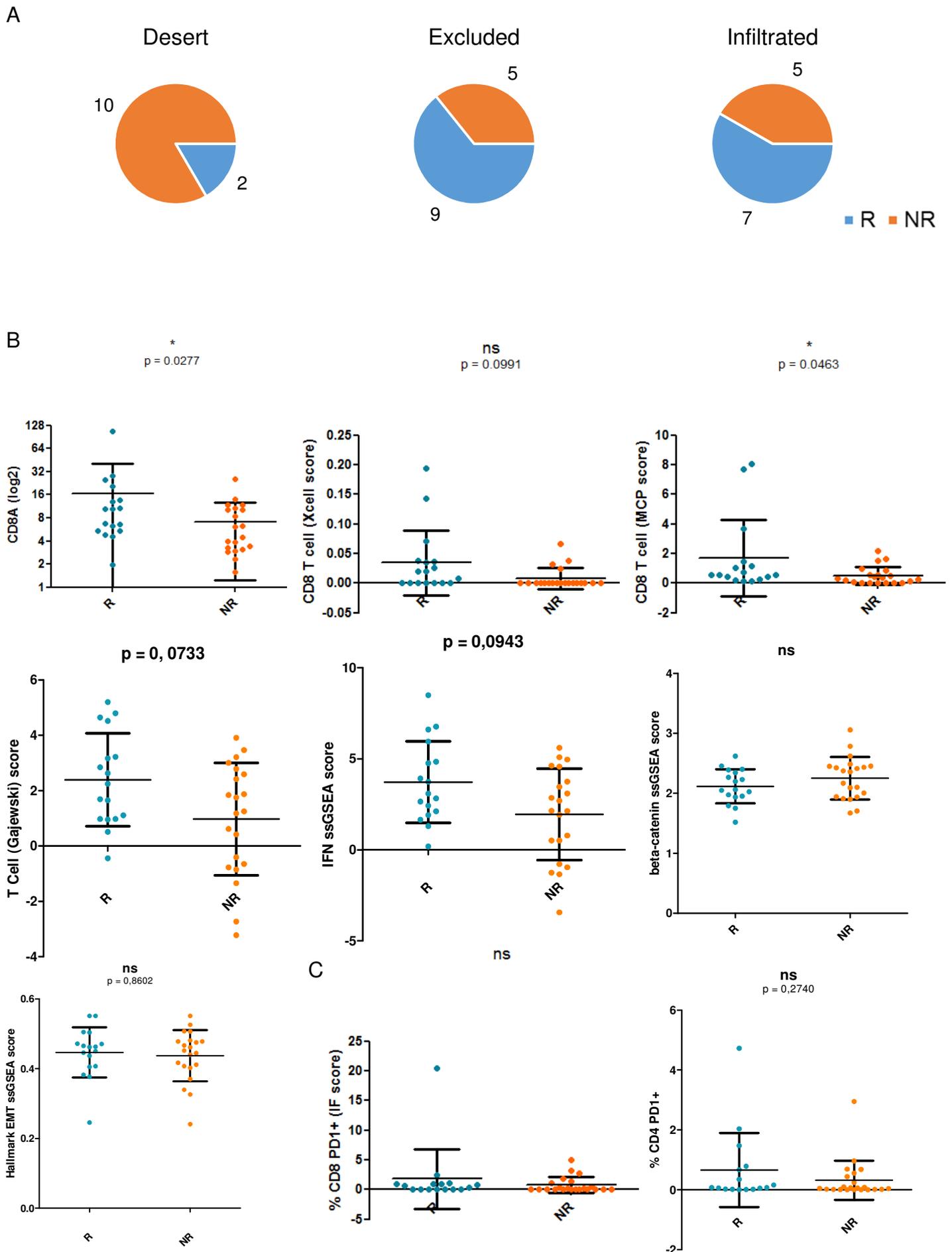
D



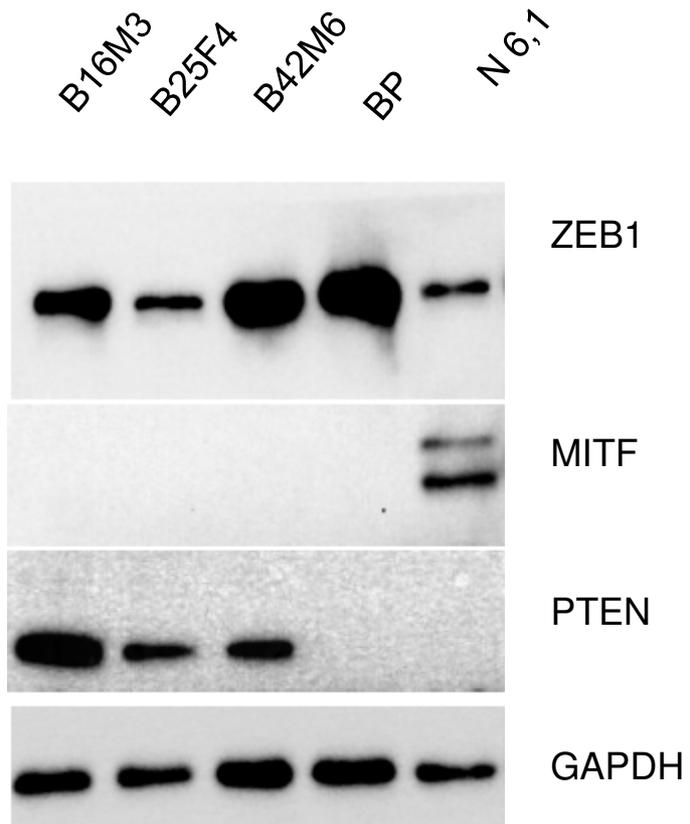
Supp Fig 5



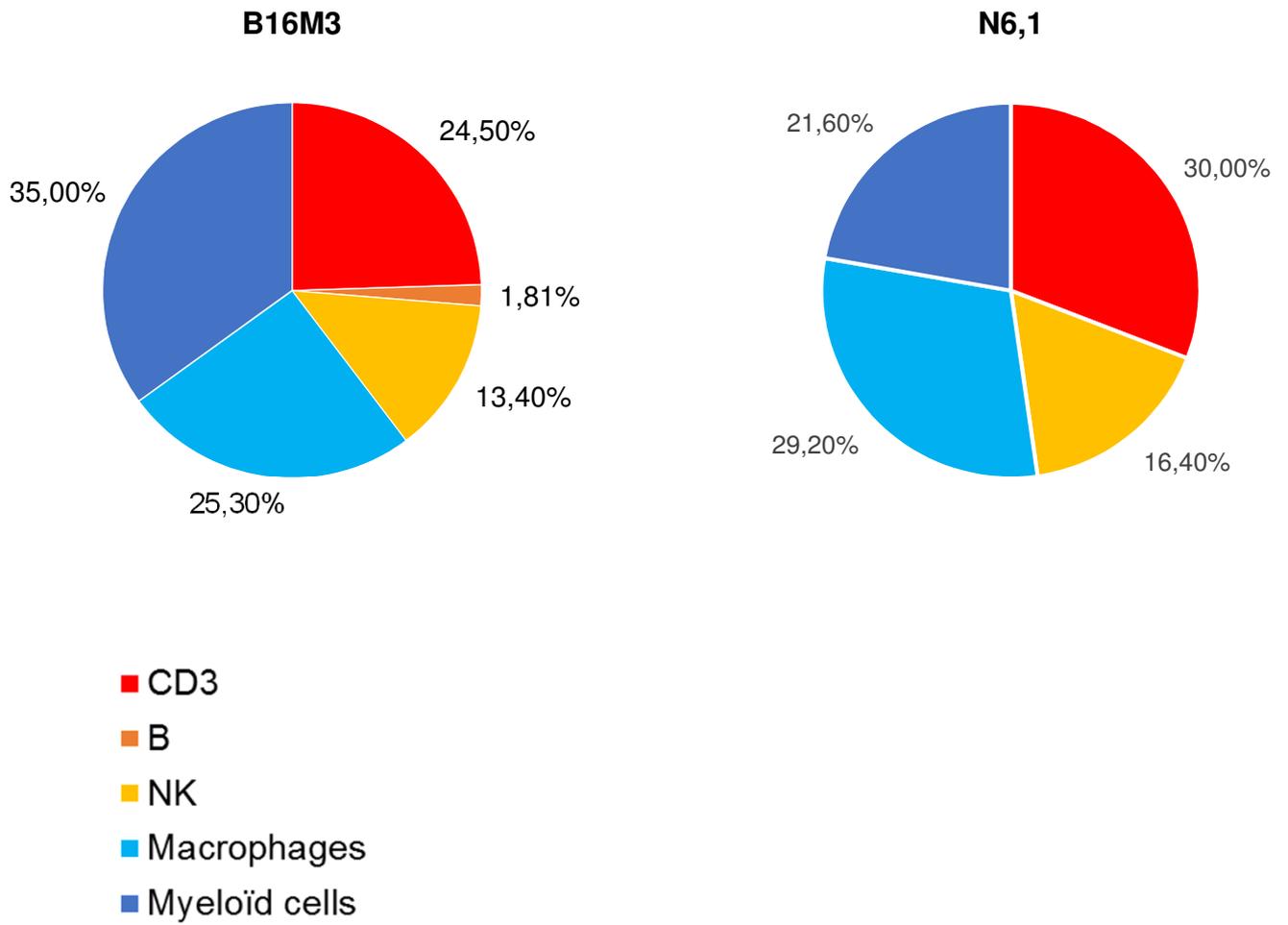
Supp Fig 6



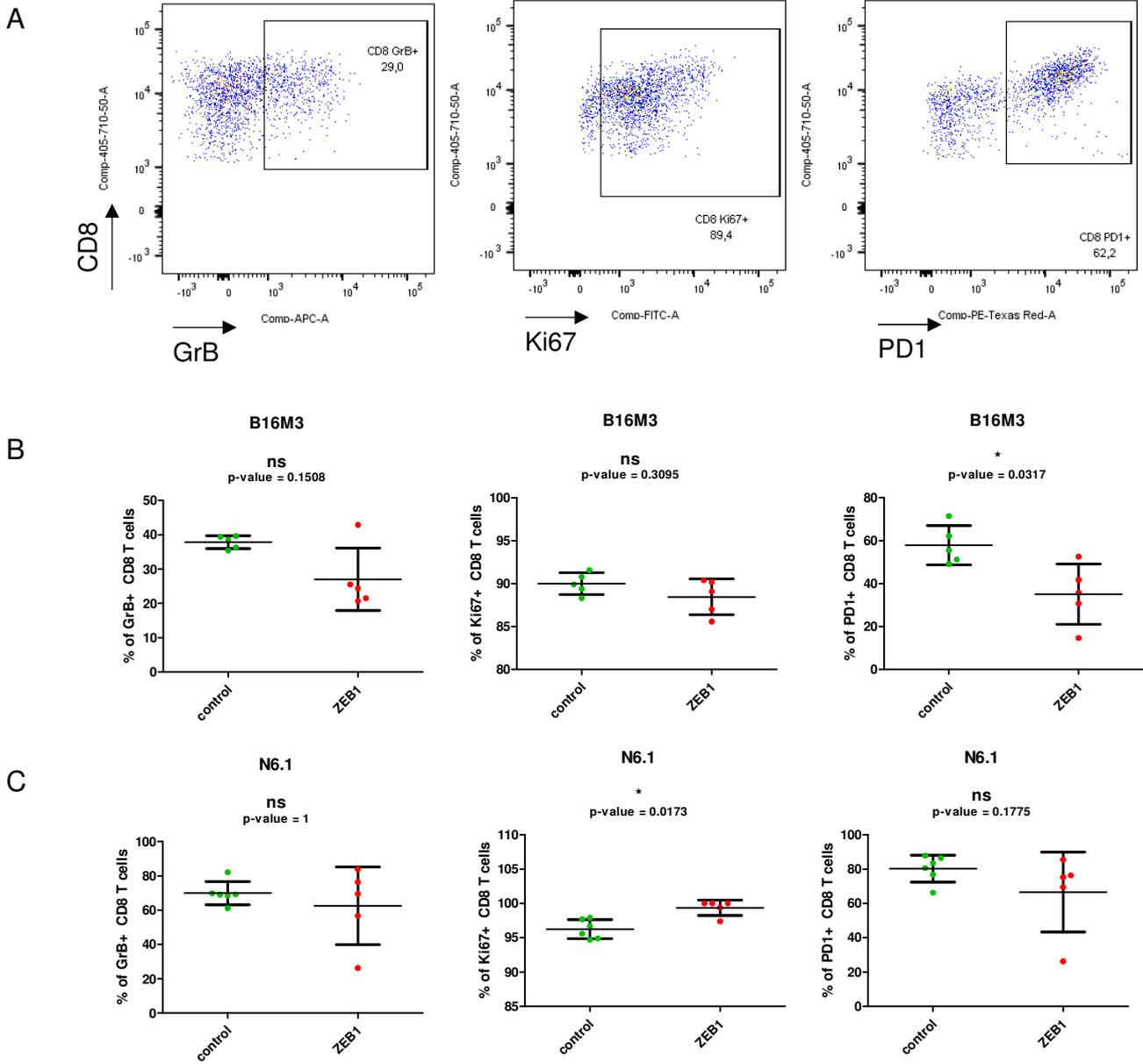
Supp Fig 7



Supp Fig 8

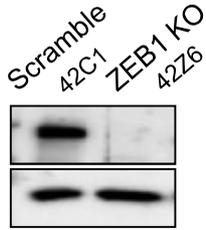


Supp Fig 9

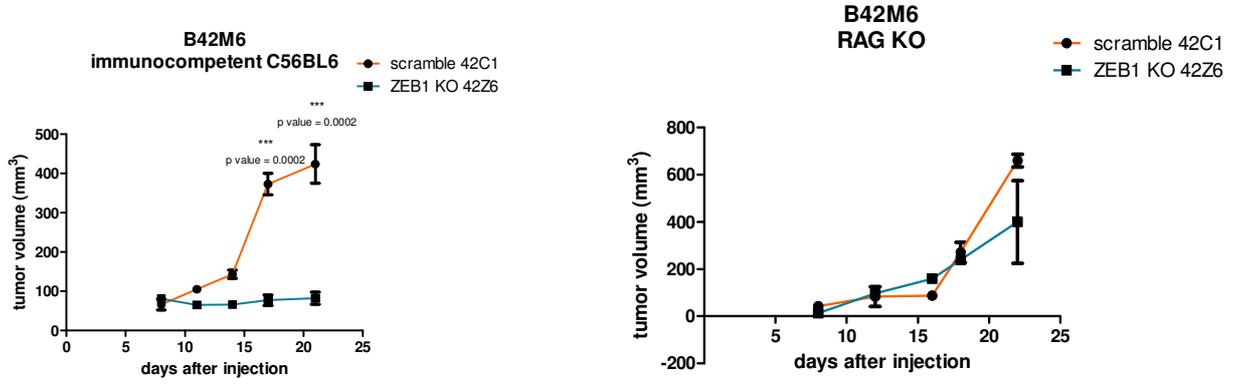


Supp Fig 10

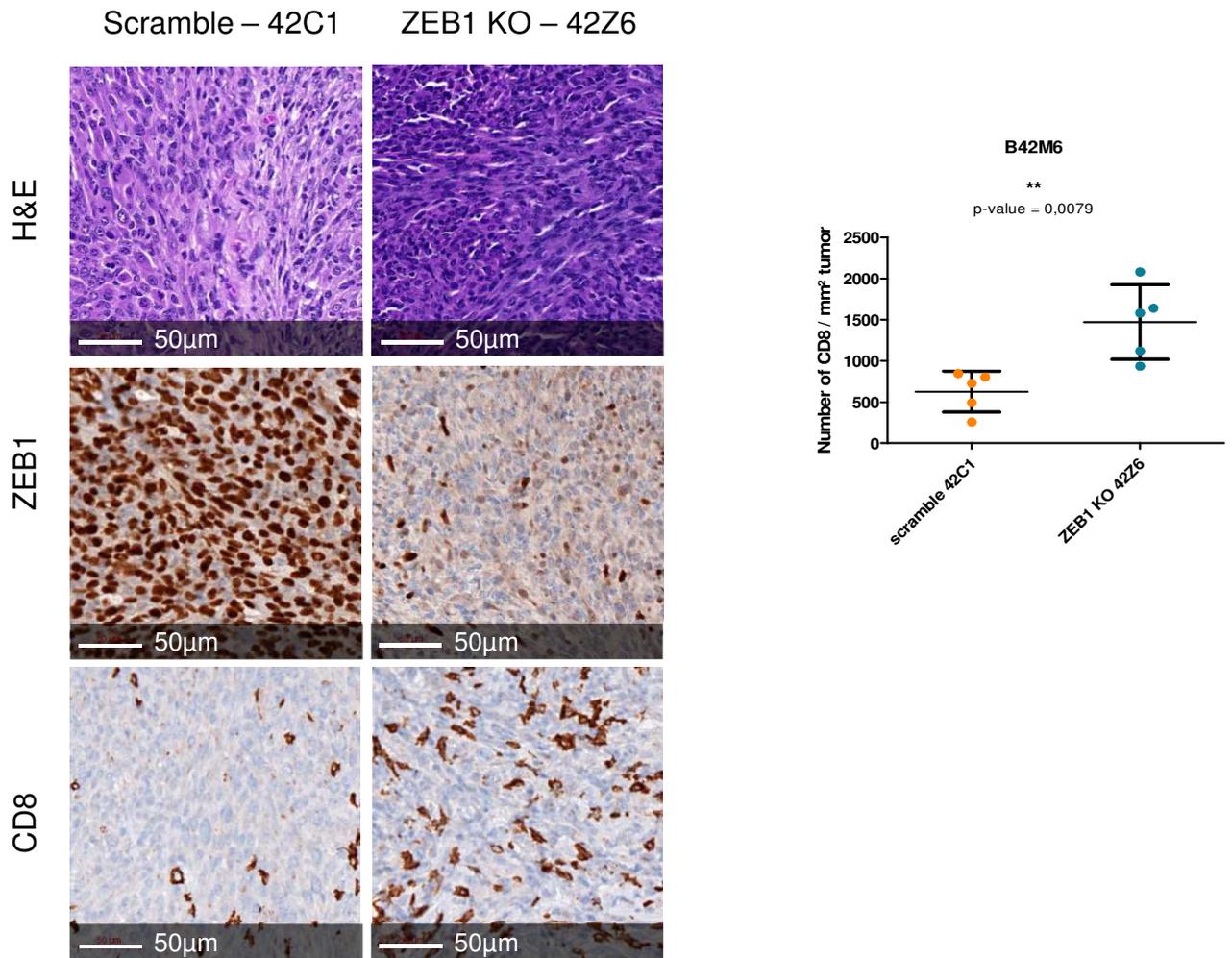
A



B



C



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ARTICLE 2

Au final, mes travaux de thèse mettent en avant le rôle majeur de l'expression oncogénique du facteur de transcription ZEB1 par les cellules de mélanome dans le défaut d'infiltration des mélanomes par les lymphocytes T CD8, à la fois chez l'homme et dans différents modèles murins. Nos travaux démontrent le rôle déterminant de ZEB1 dans l'échappement au système immunitaire des mélanomes. Grâce au développement d'analyses *in situ* des biopsies de mélanome, nous avons pu surmonter le problème d'hétérogénéité intra-tumorale de l'expression de ZEB1. Nous avons été capables d'exclure de manière précise l'expression de ZEB1 par les cellules du microenvironnement, incluant les CAF, les cellules endothéliales mais aussi les cellules immunes qui viennent biaiser de manière significative les analyses de RNA-Seq à l'échelle de la tumeur entière. Notre stratégie de combiner les analyses *in situ* avec les analyses de RNA-Seq nous a permis d'analyser de façon fiable les interactions entre les cellules de mélanome et les cellules immunes.

Des études dans différents modèles syngéniques murins ont démontré que l'expression oncogénique de ZEB1 module le microenvironnement immunitaire en prévenant l'accumulation des T CD8 au cœur de la tumeur, favorisant ainsi la croissance tumorale. A l'inverse, l'inactivation de ZEB1 permet de restaurer l'infiltrat T CD8 et le contrôle de la croissance tumorale.

L'étude des mécanismes sous-jacents a révélé que le rôle principal de ZEB1 consiste à prévenir le recrutement des T CD8 plutôt que l'activation précoce des lymphocytes T CD8 dans le ganglion. De plus, l'état d'activation des T CD8 basé sur l'expression du point de contrôle du système immunitaire PD-1 et du marqueur de prolifération Ki67, n'est pas modifié de manière significative en fonction des niveaux d'expression de ZEB1, chez l'homme.

En revanche, nous avons démontré un défaut de sécrétion de CXCL10, chémokine attractrice des lymphocytes T CD8 par les cellules de mélanome exprimant fortement ZEB1. Au contraire, l'inactivation de ZEB1 *in vitro* permet de restaurer la production de CXCL10, suggérant une régulation de la production de CXCL10 par ZEB1 dans les cellules de mélanome.

L'article 2 est en cours de finalisation avant d'être soumis très prochainement. Cependant, avant soumission, nous voudrions étoffer la partie mécanistique relative à la production de CXCL10 par les cellules de mélanome. Nous avons pu réaliser le MSD uniquement dans un modèle de surexpression ectopique de ZEB1. Nous aurions souhaité confirmer le résultat dans au moins un modèle KO. Cependant, nous devons pallier à certaines difficultés techniques quant à la taille des tumeurs KO pour ZEB1. Aussi, nous avons fait le choix de regarder la production de CXCL10 *in vitro* par ELISA. Les résultats obtenus (n=2) sont à confirmer. Afin de déterminer si la régulation de CXCL10 par ZEB1 se fait au niveau transcriptionnel, je souhaite également quantifier l'expression de CXCL10 par qPCR.

Par ailleurs, l'équipe a déjà mis en place l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) de ZEB1 humain, le développement de la ChIP chez la souris devrait se faire également et nous pourrions ainsi déterminer si ZEB1 se fixe directement sur le promoteur de CXCL10 afin de bloquer sa transcription.

Enfin, je souhaite réaliser des tests de migration afin de démontrer le rôle de l'expression de ZEB1 dans la prévention de l'attraction des T CD8. Pour cela, j'utiliserai comme attractant les surnageants des lignées murines KO pour ZEB1 et scramble, cultivées en faible pourcentage de SVF durant 3 jours. Des splénocytes seront ensemencés sur le puits, et après 2 heures de migration, nous évaluerons si l'on observe un enrichissement significatif de CD8 ayant migré dans les puits contenant les surnageants ZEB1 KO par rapport aux surnageants contrôle scramble. Enfin, j'essayerai de bloquer la migration des T CD8 induites par les surnageants ZEB1 KO en exposant les splénocytes à un anti-CXCR3, récepteur de CXCL10, et pourrai ainsi déterminer si la migration préférentielle des T CD8 induites par les surnageants KO est bien dépendante de la signalisation CXCL10-CXCR3.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Malgré les progrès majeurs récents dans le traitement des mélanomes, l'identification des mécanismes de résistance et d'échappement au système immunitaire demeure primordiale. Le ciblage de ce ou ces mécanismes permettrait en effet de restaurer la réponse aux thérapies, ciblées et/ou immunothérapies. L'article 1 a mis en évidence le rôle majeur de ZEB1 dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF et a démontré l'intérêt de cibler ZEB1 pour re-sensibiliser les cellules de mélanomes aux thérapies ciblées. L'article 2 quant à lui a démontré pour la première fois le rôle spécifique de l'expression de ZEB1 dans le remodelage du microenvironnement des mélanomes et l'échappement au système immunitaire. Ainsi, nos travaux complètent le champ des connaissances actuel relatif aux mécanismes intrinsèques aux cellules de mélanome d'exclusion des lymphocytes T CD8. Aussi, dans une première partie, je souhaiterais discuter de l'indépendance de ZEB1 vis à vis des mécanismes actuellement décrits.

L'étude des mécanismes en aval de l'activation oncogénique de ZEB1 a permis de démontrer que ZEB1 empêche principalement le recrutement des T CD8. Nous avons démontré un défaut de production de la chémokine attractrice des T CD8 CXCL10 par les mélanomes aux forts niveaux d'expression de ZEB1, suggérant le rôle intrinsèque de ZEB1 dans la régulation du sécrétome des mélanomes et la modulation du microenvironnement immunitaire qui s'ensuit. Mais les effets observés sont-ils réellement uniquement dus aux fonctions pléiotropes du facteur de transcription ZEB1 ou sont-ils la conséquence du processus de plasticité phénotypique dans son ensemble ? Je souhaite discuter ces hypothèses dans une deuxième partie.

De plus, si l'activation oncogénique de ZEB1 peut être l'événement déclencheur d'un remodelage du microenvironnement immunitaire, il n'est pas exclu que d'autres populations immunes ou stromales soient également impliquées dans l'attraction et/ou l'exclusion des lymphocytes T CD8. Ces hypothèses seront abordées dans une troisième partie.

Nous avons montré que les mélanomes aux forts niveaux de ZEB1 présentent essentiellement un défaut de recrutement des lymphocytes T CD8. L'état d'activation des T CD8 (défini d'après l'expression de PD-1) ne semble pas impacté par l'expression tumorale de ZEB1, ni chez la souris ni dans les cohortes de patients. Des résultats *in vitro* dans des lignées de mélanome humaines obtenus au cours de ma thèse, suggèrent cependant que ZEB1 pourrait également réguler la présentation antigénique et l'expression des points de contrôle du système immunitaire tel que PD-L1. Ces deux mécanismes supplémentaires d'échappement au système immunitaire

par les mélanomes aux forts niveaux d'expression de ZEB1 seront détaillés dans une quatrième partie

Enfin, nos résultats suggèrent l'intérêt de cibler ZEB1 afin de sensibiliser les mélanomes aux thérapies ciblées, favoriser le recrutement intra-tumoral des lymphocytes T CD8 et sensibiliser *in fine* les mélanomes aux immunothérapies. Dans une cinquième et dernière partie, je tiens donc à discuter si oui et comment ZEB1 peut être envisagé comme cible thérapeutique.

1. L'activation de ZEB1, un nouveau mécanisme d'exclusion des T CD8 intrinsèque aux cellules de mélanome

Jusqu'à présent, deux principaux mécanismes d'exclusion des lymphocytes T CD8 du cœur des mélanomes avaient été décrits, à savoir l'activation oncogénique de la voie β -caténine et la perte de fonction de PTEN, retrouvés dans respectivement 20% et 17% des mélanomes faiblement infiltrés par les T CD8 (Figure 61) (174; 113). Avec l'expression oncogénique de ZEB1, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme d'exclusion présent dans environ 25% des mélanomes et 40% des mélanomes présentant une exclusion claire des T CD8 (Figure 61). Si l'activation de la voie β -caténine et la perte de fonction de PTEN peuvent co-exister, ce sont en général 2 événements exclusifs. Qu'en est-il pour ZEB1 ? Des données préliminaires suggèrent l'indépendance de l'activation de la voie β -caténine et de l'expression oncogénique de ZEB1. En effet, dans notre cohorte de patients, les tumeurs au fort niveau d'expression de ZEB1 n'ont pas un score β -caténine plus élevé (défini en GSSEA) que les mélanomes exprimant faiblement ZEB1. 2 tumeurs au fort niveau d'expression de ZEB1 et présentant une exclusion des T CD8 (sur un total de 36, soit 5.5%) présentent également un fort score β -caténine. Il n'est donc pas exclu que les deux mécanismes puissent co-exister voire synergiser. Si l'analyse des niveaux d'expression de ZEB1 a été réalisée de manière spécifique dans les cellules tumorales par immunofluorescence, en revanche, le score β -caténine a été calculé à l'échelle de la tumeur entière, à partir de données transcriptomiques. Il n'est donc pas possible de savoir si l'expression de ZEB1 et l'activation de β -caténine sont deux événements apparaissant dans la ou les mêmes cellules de mélanome. Afin de déterminer la co-existence ou l'indépendance des deux mécanismes à l'échelle de la cellule, il serait intéressant de co-marquer ZEB1, β -caténine et SOX10 par immunofluorescence, sur quelques patients ZEB1 fort, incluant les 2 patients ZEB1 fort / β -caténine activés. De la même

manière, il serait intéressant d'analyser l'expression de ZEB1 et l'activation de la voie β -caténine dans des données de RNASeq de mélanome à l'échelle de la cellule unique. Pour cela, de nombreux sets de données sont à notre disposition à savoir l'analyse en cellule unique de la lignée 501Mel (34), l'analyse en cellule unique de PDX (37) mais aussi des analyses à partir de biopsies de mélanome (293; 72).

Concernant la perte de fonction de PTEN, il est difficile d'estimer à partir des données de RNA-Seq et du niveau d'expression de PTEN si PTEN est réellement perdu. Là encore, l'immunofluorescence multiparamétrique SOX10, ZEB1, PTEN semble être la meilleure méthode permettant d'adresser la question. Cependant, les résultats obtenus dans différents modèles murins (B16M3, B25F4 et B42M6 exprimant PTEN et N6.1 PTEN KO) suggèrent que l'exclusion des lymphocytes T CD8 médiées par ZEB1 pourrait être indépendante de la perte de PTEN.

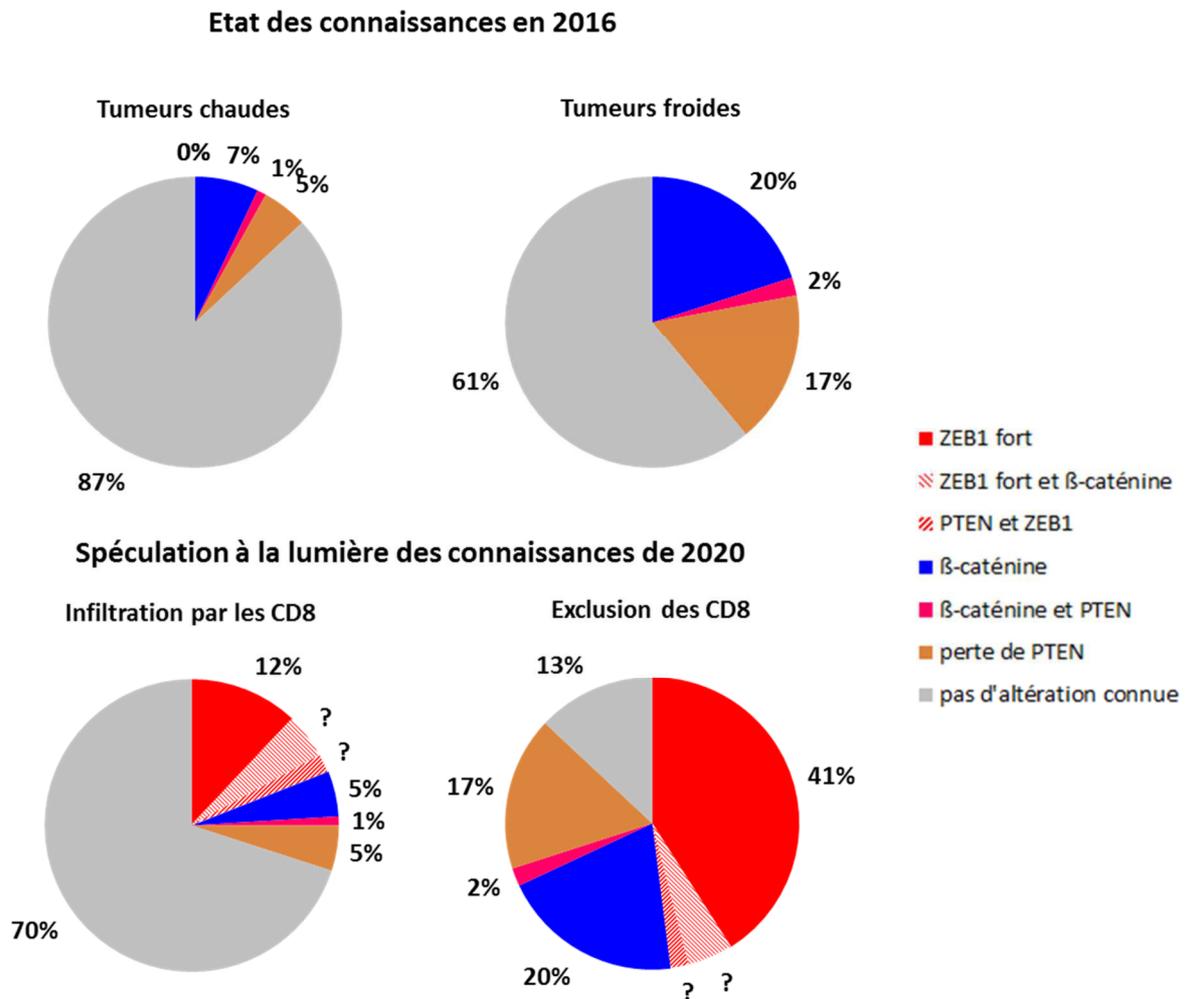


Figure 61 Mécanismes intrinsèques à la cellule tumorale d'exclusion des T CD8 connus avant (en haut) et après (en bas) la réalisation de ma thèse. Fréquences des altérations génétiques des voies β -caténine, PTEN et de l'activation oncogénique de ZEB1 entre les tumeurs chaudes et tumeurs froides ou bien les tumeurs infiltrées en

CD8 et les exclues. Les camemberts du haut sont la représentation réalisée par Peng et al. à partir de mélanomes du TCGA sous-divisés sur les mutations activatrices de la voie β -caténine ou perte de fonction des régulateurs négatifs de la voie (APC, APC2, axin1, axin2) en bleu ; les délétions de PTEN en rouge ; les mutations pertes de fonction de PTEN en marron. Les tumeurs dont les deux voies sont affectées sont représentées en violet et celles dont aucune des deux altérations n'est reportées sont en gris (174). En bas, extrapolation des données de Peng et al. avec l'apport de nos résultats (Article 2), en supposant l'activation oncogénique de ZEB1 (en rouge) étant majoritairement indépendante des autres mécanismes. Les mécanismes chevauchants ZEB1/PTEN et ZEB1/ β -caténine sont représentés en rouge hachuré. Leur pourcentage, supposé faible est à ce jour spéculatif et nécessite d'être étudié plus en détail.

2. Mécanismes d'action de ZEB1 : dépendance et indépendance vis-à-vis de MITF et de la plasticité phénotypique

En tant que facteur de transcription, ZEB1 a des fonctions pléiotropes qui lui sont propres et indépendantes du processus d'EMT et de plasticité cellulaire (294). Dans l'article 1, nos résultats suggèrent que l'impact de ZEB1 sur la résistance aux thérapies ciblées passe avant tout par l'acquisition d'un phénotype invasif, en lien avec de faibles niveaux de MITF, et associé avec l'acquisition de marqueurs des cellules souches de la crête neurale, tels que NGFR. Dans l'article 2, nous montrons que le défaut de recrutement des lymphocytes T CD8 passerait par un défaut de production intrinsèque de chémokines, telles que CXCL10, dans les tumeurs fortes en ZEB1. En tant que facteur de transcription, il est tout à fait possible que ZEB1 se fixe sur le promoteur de certains facteurs sécrétés, comme il l'a déjà été démontré dans un modèle de carcinome mammaire par CHIP Seq (282). Ainsi, ZEB1 pourrait directement réguler l'expression de CXCL10. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (déjà validées dans des cellules humaines) sont en cours de mise au point dans les cellules murines afin de valider cet effet direct. L'effet de ZEB1 sur le recrutement des T CD8 est observé chez la souris à la fois dans des modèles MITF fort et MITF faible, suggérant que l'effet de ZEB1 soit en partie indépendant de MITF et du changement phénotypique. Cependant, nous ne pouvons pas exclure un effet indirect médié par la régulation négative de MITF par ZEB1. En effet, dans les cellules de mélanome murin B16F10, l'inactivation de MITF entraîne une diminution de l'expression de CXCL10 (Wiedemann et al., 2019).

Cependant, dans la cohorte de patients, nous n'avons pas adressé la question à savoir si le défaut de recrutement des T CD8 observé dans les mélanomes aux forts niveaux d'expression de ZEB1 est dû à la plasticité phénotypique des mélanomes ou à la seule expression de ZEB1. Il serait donc intéressant de détailler le phénotype des mélanomes humains faiblement infiltrés par les T CD8 en étudiant le statut de MITF et NGFR. Nous avons en effet déjà mis en évidence par IHC

(article 1) la corrélation inverse entre l'expression de ZEB1 et de MITF dans une cohorte de mélanomes, mais une co-existence de ZEB1 et MITF peut être observée dans un état intermédiaire, nécessitant d'analyser l'hétérogénéité intra-tumorale avec plus de précision. Pour cela, le développement de panels d'immunofluorescence permettant une meilleure caractérisation du phénotype des cellules de mélanome est en cours de développement dans l'équipe. De plus, le développement d'analyse par immunofluorescence multiparamétrique ouvre la possibilité d'analyse de l'hétérogénéité intra tumorale, qui est le reflet d'une plasticité exacerbée des cellules de mélanome.

Le phénotype ZEB1 faible / MITF fort étant décrit comme prolifératif en comparaison au phénotype ZEB1 fort / MITF faible qui est plutôt invasif, il serait intéressant de regarder le statut prolifératif des cellules de mélanome. Notre panel d'immunofluorescence 7 couleurs (SOX10, ZEB1, CD8, CD4, Ki67, PD1) comprenant SOX10, ZEB1 et Ki67, il est possible de déterminer si les cellules de mélanome (SOX10+) sont plus ou moins prolifératives (Ki67+) en fonction du niveau d'expression de ZEB1. Nous analyserons ainsi si les mélanomes faiblement infiltrés et présentant de forts niveaux d'expression de ZEB1 présentent une proportion importante de cellules de mélanome non prolifératives.

Comme je l'ai évoqué plus haut, il n'est pas impossible que l'effet de ZEB1 passe par la régulation de MITF. Cependant, la modulation de MITF est délicate, puisque les approches de sur-expression ou de perte de fonction peuvent engendrer les mêmes conséquences sur la cellule à savoir un impact sur la prolifération, un arrêt du cycle par excès de différenciation ou bien une entrée en sénescence. Wiedemann et al. ont récemment proposé l'implémentation d'approches gain/perte de fonction *in vitro* et *in vivo* de *Mitf* afin d'étudier l'impact de MITF sur l'attraction de cellules immunes via la capacité des cellules de mélanome à sécréter un ensemble de chémokines. *In vitro*, l'invalidation de *Mitf* diminue la production de CXCL10 alors que l'expression ectopique aboutit à une production augmentée de CXCL10. En revanche, *in vivo*, les deux approches aboutissent toutes deux à une croissance tumorale accélérée après injection dans des souris immunocompétentes associée à la réduction de l'infiltrat immunitaire global et lymphocytaire (295).

En revanche, alors que chez l'homme, ZEB1 et ZEB2/MITF varient en miroir (confère article 1), la modulation d'expression de *Zeb1* dans nos modèles murins n'induit pas ou peu de variation d'expression de ZEB2/MITF. Ainsi, l'implémentation d'approches gain/perte de fonction de *Zeb2*

in vivo dans des modèles de greffes syngéniques chez des souris immunocompétentes permettraient de déterminer si la modulation d'expression de *Zeb2* permet elle aussi de moduler la composition de l'infiltrat immunitaire, et notamment de contrôler l'infiltrat T CD8 ou si cette propriété est propre au facteur de transcription ZEB1.

Cette approche gain/perte de fonction *in vivo* (mais aussi *in vitro*) permet d'identifier le rôle d'un EMT-TF aisément. Cependant, un des principaux défauts de cette approche est qu'elle force l'homogénéité tumorale. Or, nous savons que l'hétérogénéité intra tumorale des mélanomes est particulièrement importante. Il serait donc également intéressant d'injecter dans des souris C57BL6 immunocompétentes différents clones *Zeb1* KO, scramble ou d'expression ectopique de *Zeb1*, dans différentes proportions, afin d'étudier le rôle de l'hétérogénéité tumorale, reflet de la plasticité des mélanomes. Cette approche a déjà été réalisée dans un modèle de carcinome mammaire d'expression forcée de *Snail2* et a montré une corrélation linéaire entre les proportions de clones épithéliaux (*Snail2* faible) et mésenchymateux (*Snail2* fort) initialement injectés et le taux d'infiltration par les lymphocytes T CD8 suggérant un impact plus fort de la proportion de cellules mésenchymateuses sur l'infiltrat T CD8 par rapport à l'impact de l'hétérogénéité intra-tumorale (269). Nous pourrions également voir quelle proportion minimale de cellules au fort niveau d'expression de *Zeb1* est nécessaire à l'exclusion des lymphocytes T CD8 au cœur de la tumeur. L'analyse des tumeurs ainsi formées par IHC ou immunofluorescence permettrait aussi d'évaluer le développement de chaque sous-population composant la tumeur. Un clone particulier prendra-t-il le dessus ? Chaque population se développera-t-elle sous forme de clone ou bien la tumeur sera-t-elle un mélange homogène de chacune des cellules ? En cas de développement clonal, retrouverons-nous un gradient d'infiltrat T CD8 en fonction du niveau d'expression de ZEB1 dans le clone ? Au-delà de la question relative à l'infiltrat immunitaire, ce type d'approche ouvrirait également la possibilité d'étudier la plasticité phénotypique au sein d'un modèle tumoral d'hétérogénéité contrôlable.

3. Implication d'autres populations immunitaires ou stromales dans l'échappement au système immunitaire des mélanomes forts en ZEB1

Mes travaux de thèse se sont principalement focalisés sur le rôle de l'expression oncogénique de ZEB1 sur le défaut de recrutement des lymphocytes T CD8, du fait des observations robustes obtenues dans 2 cohortes de mélanomes (80 mélanomes au total). Cependant, il n'est pas exclu que d'autres populations immunitaires ou stromales soient associées au phénotype des tumeurs froides et participent à l'échappement des mélanomes au système immunitaire.

3.1. Les Treg

Nous avons notamment démontré que l'expression ectopique de ZEB1 induit une baisse significative du ratio CD8/Treg infiltrants la tumeur (article 2). Ceci est cohérent avec une production augmentée du TGF- β par les tumeurs de mélanome exprimant fortement ZEB1 (article 2) et plus généralement par les cellules tumorales en EMT (275; 296; 297). Il serait intéressant de vérifier si *in vitro* les cellules de mélanome ont la capacité intrinsèque de produire du TGF- β et dans quelles proportions. Toutefois, dans le contexte tumoral, la différenciation accrue de T CD4 en Treg induite par le TGF- β favoriserait un microenvironnement immunosuppresseur pro-tumoral. A leur tour, les Treg peuvent induire la dédifférenciation des cellules tumorales. Bien que nous nous centrons sur l'impact des cellules tumorales sur le microenvironnement immunitaire, il est intéressant de souligner les interactions réciproques entre les Treg et la tumeur. Dans notre modèle d'expression ectopique de *Zeb1* dans la lignée B16M3, l'étude de l'infiltrat immunitaire 14, 17 et 21 jours après injection révèle que la proportion de Treg parmi les T CD4 n'est significativement augmentée qu'à partir de 17 jours après injection. Aussi, l'infiltration par les Treg serait postérieure au défaut de recrutement des T CD8, ne permettant donc pas d'expliquer un défaut de recrutement précoce des T CD8. L'induction d'un microenvironnement riche en Treg par les cellules tumorales serait donc un mécanisme additionnel d'échappement au système immunitaire. Il reste néanmoins très intéressant de poursuivre l'étude de l'infiltrat Treg dans nos modèles murins mais surtout chez l'homme étant donné le rôle majeur des Treg dans la résistance aux anti-PD-1. En effet, le ratio CD8/Treg est communément associé à la sensibilité aux anti-PD-1. Une étude récente décrit la balance d'expression de PD-1 entre les T CD8 et les Treg comme marqueur prédictif de réponse aux immunothérapies anti-PD-1. En effet, le blocage de

PD-1 restaure à la fois l'activité des T CD8 PD-1+ en état de dysfonctionnement mais aussi l'activité immunosuppressive des Treg PD-1+. De plus, la réactivation des T CD8 plutôt que des Treg est nécessaire à la régression de la tumeur (298).

3.2. Les macrophages

Enfin, il n'est pas impossible qu'une autre population immune de type cellule dendritique ou macrophage coopère avec les cellules de mélanomes afin de prévenir l'infiltration par les T CD8. En lien avec cette hypothèse, l'étude pan-cancers (incluant les mélanomes) de Denarda Dangaj et al. démontre le rôle majeur de la chémokine CCL5 dans le recrutement des lymphocytes T cytotoxiques. La source de CCL5 serait intrinsèque aux cellules tumorales. Toutefois, l'étude souligne l'importance des cellules myéloïdes qui permettent d'amplifier l'infiltration des lymphocytes T cytotoxiques en produisant la chémokine CXCL9 (115). Les travaux de Stefani Spranger sont également un bon exemple de coopération entre les cellules de mélanome et les cellules dendritiques dans le recrutement des lymphocytes T cytotoxiques. Dans ce cas, les mélanomes présentant une activation de la voie β -caténine produisent des quantités réduites de CCL4, induisant un faible recrutement de cellules dendritiques Batf3 nécessaires à l'activation des T CD8 dans le ganglion (113).

Dans notre modèle d'expression ectopique de *Zeb1* B16M3, l'analyse comparative du sécrétome des tumeurs surexprimant *Zeb1* comparativement aux tumeurs contrôle ne révèle pas seulement une différence significative de production de CXCL10 mais également un enrichissement de CCL3 et CCL4 dans le surnageant des tumeurs contrôles par rapport aux tumeurs *Zeb1* (article 2). Également connu sous le nom de protéines inflammatoires des macrophages (MIP-1 α et MIP-1 β), les ligands de CCR5 CCL3 et CCL4 permettent l'attraction de toute population immune exprimant CCR5, pouvant inclure les lymphocytes T mais aussi les Treg, MDSCs et macrophages (confère Introduction ; Chapitre 2 Parties 3.3.A. et 3.3.C.). De même, CCL2 attracteur des macrophages CCR2+ est également exprimé plus fortement dans le sécrétome des tumeurs contrôle par rapport aux tumeurs sur-exprimant *Zeb1*.

J'ai donc développé un panel de cytométrie en flux permettant de quantifier et caractériser l'infiltrat macrophage. Des études préliminaires ont révélé des différences intrinsèques à nos modèles d'études à savoir B16M3, B25F4, B42M6 et N6.1. Dans certains

modèles de modulation d'expression de *Zeb1*, la proportion de macrophage varie alors qu'elle ne varie pas dans d'autres. Cependant, étant donné la plasticité des cellules de macrophages pouvant adopter un phénotype M1 anti-tumoral ou un phénotype M2 pro-tumoral, j'ai souhaité ajouté à la caractérisation des macrophages un marqueur plutôt M1 (IA-IE) et un marqueur plutôt M2 (CD206) même si ces marqueurs restent débattus. Des données dans des modèles de carcinomes ont montré que le phénotype EMT (via l'expression de *Snail* notamment) modifiait la composition du microenvironnement immunitaire, avec une modification de la balance macrophages M1/M2 (Dongre et al).

L'ajout de marqueurs supplémentaires sera peut-être nécessaire afin de mieux définir les différentes populations de macrophages comme récemment proposé par l'équipe de Toby Lawrence dans un modèle murin Tyr(CreER, BrafCA, Ptenf/f). Ainsi, ils différencient les monocytes dérivés de la moelle osseuse (MN, CD169- F4/80-, Ly6Chigh, CMH II-), des macrophages associés à la tumeur, immatures (iTAM, F4/80- CD169+ Ly6C high, CMH II high) et des macrophages associés à la tumeur, matures (mTAM, F4/80+ CD169+ Ly6C-). De manière intéressante, l'analyse transcriptomique de chacune de ces populations a mis en évidence des clusters bien distincts de gènes de l'inflammation surexprimés par les MN (CXCL10, IL-1 β , IRF5, CCR2, IL18) et par les iTAM (CXCL9, IRF7) et perdus par les mTAM. Ainsi, dans ce modèle, le statut de différenciation des macrophages est crucial regardant les conséquences sur l'inflammation et l'attraction des T CD8 (299). Il serait donc intéressant de voir si dans nos modèles, les macrophages ne coopéreraient pas avec l'activation oncogénique de ZEB1 pour prévenir l'infiltration par les lymphocytes T CD8, via notamment la production renforcée de CXCL10 par les MN.

L'hypothèse qu'une sous-population de macrophages puisse coopérer avec les cellules de mélanome exprimant faiblement ZEB1 pour amplifier le signal CXCL10 attracteur des lymphocytes T CD8 est renforcée par l'analyse RNA Seq de biopsies de mélanome à l'échelle de la cellule unique accessible publiquement. J'ai en effet (sous l'encadrement de Roxane Pommier et Janice Kielbassa de la plateforme de bio-informatique Gilles Thomas du Centre Léon Bérard) ré-analysé les données de RNA-Seq à l'échelle de la cellule unique initiées par Tirosh et al., composées de 16 mélanomes puis élargie deux ans plus tard avec l'ajout de 17 échantillons supplémentaires, (72; 35). Notamment, l'analyse de l'expression de CXCL10, CXCL9 et IL8 met en évidence une expression préférentielle de CXCL10 par les macrophages, aussi bien en nombre (proportion de non-zéros, Figure 62A) qu'en niveaux d'expression (Transcript Per Million, TPM, Figure 62B).

Toutefois, les niveaux d'expression quantifiés en TPM de CXCL10 révèlent que CXCL10 peut être également exprimé à de forts niveaux par les cellules de mélanome (Figure 62B). Il n'est donc pas exclu que les cellules tumorales puissent enclencher le mécanisme de recrutement des lymphocytes T CD8 en produisant de faibles quantités de CXCL10, amplifiées par la suite par une autre population immunitaire telle que les macrophages. Enfin, l'étude de Jerby Arnon et al. ne distingue que le sous-type myéloïde de macrophage, ce qui laisse à penser que ce sous-type inclut en fait l'ensemble des populations myéloïdes comprenant les cellules dendritiques. Pour aller plus loin sur cette étude, il serait donc intéressant de caractériser les cellules dites macrophages productrices de CXCL10.

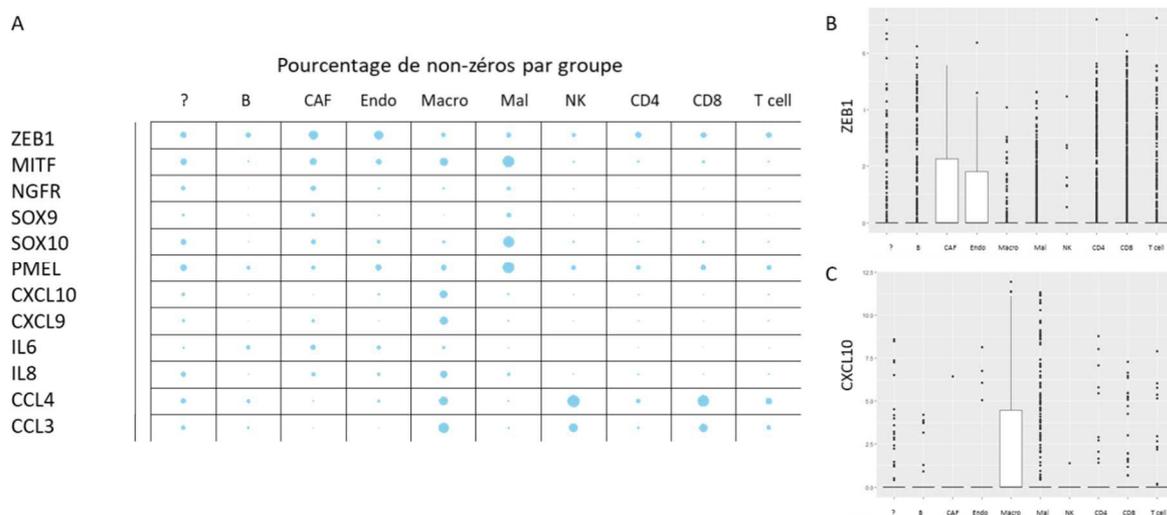


Figure 62 Analyses des données de RNA-Seq à l'échelle de la cellule unique (72). A) Pourcentage de non-zéros des gènes d'intérêt dans le mélanome (ZEB1, MITF, NGFR, SOX9, SOX10 et PMEL), des chémokines attractrices des T CD8 (CXCL9, CXCL10, CCL3 et CCL4) et des interleukines connues pour être cible directe de ZEB1 (IL6 et IL8) dans les différents types cellulaires (non attribué : ?; lymphocytes B; fibroblastes associés à la tumeur : CAF; cellules endothéliales : Endo; Macrophages : Macro; Cellules de mélanome : Mal; Cellules NK; lymphocytes T CD4; Lymphocytes T CD8 et lymphocytes T). La grosseur du cercle bleu est proportionnelle au pourcentage d'expression du gène d'intérêt dans le type cellulaire. B) et C) Niveaux d'expression en Transcript per Million (TPM) respectivement de ZEB1 (B, en haut) et CXCL10 (C, en bas) par type cellulaire.

3.3. Mise en évidence d'autres populations

Les perspectives décrites ci-dessus relatives aux Treg et macrophages permettront de mieux identifier le rôle de ces populations au potentiel immunosuppresseur et leurs interactions/coopération avec les cellules de mélanome exprimant plus ou moins ZEB1. Toutefois, ces perspectives sont très orientées sur ces deux populations candidates. Afin d'étudier un éventuel lien entre l'expression oncogénique de ZEB1 et la composition de l'infiltrat immunitaire sans a priori concernant les populations immunes, nous pouvons tirer profit de l'analyse combinée par immunofluorescence multiparamétrique et RNA-Seq présentée dans l'article 2.

Grâce à l'analyse des niveaux d'expression de ZEB1 par les cellules tumorales SOX10+, nous avons en effet pu classer de manière rigoureuse les mélanomes en deux catégories, suivant leur niveau d'expression de ZEB1. D'autre part, l'analyse transcriptomique à partir des mêmes biopsies permet d'estimer les proportions d'infiltration par différentes populations immunes, en utilisant les algorithmes de déconvolution MCP Counter, XCell et QuantiSeq (collaboration avec la plateforme de bioinformatique Gilles Thomas, Laurie Tonon). Malheureusement, dans cette cohorte, aucune association significative entre une population immune (autre que CD8) et les niveaux d'expression de ZEB1 n'a pu être mise en évidence ainsi (Figure 63). Cependant, étant donné le rôle majeur de la localisation de chaque type cellulaire, des analyses complémentaires par immunofluorescence restent primordiales.

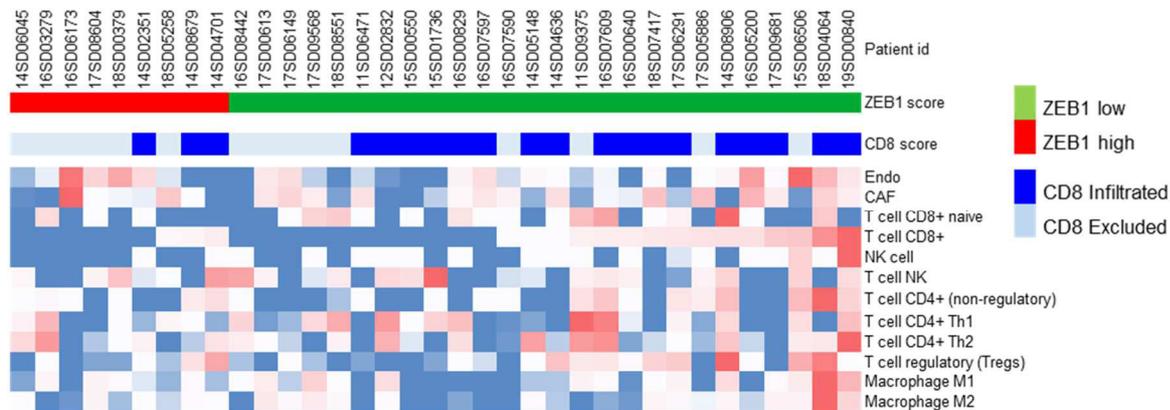


Figure 63 Analyse combinée d'immunofluorescence et de RNA-Seq à partir d'une cohorte de 35 mélanomes cutanés. Les barres rouges et vertes représentent le niveau d'expression de ZEB1 (respectivement fort et faible) par les cellules de mélanome SOX10+, déterminé par IF. Les barres bleues claires et foncées marquent les mélanomes respectivement exclus d'un infiltrat T CD8 et riches en T CD8, tel que déterminé par IF. Enfin, la heatmap représente les scores de différentes populations composant la tumeur calculés à partir de données transcriptomiques et de l'algorithme de déconvolution XCell. De haut en bas : cellules endothéliales, CAF, T CD8 naïf, T CD8, NK, NKT, T CD4 non Treg, TH1, TH2, Treg, macrophages M1 et macrophages M2.

En collaboration avec l'équipe de Christophe Caux, de nouveaux panels multi-IF 8 couleurs sont en cours de développement afin de réaliser l'analyse spatiale et quantitative des macrophages, Treg, NK, neutrophiles, cellules dendritiques et TLS à partir de biopsies de patients. Nous avons montré à travers notre première analyse concernant l'infiltrat T (article 2) que nous sommes en capacité de développer ce genre d'analyse. Ainsi, nous pourrions identifier si l'infiltration des mélanomes par une ou plusieurs population(s) immune(s) corrèle avec l'expression oncogénique de ZEB1. Dans ce cas, il sera intéressant d'étudier plus en détail une

potentielle coopération entre les cellules de mélanome au fort niveau d'expression de ZEB1 et la/les population(s) immune(s) alors identifiées.

Une étude en cours de finalisation concerne la quantification des structures lymphoïdes tertiaires (TLS). Les TLS sont des structures similaires aux organes lymphoïdes secondaires présentes sur le site tumoral. Elles se composent d'une zone riche en cellules T et cellules dendritiques matures. A côté, un follicule B présente des caractéristiques de centre germinatif et est entouré de plasmocytes. La formation des TLS résulte de néogenèse lymphoïde induite par une exposition prolongée à des signaux inflammatoires. Les TLS permettent notamment la génération et la régulation des défenses anti-tumorales. Rares au cœur de la tumeur, les TLS sont souvent retrouvés à la marge d'invasion ou dans le stroma périphérique, ce qui rend leur visualisation difficile sur biopsies de tumeur (300). La présence de TLS dans le microenvironnement tumoral est un marqueur de bon pronostic dans de nombreux cancers incluant les mélanomes, favorisant une réponse anti-tumorale durable. Deux études récentes ont proposé la présence de TLS au sein de tumeurs en cours de traitement comme marqueur prédictif de réponse aux immunothérapies par anti-PD1 dans le mélanome, établissant une signature prédictive de réponse à partir de gènes associés aux TLS (301; 302). Aussi, l'analyse quantitative et spatiale des TLS à partir des mêmes biopsies de patients que publiées dans l'article 2 révélera si la présence de TLS avant traitement peut-être un marqueur de réponse aux anti-PD-1. De plus, une éventuelle corrélation inverse avec les niveaux d'expression de ZEB1 par les cellules de mélanome SOX10+ sera étudiée.

Enfin, j'ai également essayé d'établir un lien entre l'expression de ZEB1 par les cellules de mélanome et un type d'infiltrat immunitaire en ré-analysant les données de RNA-Seq établies à l'échelle de la cellule unique par Jerby-Arnon et al. Cependant, les données disponibles n'étaient malheureusement pas adaptées afin de répondre à cet objectif. En effet, plus d'un tiers des échantillons sont issus de métastases ganglionnaires, ce qui représente un biais majeur dans l'étude de l'infiltrat tumoral. De plus, le nombre de cellules séquencées par patient est très variable, et la répartition par type cellulaire est très hétérogène. Certains patients n'ont pas ou peu de cellules tumorales (confère Introduction ; Chapitre 1 ; Partie 3.6.). Aussi, la cohorte n'est pas adaptée pour déterminer si les mélanomes aux forts niveaux d'expression de ZEB1 sont associés à un type d'infiltrat immunitaire caractéristique. Pour que l'objectif soit réalisable, il faudrait un plus grand nombre de cellules séquencées par patient. La quantité de cellules

séquencées pour chaque patient devrait idéalement être homogène d'un patient à l'autre et représentative de la tumeur dans sa globalité.

4. Autres mécanismes d'échappement au système immunitaire médiés par ZEB1

L'induction de l'EMT ou la réexpression des EMT-TFs a été associée dans des modèles de carcinomes à des dérégulations de la présentation antigénique (expression du CMH-I, antigènes) ou de l'expression des ligands des points de contrôle du système immunitaire. J'ai donc analysé l'impact de ZEB1 sur ces deux mécanismes dans nos modèles de mélanome.

4.1. Présentation antigénique

Les cellules tumorales peuvent empêcher la reconnaissance par le système immunitaire en modulant la présentation des antigènes et ainsi échapper à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques. L'expression du CMH-I est souvent diminuée dans les cellules mésenchymateuses. Nous avons investigué si ZEB1 avait un impact sur la présentation antigénique dans nos modèles de mélanome. Tout d'abord, dans un panel de lignées de mélanome humaines, l'expression des molécules du CMH-I n'est pas corrélée aux niveaux d'expression de ZEB1 et la modulation d'expression de ZEB1 par expression ectopique ou knock-out n'induit pas de modification notable de l'expression du CMH-I.

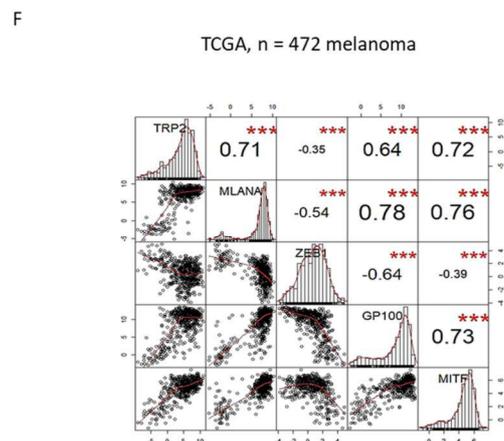
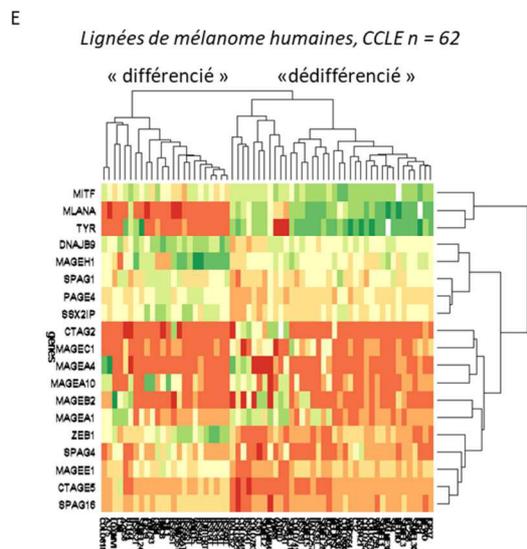
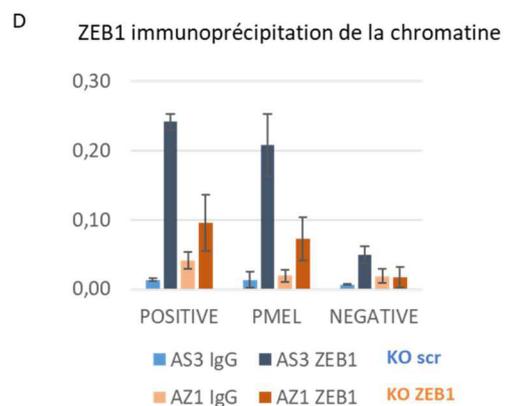
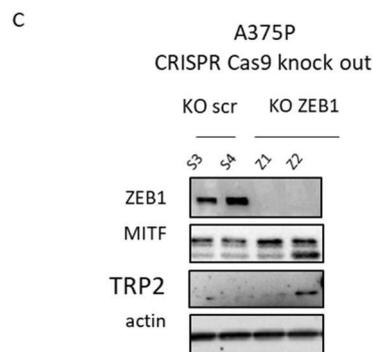
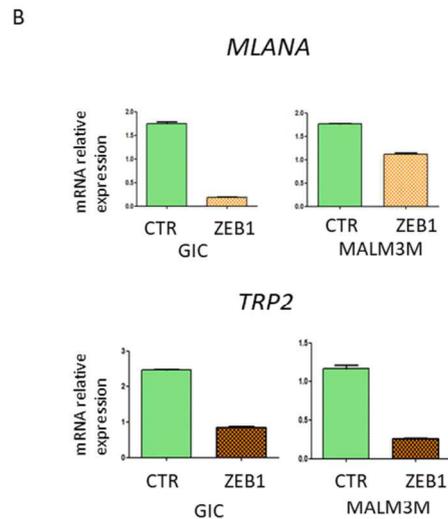
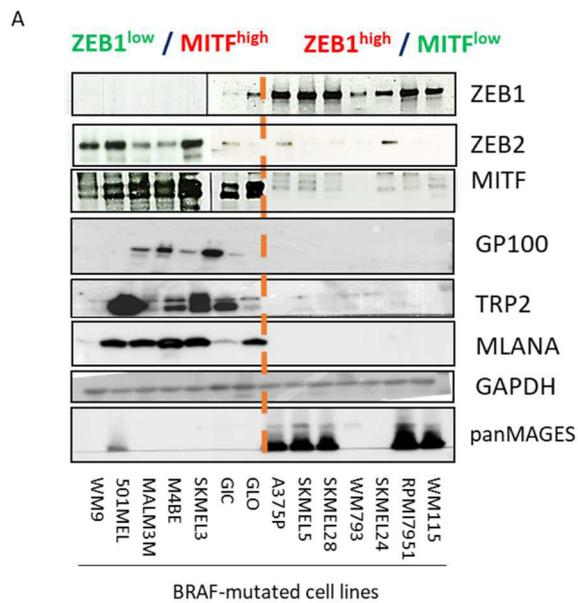
Dans ce même panel de lignées de mélanome humaines, ZEB1 semble avoir un impact sur la régulation des antigènes. En accord avec la capacité de ZEB1 à réguler négativement l'expression de MITF et de ses gènes cibles (qui comprennent la plupart des antigènes de différenciation mélanocytaire), les lignées aux faibles niveaux d'expression de ZEB1 (MITF fortes) expriment de forts niveaux des antigènes de différenciation mélanocytaire MLANA, GP100 et TRP2, tandis que celles aux forts niveaux de ZEB1 (MITF faibles) n'expriment que de faibles niveaux de ces antigènes de différenciation. Cette corrélation inverse entre l'expression de ZEB1 et les antigènes de différenciation est retrouvée dans les mélanomes du TCGA comme montré par l'analyse des données de RNAseq en tumeur entière (Figure 64F). L'expression ectopique de ZEB1 dans deux lignées de mélanome ZEB1 faibles, MALM3M et GIC (lignée dérivée de patient à court terme), induit une diminution de l'expression ARN de *MLANA* et *TRP2* (Figure 64B). A l'inverse, l'inactivation de *ZEB1* par Knock-out dans les A375P exprimant fortement ZEB1 permet

l'expression de TRP2 dans un des clones KO S4 (Figure 64C). Enfin, une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps anti-ZEB1 dans le modèle A375P scramble S3 et KO Z1 montre la fixation de ZEB1 sur le promoteur de l'antigène de différenciation PMEL (aussi connu sous le nom de GP100), démontrant un contrôle direct de l'expression de l'antigène de différenciation PMEL par ZEB1 (Figure 64D), potentiellement indépendamment de MITF.

Si les lignées de mélanomes aux forts niveaux d'expression de ZEB1 perdent l'expression des antigènes de différenciation mélanocytaire, et pourraient donc potentiellement échapper à la lyse par les lymphocytes T spécifiques de ces antigènes, elles expriment tout de même les antigènes associés au mélanome, les MAGEs (Figure 64A, E) et pourraient donc toujours être reconnues par les lymphocytes T spécifiques des MAGEs.

Cependant, dans nos modèles murins syngéniques, la modulation de *Zeb1* dans les cellules de mélanome (Knock-out et expression ectopique), n'est pas associée à une modification de l'expression des molécules du CMH-I ni un changement dans l'expression des antigènes tumoraux. Les lignées BrafV600E proviennent de tumeurs qui ont la particularité d'être non pigmentées et très peu différenciées, et aux niveaux d'expression de *Mitf* et des antigènes de différenciation très faibles, ce qui rend difficile leur analyse. Mais, nous avons également réalisé l'approche gain de fonction de *Zeb1* dans un modèle *Nras* muté, très pigmenté et aux forts niveaux d'expression de *Mitf* et des antigènes de différenciation. L'expression ectopique de *Zeb1* n'a pas montré de modification de l'expression des antigènes de mélanome dans ce modèle pigmenté, suggérant que ZEB1 ne régule pas la présentation antigénique dans ces modèles murins.

Figure 64 Présentation antigénique A) Western Blot ZEB1, ZEB2, MITF, GP100, TRP2, MLANA et panMAGES dans les lignées de mélanomes ZEB1 faible (à gauche) et ZEB1 forte (à droite). Le trait en pointillé sépare les lignées de mélanome en deux groupes en fonction de leurs niveaux d'expression de ZEB1, ZEB2 et MITF. L'anti-corrélation entre l'expression de ZEB1 et celle de ZEB2 et MITF a été montrée dans l'article 1. Gène de ménage : GAPDH. B) Niveaux d'expression ARN relatifs de MLANA (en haut) et TRP2 (en bas) dans les lignées de mélanome GIC et MALM3 après expression ectopique de ZEB1. C) Western Blot ZEB1, MITF et TRP2 dans le modèle A375P Knock-Out pour ZEB1. S3 et S4 sont deux clones scramble exprimant ZEB1 et Z1 et Z2 sont deux clones KO pour ZEB1. Gène de ménage : actine. D) Immunoprécipitation de la chromatine ciblant ZEB1 dans la lignée AZ1 KO pour ZEB1 et le scramble AS3 montrant un enrichissement de la fixation de ZEB1 sur le promoteur de PMEL et du contrôle positif (spécifique au kit) mais pas sur le contrôle négatif (spécifique du kit). E) Hierarchisation non supervisée des 62 lignées de mélanome du CCLE en deux groupe « différenciée » et « non-différenciée » à partir des données d'expression ARN des antigènes de différenciation et des antigènes associés au mélanome ainsi que ZEB1 et MITF. F) Corrélations inverse entre l'expression de ZEB1 et les antigènes de différenciation mélanocytaire à partir de données de patients issues du TCGA. Sur la diagonale : distribution de chaque gène ; en dessous : dots plots deux à deux ; au-dessus : coefficients de corrélation deux à deux.



Pour aller plus loin, nous pourrions exploiter une banque de prélèvements de patients comprenant les cellules tumorales d'une part et les cellules immunes d'autre part dont nous disposons au laboratoire. Au cours de ma thèse, j'ai en effet pu participer à la génération d'une

banque d'échantillons établie à partir de métastases dites liquides, soit d'ascites soit d'épanchements pleuraux de patients atteints de mélanome. Grâce à une centrifugation en gradient de Percoll, nous avons pu isoler les cellules tumorales des cellules immunes. Les cellules tumorales sont en partie congelées directement et l'autre partie est utilisée afin d'établir une lignée cellulaire à court terme. Les cellules immunes sont directement congelées. Il serait alors intéressant de caractériser les lignées établies afin de valider la corrélation inverse entre l'expression de ZEB1 et celle des antigènes de différenciation. Des approches gain/perte de fonction de ZEB1 permettraient d'étudier l'impact sur le CMH-dans ces lignées dérivées de patient à court terme. Enfin, comme nous disposons des cellules immunes correspondantes à chaque lignée cellulaire, des tests d'activation des lymphocytes T avant/après modulation d'expression de ZEB1 permettraient de déterminer si l'expression antigénique dépendante de ZEB1 impacte la reconnaissance et l'activité des lymphocytes T.

4.2. Régulation de l'expression des ligands des points de contrôle du système immunitaire

Nous avons montré que les mélanomes aux forts niveaux de ZEB1 présentent essentiellement un défaut de recrutement des lymphocytes T CD8. L'état d'activation des T CD8 (défini d'après l'expression de PD-1) ne semble pas impacté de manière claire par l'expression tumorale de ZEB1 dans les cohortes de patients. Une tendance d'expression amoindrie de PD-1 par les T CD8 infiltrant les tumeurs sur-exprimant ZEB1 est toutefois observée. Il serait premièrement intéressant de vérifier l'expression d'autres point de contrôle du système immunitaire (TIM3, LAG3, TIGIT,...) avant de conclure sur l'absence de lien entre l'expression oncogénique de ZEB1 et l'état potentiel d'exhaustion des T CD8. De manière remarquable, Dongre et al. avaient observé un effet de l'expression oncogénique de *Snail2* sur l'état d'exhaustion des T CD8, révélés par les marqueurs PD-1 et CTLA-4 dans un modèle de carcinome mammaire murin (269). De plus, si l'expression oncogénique de ZEB1 n'a pas d'effet sur l'expression des points de contrôle du système immunitaire, il n'est pas exclu qu'elle puisse avoir un impact sur l'expression de leur(s) ligand(s). Des résultats in vitro dans des lignées de mélanome humaines obtenus au cours de ma thèse, suggèrent en effet que ZEB1 pourrait l'expression des points de contrôle du système immunitaire tel que PD-L1

Un deuxième niveau d'échappement au système immunitaire passe par l'expression, par les cellules tumorales, des ligands des points de contrôle du système immunitaire. Dans le carcinome pulmonaire non à petites cellules, le rôle de la boucle de rétrocontrôle ZEB1/miR200 a été clairement démontré (278). Nous nous sommes donc intéressés à la régulation potentielle de PD-L1 et autres ligands des points de contrôle du système immunitaire par ZEB1 dans le mélanome. Les niveaux d'expression de ZEB1 sont corrélés aux niveaux d'expression de certains ligands des points de contrôle du système immunitaire incluant PD-L1, que ce soit aux niveaux ARN et protéiques, avec mise en évidence de l'expression de PD-L1 à la membrane plasmique par cytométrie en flux (Figure 65 A et B). L'expression ectopique de ZEB1 dans trois lignées de mélanome comprenant les A375P de l'ATCC et deux lignées dérivées de patients GIC et GLO induit une augmentation de l'expression de PD-L1 au moins au niveau de l'ARN (Figure 65 C). De manière surprenante, la modulation effective de PD-L1 à la membrane plasmique par surexpression de ZEB1 n'a pu être visualisée que dans une lignée dérivée de patient (Figure 65 D). A ce stade, nous avons formulé plusieurs hypothèses. Il est possible que les cellules en culture soient figées dans un état où la modulation d'expression de PD-L1 ne soit pas permise par la seule modulation de l'expression de ZEB1. L'expression de PD-L1 à la membrane plasmique pourrait également nécessiter un ou plusieurs signaux supplémentaires, tels que l'IFN γ . Une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine fixée à ZEB1 révèle la fixation de ZEB1 sur le promoteur de PD-L1, démontrant la régulation directe de la transcription de PD-L1 par ZEB1 (Figure 65 E). Enfin, une analyse préliminaire par immunofluorescence de PD-L1 et ZEB1 sur une cohorte de 29 biopsies de mélanome révèle une expression plus forte de PD-L1 par les tumeurs aux forts niveaux d'expression de ZEB1 (Figure 65 F). Dans cette analyse cependant, nous n'avions pas de marqueur tumoral fiable (S100 au lieu de SOX10) permettant d'attribuer finement l'expression de ZEB1 et de PD-L1 aux cellules de mélanome et non pas au microenvironnement. Une nouvelle analyse par immunofluorescence 7 couleurs permettra d'affiner le score PD-L1 par les cellules tumorales, et de le corrélérer avec l'intensité de ZEB1.

Enfin, j'ai également vérifié le statut de Pd-l1 dans les modèles murins établis avec modulation d'expression de *Zeb1*. Cependant, aucune variation claire de l'expression de Pd-l1 n'a pu être associée à la variation d'expression de *Zeb1*.

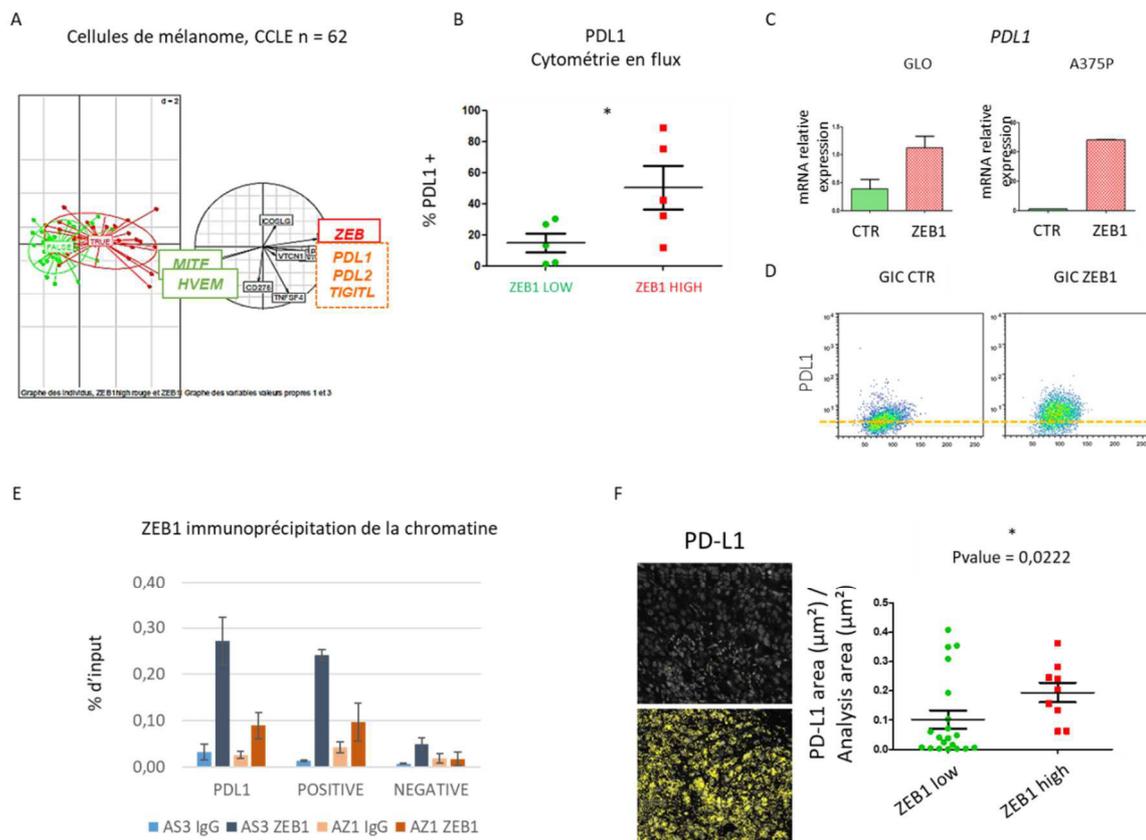


Figure 65 Régulation de l'expression de PD-L1 par ZEB1. A) Analyse en composantes principales des expressions des ligands des points de contrôle du système immunitaire et de ZEB1, MITF dans les lignées de mélanome répertoriées dans le CCLE. B) Données d'expression de PD-L1 à la membrane plasmique par cytométrie en flux dans cinq lignées de mélanome humain aux faibles niveaux d'expression de ZEB1 et cinq lignées aux forts niveaux d'expression de ZEB1. C) Expression ARN de PD-L1 dans les lignées GLO et A375P après expression ectopique de ZEB1. D) Expression protéique à la membrane plasmique de PD-L1 par cytométrie en flux dans la lignée dérivée de patient GIC après expression ectopique de ZEB1. E) Immunoprécipitation de la chromatine ciblant ZEB1 dans la lignée AZ1 KO pour ZEB1 et le scramble AS3 montrant un enrichissement de la fixation de ZEB1 sur le promoteur de PD-L1 et du contrôle positif (spécifique au kit) mais pas sur le contrôle négatif (spécifique du kit). F) Immunofluorescence PD-L1 sur une cohorte de 29 biopsies de mélanome, divisée en tumeur aux faibles niveaux d'expression de ZEB1 (en vert) et au fort niveau d'expression de ZEB1 (en rouge). P-value : test de Mann Whitney.

4.3. Crosstalk avec la voie de l'IFN-γ

L'induction du CMH-I et de PD-L1 par traitement IFN-γ semblait être impactée par les niveaux d'expression de ZEB1. J'ai donc criblée par qPCR les gènes cibles de l'IFN-γ avant et après traitement à l'IFN-γ de lignées avec expression ectopique de ZEB1 ou Knock-out afin de comparer l'activation de la voie. L'hypothèse était que de forts niveaux d'expression de ZEB1 seraient associés à une activation de la voie IFN-γ amoindrie. Cependant, si certaines tendances sont apparues, elles étaient dépendantes de chaque modèle cellulaire et je n'ai pas pu dégager une tendance claire et généralisable à l'ensemble des modèles cellulaires. Avant d'éradiquer l'hypothèse d'un potentiel contrôle de la voie de l'IFN-γ par ZEB1, il serait intéressant de vérifier

le profil mutationnel des lignées cellulaires utilisées sur les effecteurs de la voie de l'IFN-γ tels que JAK/STAT. En effet, une mutation inactivatrice d'un des effecteurs biaiserait fortement l'étude.

4.4. Une cible de ZEB1 inattendue : HVEM

Lorsque j'ai étudié la potentielle régulation des ligands des points de contrôle du système immunitaire par ZEB1, j'ai été étonnée par la force et la reproductibilité de la corrélation inverse entre les niveaux d'expression de ZEB1 et le ligand/récepteur des points de contrôle du système immunitaire HVEM dans différents sets de données composés aussi bien de lignées cellulaires de mélanome que d'échantillons de patients (Figure 66B-E). De manière remarquable, les lignées de mélanome sont les lignées cancéreuses aux plus forts niveaux d'expression d'HVEM et à la plus grande disparité d'expression entre les lignées répertoriées dans le CCLC (Figure 66A). Enfin, l'expression ectopique de ZEB1 dans la lignée dérivée de patient GIC induit une diminution d'expression d'HVEM (Figure 66F). Sur la base de ces données extrêmement reproductibles, je me suis demandé si la régulation d'HVEM par ZEB1 dans les lignées de mélanome faisait du sens et quel serait l'intérêt biologique de cette régulation.

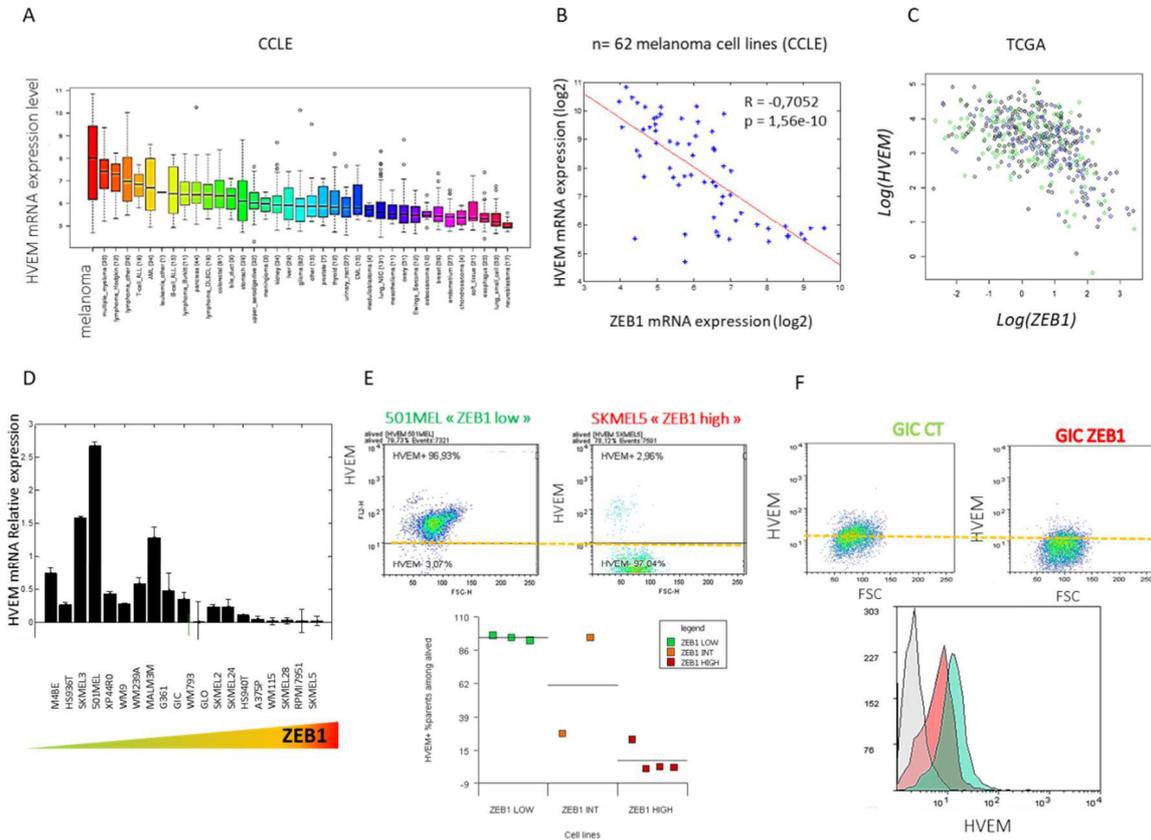


Figure 66 Corrélation inverse entre ZEB1 et HVEM. A) Niveau d'expression ARN d'HVEM dans le panel de lignées cancéreuses répertoriées dans le CCLC. En rouge en premier, les cellules de mélanome. B) Corrélation inverse entre les niveaux d'expression ARN de ZEB1 (axe des abscisses, log2) et HVEM (axe des ordonnées, log2) sur les 62 lignées de mélanomes répertoriées dans le CCLC. Corrélation de Pearson, $R = -0,7052$, $p\text{-value} = 1,56 \times 10^{-10}$. C) Corrélation inverse entre les expressions de ZEB1 (axe des abscisses, log2) et HVEM (axe des ordonnées, log2) des 472 mélanomes humains répertoriés dans le TCGA. En noir, l'ensemble des tumeurs de mélanome, $R = -0,50$. En bleu, l'ensemble des 266 mélanomes dont nous avons accès à l'information de pureté ASCAT, $R = -0,534$. En vert, les 155 mélanomes dont la pureté est supérieure à 0.6, $R = -0,47$. D) Expression ARN d'HVEM dans un panel de lignées de mélanome triées de gauche à droite par ordre croissant d'expression de ZEB1. E) Expression

protéique d’HVEM à la membrane par FACS. Exemple de profil sur les 501Mel et SKMEL5, lignée de mélanome aux niveaux d’expression de ZEB1 respectivement faible et fort. En bas, pourcentage de cellules positives pour HVEM sur un panel de lignées de mélanome triées par leur niveau d’expression de ZEB1 de gauche à droite faible (vert), intermédiaire (orange), fort (rouge). F) Expression protéique d’HVEM à la membrane par FACS dans la lignée dérivée de patient GIC après expression ectopique de ZEB1. CT : control (en vert). ZEB1 : surexpression ectopique (en rouge). Non marqué (en gris).

HVEM, aussi connu sous le nom de récepteur de la superfamille du TNF 14 (TNFRSF14), est à la fois ligand de CD160 et BTLA et récepteur de LIGHT (TNFSF14) (303). Il peut donc avoir un rôle extrinsèque en tant que ligand d’un point de contrôle du système immunitaire ou bien avoir un rôle intrinsèque via la voie de signalisation en aval du récepteur HVEM. Le profil d’expression d’HVEM par les cellules de mélanome laisse penser qu’il pourrait avoir un rôle intrinsèque dans la mélanomagenèse. Aussi, dans une première partie, je formulerai l’hypothèse du rôle de la voie LIGHT/HVEM sur l’apoptose induite par l’IFN- γ . Dans une deuxième partie, je formulerai l’hypothèse du rôle extrinsèque d’HVEM sur le contrôle de l’activation des cellules immunes.

Très peu d’études s’intéressent au rôle d’HVEM dans la tumorigenèse. Une étude datant de 1998 sur la lignée de carcinome mammaire MDA-MB-231 démontre le rôle apoptotique de LIGHT, ligand d’HVEM. L’apoptose médiée par LIGHT est amplifiée par traitement IFN- γ . Enfin, l’expression ectopique de LIGHT dans les MDA-MB-231 empêche la formation de tumeur *in vivo* (304). Je me suis alors demandée si HVEM pouvait avoir un rôle sur la survie des cellules de mélanome en formulant l’hypothèse que la perte d’HVEM par les cellules de mélanome aux forts niveaux d’expression de ZEB1 était nécessaire à leur survie en cas d’exposition à un microenvironnement inflammatoire riche en IFN- γ . Des tests préliminaires de survie cellulaire à court terme par ATP sur 2 lignées aux forts niveaux d’expression de ZEB1 et faibles niveaux d’expression d’HVEM dites ZEB1 fortes / HVEM faibles et 3 lignées ZEB1 faibles / HVEM fortes révèlent une résistance à la morte induite par exposition à la combinaison IFN- γ / LIGHT des lignées aux faibles niveaux d’expression de HVEM. A l’inverse, les lignées ZEB1 faible / HVEM fortes sont sensibles à l’apoptose induite par la combinaison LIGHT / IFN- γ . Cette étude a fait l’objet d’un stage volontaire de licence que j’ai eu la chance d’encadrer. Les résultats obtenus sont cependant très préliminaires et mériteraient d’être renforcés. Pour aller plus loin, des approches gain/perte de fonction d’HVEM seraient intéressantes afin de confirmer le rôle clé d’HVEM dans le mécanisme d’apoptose induite par l’IFN- γ .

HVEM peut agir en tant que ligand des points de contrôle du système immunitaire en se liant aux récepteurs CD160 et BTLA. De manière intéressante, HVEM envoie un signal d’activation

en se liant à CD160 mais à une activité inhibitrice via BTLA (303). Aussi, la fonction d’HVEM sur le système immunitaire est double, et son effet ne dépend pas seulement de son niveau d’expression par les cellules tumorales ou autre type cellulaire mais est fortement dépendante des récepteurs présents sur les cellules immunes. Par exemple, l’analyse des cellules immunes circulantes dans le sang de donneurs sains indique que CD160 est majoritairement exprimé par les NK alors que BTLA est principalement exprimé par les lymphocytes T (305). L’analyse de données de patient à l’échelle de la cellule unique a permis de valider que même au cœur des mélanomes, CD160 est majoritairement exprimé par les NK alors que BTLA est plus restreint aux lymphocytes T et B (Figure 67). Le rôle de la signalisation HVEM/CD160 sur l’activité des NK a été étudié *in vivo* dans un modèle murin déficient pour CD160. De manière surprenante, l’activité cytotoxique des NK n’est pas perturbée par un dysfonctionnement de la signalisation HVEM/CD160. Cependant, la production d’IFN- γ par les NK est fortement réduite en absence de CD160 ou de son ligand HVEM (306). Nous pourrions donc formuler l’hypothèse que la perte d’expression d’HVEM par les cellules de mélanomes (exprimant fortement ZEB1) permettrait de réduire l’inflammation en prévenant la production d’IFN- γ par les NK. Dans ce contexte, HVEM aurait donc un rôle anti-tumoral. Dans ce contexte, il serait intéressant de quantifier et caractériser l’infiltrat NK dans nos modèles murins de modulation de *Zeb1*.

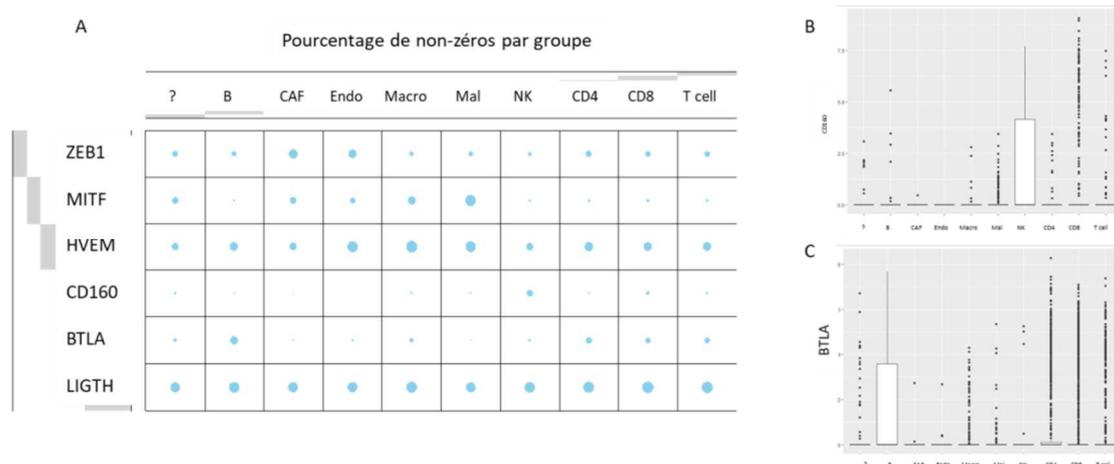


Figure 67 Analyses des données de RNA-Seq à l’échelle de la cellule unique (72). **A)** Pourcentage de non-zéros des gènes d’intérêt dans le mélanome (ZEB1, MITF) et duréseau HVEM, CD160, BTLA et LIGHT dans les différents types cellulaires (non attribué : ?; lymphocytes B ; fibroblastes associés à la tumeur : CAF ; cellules endothéliales : Endo ; Macrophages : Macro ; Cellules de mélanome : Mal ; Cellules NK ; lymphocytes T CD4 ; Lymphocytes T CD8 et lymphocytes T). La grosseur du cercle bleu est proportionnelle au pourcentage d’expression du gène d’intérêt dans le type cellulaire. **B)** et **C)** Niveaux d’expression en Transcript per Million (TPM) respectivement de CD160 (B, en haut) et BTLA (C, en bas) par type cellulaire.

Une étude récente présente cependant HVEM comme marqueur de mauvais pronostic dans le mélanome (307). Dans cette étude, HVEM est décrit comme inhibant l'activité des T CD8 en se liant à BTLA. Cependant, l'analyse des T CD8 infiltrant les tumeurs de 8 patients atteints de mélanome révèle une forte hétérogénéité d'expression de BTLA : 2 à 35 % des T CD8 expriment BTLA, avec une médiane à 11%. De plus, la co-localisation de cellules de mélanome exprimant HVEM et des lymphocytes T CD8 exprimant BTLA n'a été montrée que sur 5 patients. Aucun marqueur d'activation additionnel ne valide l'effet inhibiteur de HVEM sur les T CD8. Enfin, la valeur pronostic de HVEM est calculée indépendamment du type de thérapies (ciblées ou immunothérapies) reçu. Les résultats de cette étude devraient donc être exploités avec précaution. Il serait nécessaire de valider les données avancées sur un nombre plus important de patients. Enfin, l'implémentation d'approches gain/perte de fonction d'HVEM *in vivo* permettrait de mieux détailler les interactions entre HVEM exprimé par les cellules de mélanome et BTLA et/ou CD160 sur les lymphocytes T et/ou cellules NK. La déplétion des populations T CD8 ou NK et/ou l'utilisation d'anticorps bloquant BTLA et CD160 dans ces modèles serait la façon la plus robuste de déterminer si le mécanisme d'action majoritaire d'HVEM impacte principalement les NK ou les lymphocytes T.

5. Peut-on envisager ZEB1 comme biomarqueur de réponse aux thérapies ou cible thérapeutique?

Nous avons montré (article 1) que ZEB1 pourrait servir de biomarqueur de réponse aux thérapies ciblées. En effet, de forts niveaux d'expression de ZEB1 sont associés à la résistance innée aux inhibiteurs de la voie MAPK, que ce soit dans des lignées de mélanome ou tumeurs présentant la mutation BRAFV600. De plus, l'expression ectopique de ZEB1 est suffisante à l'acquisition de résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK, en induisant la transition réversible vers un phénotype invasif/souche MITF faible/NGFR fort. De plus, les niveaux d'expression de ZEB1 sont augmentés après acquisition de résistance, que ce soit dans les lignées cellulaires en culture ou bien à partir de biopsies de mélanome après acquisition de résistance.

Des travaux récents basés sur des modèles murins de carcinomes ou des données de RNA-Seq à l'échelle de la tumeur entière (269; 308) ont proposé que l'EMT pourrait être associée à la résistance aux immunothérapies. Comme décrit dans le chapitre 2 de l'introduction, les travaux de l'équipe de Roger Lo à partir de données transcriptomiques à l'échelle de la tumeur entière identifient l'EMT comme mécanisme de résistance innée aux immunothérapies. La signature IPRES de résistance aux anti-PD1 comprend un panel de gènes associés à l'EMT (50). Cependant, cette étude présente deux biais potentiels. Comme nous l'avons démontré dans l'article 1, la plasticité des cellules de mélanome médiée par ZEB1 est induite par l'exposition aux inhibiteurs de BRAF et est un mécanisme de résistance des mélanomes aux thérapies ciblées. Or, la cohorte utilisée par Hugo et al. est constituée d'une majorité d'échantillons issus de patients traités en première ligne par une ou plusieurs thérapies ciblées, anti-BRAF et/ou anti-MEK. La signature alors décrite comme signature de résistance innée aux immunothérapies inclue donc sans doute de nombreux mécanismes de résistance innée et/ou acquise aux thérapies ciblées. De plus, comme nous l'avons souligné dans l'article 2, les « scores EMT » obtenus par l'analyse de données transcriptomiques à l'échelle de la tumeur entière peuvent être fortement biaisés du fait de l'expression majeure des facteurs d'EMT par les cellules stromales et immunes. Il convient donc d'utiliser avec prudence cette signature IPRES, qui n'a d'ailleurs pas pu être confirmée par la suite sur d'autres cohortes incluant l'étude à l'échelle de la cellule unique de Jerby Arnon et al. (180).

De manière un peu décevante, nos travaux démontrent que l'expression de ZEB1, par les cellules tumorales avant tout traitement n'est pas associée à la réponse aux immunothérapies

dans notre cohorte de mélanomes traités en première ligne par anti-PD1. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence l'importance des modifications apparaissant quelques semaines après la mise sous traitement (recrutement de T CD8 accru, etc...). Une étude longitudinale de biopsies de mélanome collectées à différents temps après mise sous traitement anti-CTLA-4 et/ou anti-PD-1 a présenté la mise en place d'une réponse adaptative lors de la mise sous traitement comme hautement prédictive de réponse aux immunothérapies (309). De plus, les études récentes adressant la question de la réponse au traitement se placent systématiquement après mise sous traitement (173). Il serait donc intéressant d'étudier en cours de traitement par anti-PD1 si une activation de l'expression de ZEB1 sous traitement pourrait être associée à la résistance aux immunothérapies. L'expression de ZEB1 pourrait en effet être latente et réactivée précocement en réponse au traitement comme nous l'avons mis en évidence avec les thérapies ciblées, en analysant des biopsies avant/après traitement. Pour cela nous sommes en train d'analyser l'expression de ZEB1 dans quelques paires de biopsies avant/après traitement par anti-PD1. De plus, il est intéressant de noter que le mécanisme majeur d'exclusion des lymphocytes T CD8 des mélanomes par l'activation oncogénique de la voie de la bêta-caténine n'a jamais été montré comme marqueur prédictif de résistance aux immunothérapies. Dans notre cohorte, nous avons vérifié grâce aux données de RNA Seq qu'il n'y a pas d'enrichissement en mélanome β -caténine activés parmi les non-répondeurs. Ainsi, l'expression oncogénique de ZEB1, tout comme l'activation oncogénique de la β -caténine sont des mécanismes d'exclusion de T CD8 mais ne peuvent pas, à eux seuls, prédire la réponse aux immunothérapies avant traitement. Afin d'être plus robuste, des combinaisons de marqueur pourraient être envisagées pour prédire la réponse aux immunothérapies.

Cependant, bien que ZEB1 ne semble pas être un biomarqueur de réponse aux immunothérapies, il reste une cible thérapeutique novatrice et prometteuse. Nous avons en effet déjà obtenu la preuve de concept que l'inactivation de ZEB1 permet de re-sensibiliser les cellules de mélanomes aux inhibiteurs de BRAF/MEK (Article 1) et aux anti-PD1 (Article 2). Ainsi, cibler l'EMT-TF ZEB1 ou la plasticité semble être une stratégie thérapeutique attractive pour les mélanomes métastatiques. Toutefois, le ciblage de la plasticité reste une question difficile étant donné l'implication des cycles d'EMT et de MET requis tout au long de la progression tumorale. En effet, la réversion du processus d'EMT pourrait favoriser la croissance/colonisation de métastases par des cellules tumorales déjà disséminées dans des sites distants. Toutefois, des

stratégies thérapeutiques ciblant l'EMT à des stades précoces de développement tumoraux sont en cours d'investigation, permettant de prévenir la dissémination ou de cibler les états dédifférenciés. Comme tous les facteurs de transcriptions à doigts de zinc, il est difficile de cibler ZEB1 directement. L'idée repose plus généralement sur le blocage de la plasticité phénotypique.

Dans ce contexte, l'induction de MITF par l'antagoniste de l'acide folique méthotrexate constitue une approche intéressante. L'induction de MITF dans les cellules de mélanome favorise la différenciation des cellules de mélanome, réduit fortement leur capacité migratoire et sensibilise à l'agent cytotoxique TMECG (310). D'autres stratégies thérapeutiques combinent les thérapies conventionnelles avec le ciblage des états invasifs/dédifférenciés des cellules de mélanome. Ainsi, tout comme l'inhibition d'un marqueur de l'état invasif AXL par anticorps bloquant, l'inhibition du récepteur rétinoïde et facteur clé de l'état apparenté souche/crête-neurale RXR synergise avec les inhibiteurs de la voie des MAPKinases en ralentissant la prise et croissance tumorale après injection par xénogreffe *in vivo* (311; 37).

Une autre stratégie permettant de cibler l'état dédifférencié des cellules de mélanome repose sur des observations concernant leur activité métabolique altérée. Il a en effet été montré que les cellules de mélanome dédifférenciées présentent des niveaux de glutathion plus faibles comparativement aux cellules différenciées (42). Ces niveaux réduits de glutathion constituent le talon d'Achille des cellules de mélanomes dédifférenciées, augmentant leur sensibilité à la mort par ferroptose induite par un traitement à l'Erastin. Ainsi, l'Erastin coopère avec les inhibiteurs de BRAF *in vitro* et réduit le nombre de cellules de mélanome dédifférenciées. De manière intéressante, des stratégies ciblant des mécanismes métaboliques et plus particulièrement la ferroptose montrent des résultats prometteurs dans d'autres types de cancers présentant un phénotype mésenchymateux (312).

Enfin, l'extrême rapidité d'adaptation des cellules de mélanome aux différentes stratégies thérapeutiques laisse penser que la plasticité épigénétique pourrait jouer un rôle majeur dans la résistance aux traitements. De plus, il a été montré que de nombreux modulateurs épigénétiques régulent ou interagissent avec les EMT-TFs (313). La compréhension complète du réseau de régulateurs épigénétiques coopérants avec les EMT-Tfs pour orchestrer la transition phénotypique des cellules de mélanome représente aujourd'hui un intérêt majeur afin d'identifier des drogues épigénétiques pertinentes. Par exemple, l'inhibition de l'histone méthyltransférase EZH2 permet la dédifférenciation des cellules de mélanome, restaure

l'immunogénicité tumorale et re-sensibilise ainsi les tumeurs aux immunothérapies (314). L'inhibition d'histone dé-acétylases HDAC est aussi une stratégie prometteuse pour améliorer la réponse aux immunothérapies. De nombreux essais cliniques sont en cours afin d'évaluer l'intérêt de combiner les inhibiteurs de HDAC avec les inhibiteurs des MAPKinase et/ou les immunothérapies (315; 316).

| Stratégie | Référence | Cible | Composé | Essai clinique | | Type de cancer |
|--|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|-------------|---------------------------------------|
| Inhibiteurs de la voie du TGF- β | (314) | Anticorps monoclonal TGF- β | GC10008 | Phase 1 | NCT00356460 | Carcinome rénal Mélanome |
| Inhibiteur d'AXL | (315) | Petite molécule inhibitrice d'AXL | BGB324 | Phase I/II en combinaison avec dabrafenib/trametinib ou pemprolizumab | NCT02872259 | Mélanome métastatique |
| Drogue épigénétique | (316) | Inhibiteur de HDAC | Entinostat | Phase II en combinaison avec l'erlotinib | NCT00602030 | Cancer du poumon à non petite cellule |
| Inducteur de ferroptose | (317) | GPX1 | PRLX93936 (analogue de l'erastin) | Phase I | NCT00528047 | Tumeurs solides avancées |

Figure 68 Exemples des principales stratégies thérapeutiques en cours d'évaluation permettant de cibler la plasticité cellulaire dépendante de l'EMT dans les cancers. Inspiré de (286)

ANNEXE

Pleiotropic Roles for ZEB1 in Cancer

Julie Caramel^{1,2}, Maud Ligier^{1,2}, and Alain Puisieux^{1,2}



Abstract

ZEB1 is a prime element of a network of transcription factors that controls epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a reversible embryonic transdifferentiation program that allows partial or complete transition from an epithelial to a mesenchymal state. Aberrant expression of ZEB1 has been reported in a variety of human cancers, where it is generally believed to foster migration, invasion, and metastasis. Over the past few years, *in vitro* and *in vivo* observations have highlighted unsuspected intrinsic oncogenic functions of ZEB1 that impact tumorigenesis from its earliest stages. Located downstream of regulatory processes that integrate

microenvironmental signals and directly implicated in feedback loops controlled by miRNAs, ZEB1 appears to be a central switch that determines cell fate. Its expression fosters malignant transformation through the mitigation of critical oncosuppressive pathways and through the conferment of stemness properties. ZEB1 is also a key determinant of cell plasticity, endowing cells with the capacity to withstand an aberrant mitogenic activity, with a profound impact on the genetic history of tumorigenesis, and to adapt to the multiple constraints encountered over the course of tumor development. *Cancer Res*; 78(1); 30–35. ©2017 AACR.

Introduction

In multicellular organisms, interconversion between epithelial and mesenchymal phenotypes through the process of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) provides the flexibility and plasticity required during crucial steps of embryogenesis, such as mesoderm and neural crest formations (1). EMT is an evolutionarily conserved process, which is tightly regulated through the interplay between environmental signals from Wnt, TGF β , FGF family members, and a complex web of intracellular signaling pathways that converge toward the activation of a network of EMT-inducing transcription factors (EMT-TF). This network involves zinc finger proteins (e.g., SNAI1, SNAI2), basic helix-loop-helix transcription factors (e.g., the TWIST family and E47) and zinc finger and homeodomain proteins (ZEB1 also named TCF8 or DeltaEF1, and ZEB2 also named SIP1). This reversible transdifferentiation process is characterized by a profound remodeling of the cytoskeleton, a switch from apical-basolateral polarity to front-back polarity and a loss of cell-cell adhesion. One of the earliest steps in EMT is the loss of E-cadherin function, a key determinant of adherens junctions, and the capacity of EMT-TFs to trigger EMT commitment relies on the direct repression of the *CDH1* promoter (which encodes E-cadherin). ZEB1 and ZEB2 proteins belong to the *zfh* family of transcription factors. They both have two flanking C2H2-type zinc finger clusters interacting with paired CACCT(G) E-box-like promoter elements and a central POU-like homeodomain deprived of DNA-binding activity (2). Several protein-binding domains are present in ZEB1

and ZEB2, including the Smad-, CtBP-, and p300-P/CAF-interaction domains, that are instrumental in the control of their transcriptional activity. As a consequence, although initially described as transcriptional repressors through their interaction with the CtBP corepressor, ZEB factors can also activate transcription, through their interaction with coactivators, such as p300 and P/CAF. This dual activity is of utmost importance in the control of EMT. Indeed, in contrast with other EMT-TFs, ZEB1/2 proteins may trigger the repression of epithelial genes encoding components of adherens and tight junctions, desmosomes and intermediate filaments while positively regulating mesenchymal factors, such as vimentin, fibronectin, N-cadherin and matrix metalloproteinases, facilitating the general dedifferentiation program. Importantly, although they exhibit a high structural homology, ZEB1 and ZEB2 display distinct expression domains, activities, and knockout mouse phenotypes. For instance, they exhibit antagonistic effects when controlling TGF β /BMP signaling (3), as ZEB1 synergizes with Smad-mediated transcriptional activation and ZEB2 acts as a repressor by recruiting CtBP. Furthermore, *Zeb2* knockout causes embryonic arrest around stage E8.5, whereas *Zeb1*-null mice die perinatally, displaying respiratory failure, and major defects exclusively in skeletal elements and thymic T cells (4). Although a detailed *in situ* analysis of ZEB1 and ZEB2 has yet to be performed in human adult tissues, it is known that their mRNA expression levels vary significantly among tissues. Interestingly, ZEB1 and ZEB2 often show mirrored expression, as evidenced in the melanocyte lineage in which ZEB2 is expressed and represses ZEB1 expression, suggesting that they may have specific subfunctions, which are not redundant but complementary (4, 5).

¹Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Lyon, France. ²LabEx DEVweCAN, Université de Lyon, Lyon, France.

Corresponding Author: Alain Puisieux, Cancer Research Center of Lyon, 28 rue Laennec, Lyon 69008, France. Phone: 334-7878-2667; Fax: 334-7878-2720; E-mail: alain.puisieux@lyon.unicancer.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2476

©2017 American Association for Cancer Research.

ZEB1, Invasion, and Metastatic Dissemination

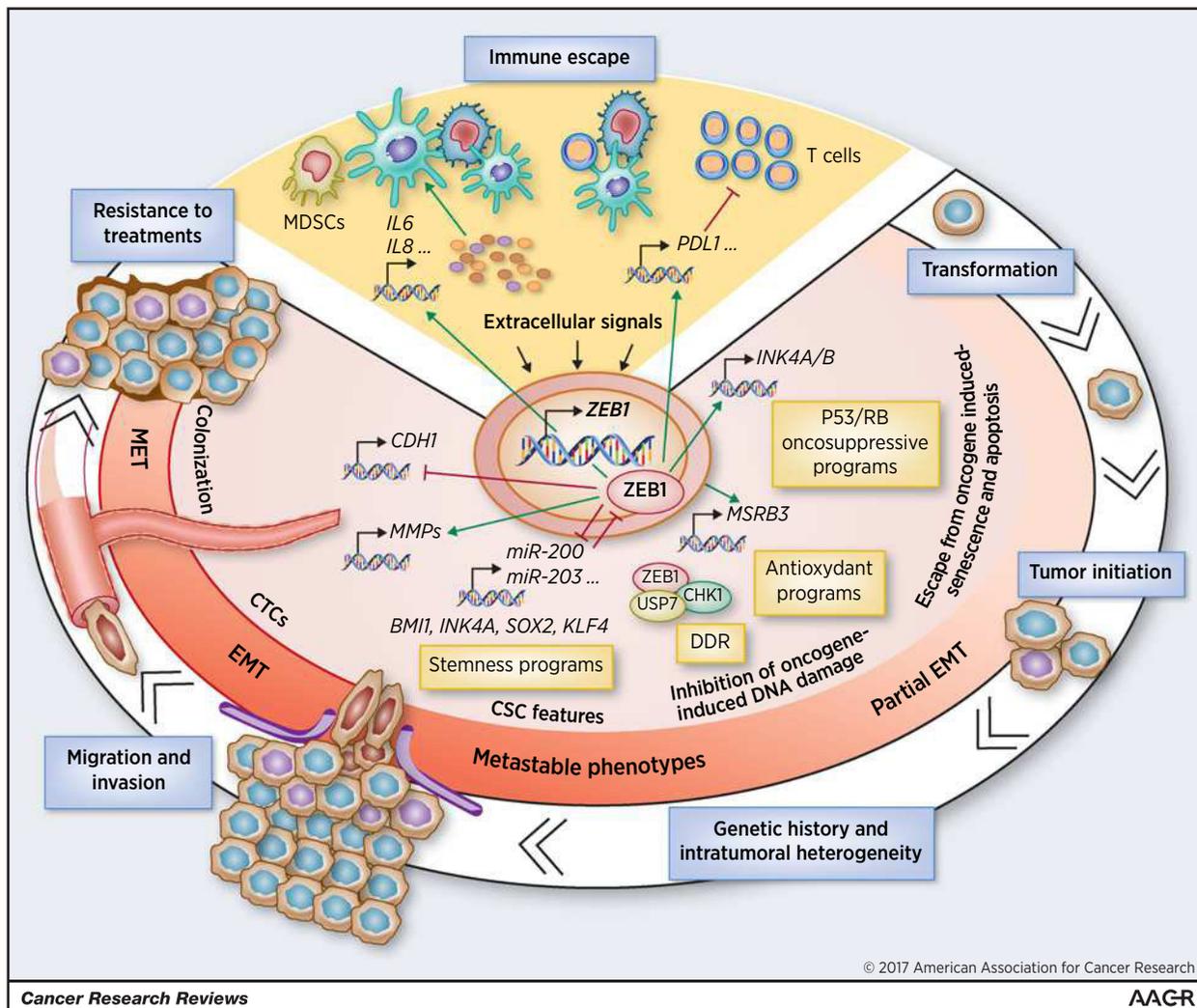
The significant parallels between cell plasticity in embryogenesis and tumor development led to the hypothesis that carcinoma cells rely on some elements of embryonic EMT during metastatic dissemination. Although it remains the subject of intensive debate (6), numerous studies support the notion that, in the course of

tumor progression, extracellular molecules in the tumor micro-environment (TGF β , FGF, EGF, HGF, Wnt, Notch, Hedgehog, etc.) and related pathways (MAPK, PI3K, NF- κ B, Wnt/ β -catenin, Notch, etc.) induce EMT, triggering the dissociation of malignant cells from primary tumors. Mesenchymal features and properties of EMT-committed carcinoma cells then facilitate migration and dissemination to distant sites. The acquisition of mesenchymal traits through EMT may thus occur in a minority of malignant cells, a notion that is supported by the observation of single cancer cells or small-cell clusters with reduced E-cadherin levels at the invasive front of carcinomas. Moreover, EMT-committed cancer cells may acquire a hybrid state, characterized by a dynamic combination of epithelial and mesenchymal traits, and such a partial and reversible activation of EMT has been shown to be critical for metastasis (1). The autocrine TGF β /ZEB/miR-200 signaling regulatory network is believed to be a major driver of this cell plasticity (7). The TGF β pathway is indeed a central activator of ZEB1 and ZEB2, while ZEB proteins and miR-200 family members (miR-200a, miR-200b, miR-200c, and miR-141) are involved in a double-negative feedback loop, which controls EMT both during development and tumorigenesis. The relevance of the miR-200/ZEB loop with regards to metastatic dissemination has been demonstrated *in vivo*. In a mouse model of lung adenocarcinoma, owing to the expression of mutant *K-Ras* and *p53*, miR-200 family members displayed the most prominent differential expression in metastasis-prone tumors relative to metastasis-incompetent tumors. Moreover, forced expression of the miR-200b cluster in metastasis-prone tumor cells abrogated their capacity to undergo EMT, invade, and metastasize in syngeneic mice (8). ZEB1 was shown to suppress the expression of cell polarity factors, repress basement membrane synthesis, and activate the expression of matrix metalloproteases, such as MMP-1, MMP-9, and MMP-14, thereby promoting the remodeling of the basement membrane and fostering invasion into surrounding tissues (7). In human colon, lung, and breast cancer cell lines, forced expression of ZEB1 increases invasive and migratory capacities *in vitro* and metastases *in vivo*. Using a mouse pancreatic cancer model driven by Pdx1-cre-mediated activation of mutant *K-ras* and mutant *p53*, the group of T Brabletz recently demonstrated that *Zeb1* was a key factor for local invasion, colonization capacities, and distant metastasis (9). Of note, depletion of *Snai1* or *Twist1* EMT-TFs in the same model was not able to affect these processes, suggesting a prominent role for *Zeb1* (10). Finally, the implication of EMT in the invasion–metastasis cascade highlights the dynamic nature of the process, the acquisition of mesenchymal features enhancing invasive and migratory capacities of malignant cells, while a mesenchymal–epithelial transition is required for metastatic colonization (1). This notion of epithelial–mesenchymal plasticity is supported by the findings of circulating tumor cells with a hybrid state in patients with advanced metastatic tumors. Cancer cell plasticity has recently also been observed in mouse mammary tumors using intravital microscopy, demonstrating that temporal acquisition of the mesenchymal state is important for migration (11).

ZEB1, Malignant Transformation, and Tumor Initiation

There is increasing evidence that functions of ZEB proteins are not limited to EMT regulation. Indeed, they might participate in a central switch that controls critical cellular functions

and states, including differentiation, proliferation, response to DNA damage, and cell survival, with a dramatic impact on tumor development, from early steps of tumorigenesis to cancer progression (Fig. 1). In line with this notion, ZEB1 expression was observed in noninvasive neoplastic lesions, both in human samples and in animal models. For example, a significant fraction of human *in situ* pancreatic adenocarcinoma shows high levels of the EMT-TF (12). In mice, *Zeb1* is overexpressed in noninvasive pancreatic lesions [pancreatic intraepithelial lesions (PanIN); ref. 10], and *Zeb1* depletion in mutant *K-ras* mice with a wild-type *p53* causes a reduction in both the number and grading of acinar ductal metaplasia and PanINs, suggesting that ZEB1 is a key driver of early steps of pancreatic tumorigenesis (9). Consistently, ZEB1 was shown to profoundly affect P53 and RB-dependent oncosuppressive pathways and to prevent both senescence and apoptosis, two critical barriers against tumor development. Mouse embryonic fibroblasts (MEF) from *Zeb1* knockout mice undergo early replicative senescence. *Zeb1* is indeed able to repress the cyclin-dependent kinase inhibitors *CDKN1A* (best known as *p21^{waf1}*) and *INK4B* (best known as *p15^{ink4b}*), thereby allowing G₁–S cell-cycle progression (13). Of note, ZEB1 and ZEB2 might have opposing effects in controlling replicative senescence, as forced expression of ZEB2 in breast and hepatic cancer cell lines promotes senescence through transcription repression of *hTERT* expression (14). ZEB1 was also reported to overcome oncogene-induced senescence triggered by EGFR overexpression in human esophageal epithelial cells, via the repression of *p16^{ink4a}* and *p15^{ink4b}* expression (15). Its expression also increases drug resistance in pancreatic cancer cells (16), supporting data showing that EMT activators confer antiapoptotic properties to malignant cells (17–19). Underlying the role of ZEB1 in the control of cell proliferation and cell survival is the cross-talk between ZEB1 and the P53 family members (20). Indeed, ZEB1 is involved in the transcriptional regulation of *p63* and *p73* isoforms in MEFs as well as during myoblast and keratinocyte differentiation, while P53 controls ZEB1 levels through the transcriptional activation of miR-200c/141 and miR-200a/miR200b/429 clusters (21). Of note, other EMT-TFs, including *SNAI1* and *TWIST1* have been shown to control P53, highlighting the existence of a functional interaction between the network of EMT-TFs and the P53 signaling pathways with a critical role in the control of cell differentiation and oncosuppressive processes (19). As a consequence of its role as a molecular bypass of failsafe programs, ZEB1 cooperates with mitogenic oncoproteins for malignant transformation of epithelial cells. *In vitro*, ZEB1 expression in mammary epithelial cells, either ectopically induced or activated in response to permissive environmental conditions, reduces the number of genetic events necessary for malignant conversion (22). Moreover, ZEB1 causally promotes transformation of oncogenically manipulated human bronchial epithelial cells (23) and is required for tumor initiation in a mouse *KRas^{V12}*-mediated lung cancer model (12). In the latter model, Ras-induced *Zeb1* expression directly represses the Pi3k pathway inhibitor *Pten*, providing a rational explanation for the low frequency of *PTEN* mutations in human tumors initiated by *RAS* mutants. Interestingly, this model also led to the demonstration that the role of ZEB1 in tumor initiation can be distinguished from that in EMT commitment and metastasis based on their requirements of different levels of the EMT-TF. Indeed, a low threshold of

**Figure 1.**

Oncogenic functions of the EMT-inducing transcription factor ZEB1. The ZEB1 transcription factor is a central determinant of cell fate. It transcriptionally regulates factors involved in the control of cell differentiation, proliferation, survival, and motility. Its expression fosters the tumorigenic process from the earliest steps, including malignant transformation, and provides cancer cells with migratory and invasive capabilities. Over the course of tumor development, ZEB1 has a profound impact on cancer cell plasticity and intratumoral genetic and epigenetic heterogeneity. ZEB1 also promotes an escape from the immune control in the context of an intricate cross-talk with immune cells and finally contributes to resistance to treatments. CTC, circulating tumor cells; MET, mesenchymal-to-epithelial transition; MDSC, myeloid-derived suppressor cells.

ZEB1 is sufficient for triggering tumor initiation, whereas further induction is necessary for promoting metastasis (12). Beyond malignant transformation, ZEB1 expression was also shown in lung and pancreatic cancer cells to be a determinant of K-RAS addiction, the epithelial differentiation state of K-RAS-mutant cells being associated with dependency on the mitogenic oncogene to maintain cell survival (24). Importantly, the oncogenic activities of ZEB1 are not restricted to epithelial cells. As an illustration, ZEB1 cooperates with BRAF^{V600} in promoting transformation of immortalized melanocytes, and its depletion impairs or delays BRAF^{V600}-induced tumorigenesis in nude mice upon xenografting (5). Interestingly, ZEB2 displays an opposite pattern of expression in the course of melanocytic transformation and acts as tumor suppressor in these cells (5).

ZEB1, Cancer Stem Cells, and Genetic History of Tumorigenesis

The initial observation that, after EMT, transformed human mammary epithelial cells acquire stem-like features led us and others to propose that EMT commitment generates cancer stem cells (CSC; refs. 25, 26). CSCs are characterized by two major properties: the ability to self-renew and the capacity to regenerate the phenotypic heterogeneity of the parental tumor (27). These cells, that are believed to sustain primary tumor growth and to drive the seeding and establishment of metastases at distal sites, generally represent a minor fraction of the whole cancer cell population. Whereas CSCs were generally thought to reside at the apex of a unidirectional neoplastic cell hierarchy, the functional connection between EMT and stemness implies that CSCs

can be derived *de novo* from their non-CSC counterparts highlighting an unsuspected level of cancer cell plasticity within individual tumors. There is increasing evidence that ZEB1 plays a major role in the dynamic conversion between CSCs and non-CSCs. As an illustration, the group of RA Weinberg demonstrated in the model of basal-type breast cancers that in response to microenvironmental stimuli, such as TGF β production, ZEB1 increases the rate of transition from non-CSCs to CSCs (28). This dynamic process is epigenetically driven, the ZEB1 promoter being maintained in a bivalent chromatin configuration, characterized by simultaneous repressive (H3K27me3) and activating (H3K4me3) histone modifications, resulting in an efficient inducibility. At the molecular level, ZEB1 regulates stemness by inhibiting the expression of stemness-repressing miRNAs, including miR-200, but also of miR-183 and miR-203, which together target BMI1 and possibly other stemness-associated factors, such as SOX2 and KLF4 (16). Importantly, although the induction of ZEB1 expression through microenvironmental cues might be instrumental in promoting cancer cell plasticity, the EMT program has also been shown to be involved in the normal mammary epithelial stem cell state. Recently, we have shown that ZEB1 is expressed in normal human mammary stem cells and triggers an antioxidant program driven by the methionine sulfoxide reductase MSR3 that protects stem cells against the oxidative stress normally induced by an aberrant mitogenic activation (29). This preemptive program, which declines as mammary cells differentiate, prevents the formation of oncogene-induced DNA damage. As a direct consequence, ZEB1 expression precludes the activation of the P53-dependent DNA damage response (DDR) and the subsequent induction of oncogene-induced apoptosis and premature senescence, two critical barriers against malignant transformation. Moreover, because double-strand breaks generated following an oncogenic activation are a major cause of genomic instability (30), endogenous ZEB1 expression ensures the maintenance of genomic stability over the course of tumorigenesis. Overall, these findings demonstrate that the differentiation status of the cell profoundly influences the early response to an oncogenic activation and is a key determinant of the onset of cancer chromosomal instability. They also provide a rational explanation for the existence of a subclass of aggressive breast neoplasms exhibiting high ZEB1 expression, a low frequency of P53 mutations and a subnormal genomic landscape. In addition, ZEB1 was recently shown to be phosphorylated and stabilized by ATM following ionizing radiation of breast cancer cells (31). ZEB1 upregulation triggers stabilization of CHK1 by activating the USP7 deubiquitylase, promoting radioresistance. Overall, these observations suggest that, during tumorigenesis, ZEB1 may both prevent the formation of oncogene-induced DNA damage by dampening the oxidative stress and increase the clearance of DNA breaks through the activation of the DDR.

ZEB1 and Resistance to Treatment

EMT commitment and stemness properties have been associated with resistance to standard radio- and chemotherapy, as well as with novel targeted therapies (32). Whether, in a given cell type and treatment condition, resistance to treatment is associated with mesenchymal features, or whether it is determined by specific functions of EMT-TFs remains unclear. Nevertheless, several lines of evidence suggest a specific role for ZEB1. First, as previously mentioned, the activation of the DDR by ZEB1

promotes radioresistance in breast cancer cells (31). Second, several miRNAs targeted by ZEB1 have been implicated in chemoresistance, namely miR-203, miR-429, and miR-200c. The negative feedback loop between ZEB1 and miR-429 has been involved in the development of resistance to cisplatin in epithelial ovarian carcinoma (33). As epithelial ovarian cancer cells exhibit higher resistance to cisplatin compared with those with a mesenchymal status (34), the mechanism of resistance is likely EMT independent in this context. In glioblastoma, miR-200c negatively regulates the O-6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), via c-MYB, resulting in chemosensitivity (35). Expression of miR-203 also increases sensitivity of breast and pancreatic cancer cells to gemcitabine and paclitaxel (36). Interestingly, miR-203 levels increase upon exposure to the HDAC inhibitor mocetinostat, whereas the expression of ZEB1 reduces, paving the way for the use of epigenetic drugs to restore chemosensitivity through the reversion of the EMT/stemness phenotype. Third, ZEB1 has recently been reported to play an essential role in cellular lipid metabolism and in the synthesis, storage, and use of long-chain polyunsaturated fatty acids. These lipids are the substrates for lipid peroxidation, leading to the formation of toxic lipid peroxides that can ultimately trigger ferroptosis, a nonapoptotic form of cell death. In therapy-resistant mesenchymal cells, the phospholipid glutathione peroxidase GPX4 dissipates these reactive peroxides and thus protects them against cell death (37). Overall these findings suggest that GPX4 may be the Achilles' heel of resistant cancer cells, its targeting representing an innovative approach to deal with ZEB1-mediated resistance to treatment. Finally, several studies also suggest that ZEB1 expression promotes resistance to new anticancer therapies, including targeted therapies and immunotherapies (32). For example, a ZEB1-dependent EMT phenotype promotes resistance to erlotinib in EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines, with a major role for the receptor tyrosine kinase AXL (38). In BRAF^{V600}-mutated melanoma, high ZEB1 expression is associated with primary resistance to MAPK inhibitors (39). Experimentally, ZEB1 depletion sensitizes naïve melanoma cells to BRAF inhibitors (BRAFi) and decreases the viability of BRAFi-resistant melanoma cells, while forced expression of the EMT-TF in low ZEB1-expressing cells triggers a rapid drug-induced adaptation, induces a stem-like phenotype, and promotes resistance (39). In contrast, ZEB2 expression is associated with increased sensitivity to BRAFi, further highlighting the dual roles of ZEB1 and ZEB2 in melanomagenesis. The emergence of immune checkpoint inhibitors has revolutionized the therapy of several cancers, including melanoma, as the blocking of the interaction between the programmed cell death (PD)-1 protein and one of its ligands, PD-L1, promotes impressive antitumor responses. Nonetheless, the high degree of nonresponders, and in some cases the emergence of resistance in patients who initially respond, calls for the development of strategies aimed at overcoming primary and acquired resistance to these agents. Although the underlying mechanisms remain to be characterized, mesenchymal cancer cells appear to be primed to hijack immune defenses driven by natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes. Interestingly, miR-200 has recently been shown to target PD-L1. ZEB1 expression relieves the miR-200 repression of PD-L1 on tumor cells, leading to CD8⁺ T-cell immunosuppression (40). These findings are supported by robust correlations between the EMT score, miR-200 levels, and PD-L1 expression in NSCLC. Tumor cells are also able to recruit a protumoral immune microenvironment through the production

Caramel et al.

and release of inflammatory cytokines. In breast cancer cell lines, chromatin immunoprecipitation sequencing resulted in the identification of a ZEB1-regulated inflammatory phenotype (41). ZEB1 was demonstrated to transcriptionally activate the *IL6* and *IL8* genes in a direct manner, leading to the recruitment of myeloid-derived suppressive cells.

Conclusion and Future Directions

A growing body of evidence indicates that the role of ZEB1 in normal and cancer cells is not limited to the transition from an epithelial state toward a mesenchymal and motile phenotype. Indeed, it is a crucial regulator of fundamental intracellular decision-making processes, including stemness versus differentiation, cell proliferation versus senescence, and survival versus apoptosis. Owing to its strategic location downstream of regulatory processes integrating microenvironmental signals and to its direct implication in feedback loops controlled by miRNAs, ZEB1 has a pivotal role in cell fate determination. A key feature of ZEB1 is its implication in the regulation of cell plasticity. As a dynamic process that promotes the reversible conversion of tumor cells between metastable states, ZEB1-mediated plasticity is a prominent contributor to the capacity of premalignant cells and malignant cells to adapt to the multiple constraints encountered from the earliest steps of tumorigenesis to the invasion–metastasis

cascade. The mechanistic links between EMT and epigenetics, including the characterization of the epigenetic profiles of CSCs versus non-CSCs and the identification of chromatin-modifying enzymes implicated in the transcriptional regulation of EMT-TFs, are important areas for future investigation. A better understanding of the intrinsic mechanisms underlying ZEB1-mediated cancer cell plasticity and of the role of the tumor microenvironment in shaping this plasticity is also needed to control the emergence of resistance to treatment and to ensure more effective cancer therapies.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank members of the Puisieux laboratory for helpful discussions and Brigitte Manship for critical reading of the manuscript. M. Ligier is supported by a fellowship from the "Région Rhône-Alpes." A. Puisieux is supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer, the Institut National du Cancer (PLBI009), the Lyon Integrated Research Institute in Cancer (LYRIC), and the LabEx DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061) of Lyon University, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR). J. Caramel is supported by grants from the Fondation de France (67134).

Received August 22, 2017; revised October 3, 2017; accepted October 11, 2017; published OnlineFirst December 18, 2017.

References

- Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016;166:21–45.
- Vandewalle C, Van Roy F, Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:773–87.
- Postigo AA. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGF beta/BMP signaling pathway. *EMBO J* 2003;22:2443–52.
- Miyoshi T, Maruhashi M, Van De Putte T, Kondoh H, Huylebroeck D, Higashi Y. Complementary expression pattern of Zfhx1 genes Sip1 and δ EF1 in the mouse embryo and their genetic interaction revealed by compound mutants. *Dev Dyn* 2006;235:1941–52.
- Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A, et al. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 2013;24:466–80.
- Ye X, Brabletz T, Kang Y, Longmore GD, Nieto MA, Stanger BZ, et al. Upholding a role for EMT in breast cancer metastasis. *Nature* 2017;547:E1–3.
- Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop—a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep* 2010;11:670–7.
- Gibbons DL, Lin W, Creighton CJ, Rizvi ZH, Gregory PA, Goodall GJ, et al. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. *Genes Dev* 2009;23:2140–51.
- Krebs AM, Mitschke J, Losada ML, Schmalhofer O, Boerries M, Busch H, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol* 2017;19:518–29.
- Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 2015;527:525–30.
- Beerling E, Seinstad D, de Wit E, Kester L, van der Velden D, Maynard C, et al. Plasticity between epithelial and mesenchymal states unlinks EMT from metastasis-enhancing stem cell capacity. *Cell Rep* 2016;14:2281–8.
- Liu Y, Lu X, Huang L, Wang W, Jiang G, Dean KC, et al. Different thresholds of ZEB1 are required for Ras-mediated tumour initiation and metastasis. *Nat Commun* 2014;5:5660.
- Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, Higashi Y, Dean DC. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development* 2008;135:579–88.
- Lin SY, Elledge SJ. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* 2003;113:881–9.
- Ohashi S, Natsuizaka M, Wong GS, Michaylira CZ, Grugan KD, Stairs DB, et al. Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Res* 2010;70:4174–84.
- Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* 2009;11:1487–95.
- Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V, et al. Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 2004;6:625–30.
- Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008;14:79–89.
- Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 2014;16:488–94.
- Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: At the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer* 2012;132:745–54.
- Fontemaggi C, Gurtner A, Damalas A, Costanzo A, Higashi Y, Sacchi A, et al. deltaEF1 repressor controls selectively p53 family members during differentiation. *Oncogene* 2005;24:7273–80.
- Morel AP, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, Wierinckx A, et al. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet* 2012;8:e1002723.
- Larsen JE, Nathan V, Osborne JK, Farrow RK, Deb D, Sullivan JP, et al. ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J Clin Invest* 2016;126:3219–35.
- Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, et al. A gene expression signature associated with "K-Ras Addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 2009;15:489–500.
- Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008;3:e2888.

26. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The Epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704–15.
27. Badve S, Nakshatri H. Breast-cancer stem cells-beyond semantics. *Lancet Oncol* 2012;13:e43–8.
28. Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, Bell G, Kleer CG, Reinhardt F, et al. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* 2013;154:61–74.
29. Morel A-P, Ginestier C, Pommier RM, Cabaud O, Ruiz E, Wicinski J, et al. A stemness-related ZEB1–MSRB3 axis governs cellular plasticity and breast cancer genome stability. *Nat Med* 2017;23:568–78.
30. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 2008;319:1352–5.
31. Zhang P, Wei Y, Wang L, Debeb BG, Yuan Y, Zhang J, et al. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat Cell Biol* 2014;16:864–75.
32. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:611–29.
33. Zou J, Liu L, Wang Q, Yin F, Yang Z, Zhang W, et al. Downregulation of miR-429 contributes to the development of drug resistance in epithelial ovarian cancer by targeting ZEB1. *Am J Transl Res* 2017;9:1357–68.
34. Miow QH, Tan TZ, Ye J, Lau JA, Yokomizo T, Thiery J, et al. Epithelial-mesenchymal status renders differential responses to cisplatin in ovarian cancer. *Oncogene* 2015;34:1899–907.
35. Siebzehnrubl FA, Silver DJ, Tugertimur B, Deleyrolle LP, Siebzehnrubl D, Sarkisian MR, et al. The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Mol Med* 2013;5:1196–212.
36. Meidhof S, Brabletz S, Lehmann W, Preca B-T, Mock K, Ruh M, et al. ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Mol Med* 2015;7:831–47.
37. Viswanathan VS, Ryan MJ, Dhruv HD, Gill S, Eichhoff OM, Seashore-Ludlow B, et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* 2017;547:453–7.
38. Zhang Z, Lee JC, Lin L, Olivas V, Au V, LaFramboise T, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet* 2012;44:852–60.
39. Richard G, Dalle S, Monet M-A, Ligier M, Boespflug A, Pommier RM, et al. ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors. *EMBO Mol Med* 2016;8:1143–61.
40. Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn Y-H, Byers LA, et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun* 2014;5:5241.
41. Katsura A, Tamura Y, Hokari S, Harada M, Morikawa M, Sakurai T, et al. ZEB1-regulated inflammatory phenotype in breast cancer cells. *Mol Oncol* 2017;11:1241–62.

Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

Pleiotropic Roles for ZEB1 in Cancer

Julie Caramel, Maud Ligier and Alain Puisieux

Cancer Res 2018;78:30-35. Published OnlineFirst December 18, 2017.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-17-2476](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2476)

Cited articles This article cites 41 articles, 9 of which you can access for free at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/1/30.full#ref-list-1>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, use this link
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/1/30>.
Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

RÉFÉRENCES

1. *Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe.* **Simoës-Costa M, Bronner ME.** 2015, *Development*, pp. 142:242–57.
2. *Induction of the neural crest: a multigene process.* **Knecht AK, Bronner-Fraser M.** 2002, *Nat Rev Genet*, pp. 3:453–61.
3. *The melanocyte lineage in development and disease.* **Richard L. Mort, Ian J. Jackson, E. Elizabeth Patton.** 2015, *Development*, pp. 142, 620-632.
4. *MITF—the first 25 years.* **Colin R. Goding, Heinz Arnheiter.** 2019, *Genes Dev*, pp. 33(15-16): 983–1007.
5. *The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology.* **Kawakami Akinori, Fisher David E.** 2017, *Laboratory Investigation*, pp. 97, 649–656.
6. *Melanin.* **Riley PA.** 1997, *Int J Biochem Cell Biol.*, pp. 29(11):1235-9.
7. *Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress.* **Costin GE, Hearing VJ.** 2007, *FASEB J*, pp. 21(4):976-94.
8. *Skin melanocytes: biology and development.* **Mirosława Cichorek, Małgorzata Wachulska, Aneta Stasiewicz, and Agata Tyimińska.** 2013, *Postepy Dermatol Alergol*, pp. 30(1): 30–41.
9. *Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression.* **Denecker G, Vandamme N, Akay Ö, Koludrovic D, Taminau J, Lemeire K, Gheldof A, De Craene B, Van Gele M, Brochez L, Udupi G M, Rafferty M, Balint B, Gallagher W M, Ghanem G, Huylebroeck D, Haigh J, van den Oord J, Larue L, Davidson I, Marice JC, Berx G.** 2014, *Cell Death Differ*, pp. 21(8): 1250–1261.
10. *A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma.* **Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A, Saldanha G, Osborne J, Hutchinson P, Tse G, Lachuer J, Puisieux A, Pringle JH, Ansieau S, Tulchinsky E.** 2013, *Cancer Cell*, pp. 466-480.
11. *The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia.* **Bastian, Boris B.** 2014, *Annu Rev Pathol*, pp. 9: 239–271.
12. *The biologic forms of malignant melanoma.* **Clark WH Jr, Elder DE, Van Horn M.** 1986, *Hum Pathol*, pp. 17(5):443-50.
13. *Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Incremental Disruption of Key Signaling Pathways during Melanoma Evolution.* **Shain A. Hunter, Nancy M. Joseph, Richard Yu, Jamal Benhamida, Shanshan Liu, Tarl Prow, Beth Ruben, Jeffrey North, Laura Pincus, Iwei Yeh, Robert Judson, Boris C. Bastian.** 2018, *Cancer Cell*, pp. 34(1): 45–55.e4.
14. *High frequency of BRAF mutations in nevi.* **Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS.** 2003, *Nat Genet*, pp. 33(1):19-20.
15. *Genomic Classification of Cutaneous Melanoma.* **The Cancer Genome Atlas Network.** 2015, *Cell*, pp. VOLUME 161, ISSUE 7, P1681-1696.
16. *Ras, Raf, and MAP Kinase in Melanoma.* . **Solus JF, Kraft S.** 2013, *Advances in anatomic pathology*, pp. 4:Vol-20.
17. *Targeting mutant NRAS signaling pathways in melanoma.* **Vu HL, Aplin AE.** 2016, *Pharmacological research*.
18. *Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer.* **Yuri E. Nikiforov, Marina N. Nikiforova.** 2011, *Nature review endocrinology*, pp. 7,569-580.
19. *Hypothesis: a role for telomere crisis in spontaneous regression of melanoma.* **Bastian, Boris C.** 2003, *Arch Dermatol*, pp. 139(5):667-8.
20. **Tonnessen Crystal A, Haass Nikolas K.** *Melanoma: From Tumor-Specific Mutations to a New Molecular Taxonomy and Innovative Therapeutics.* [book auth.] Nestle Frank Bieber Thomas. *Personalized Treatment Options in Dermatology.* 2015, pp. 7-27.
21. *Genome-wide association study identifies a new melanoma susceptibility locus at 1q21.3.* **MacGregor S, Montgomery GW, Liu JZ, Zhao ZZ, Henders AK, Stark M, Schmid H, Holland EA, Duffy DL, Zhang M, Painter JN,**

- Nyholt DR, Maskiell JA, Jetann J, Ferguson M, Cust AE, Jenkins MA, et al. , Brown KM, Martin NG, Mann GJ, Hayward NK. 2011, *Nature Genetics.*, pp. 43(11):1114–1118.
22. *Expression of polycomb group protein EZH2 in nevi and melanoma.* McHugh JB, Fullen DR, Ma L, Kleer CG, Su LD. 2007, *Journal of Cutaneous Pathology*, pp. 34(8):597–600.
23. *Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma.* Keith S. Hoek, Colin R. Goding. 2010, *Pigment Cell Melanoma Res*, pp. 23; 746–759.
24. *Efficient tumour formation by single human melanoma cells.* Quintana E., Shackleton M., Sabel M.S., Fullen D.R., Johnson T.M., Morrison S.J. 2008, *Nature*, pp. 456, 593–598.
25. *The low affinity neurotrophin receptor CD271 regulates phenotype switching in melanoma.* Gaetana Restivo, Johanna Diener, Phil F. Cheng, Gregor Kiowski, Mario Bonalli, Thomas Biedermann, Ernst Reichmann, Mitchell P. Levesque, Reinhard Dummer, Lukas Sommer. 2017, *Nature Communications*.
26. *Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271.* Boiko A.D., Razorenova O.V., van de Rijn M. 2010, *Nature*, pp. 133–137.
27. *Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance.* Imanol Arozarena, Claudia Wellbrock. 2019, *Nat Rev Cancer*, pp. 19(7):377-391.
28. *In vivo Switching of Human Melanoma Cells between Proliferative and Invasive States.* Hoek, Keith S., et al. 2008, *Cancer Research*, pp. 68(3):650–6.
29. *Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma.* Judith Müller, Oscar Krijgsman, Jennifer Tsoi, Lidia Robert, Willy Hugo, Chunying Song, Xiangju Kong, Patricia A. Possik, Paulien D. M. Cornelissen-Steijger, Marnix H Geukes Foppen, Kristel Kemper, Colin R. Goding, Ultan McDermott, Christian Blank et al. 2014, *Nature Communications*, p. 15;5:5712.
30. *Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma.* Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM. 2002, *Cancer Cell*, pp. (3):279-88.
31. *Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state.* Annelien Verfaillie, Hana Imrichova, Zeynep Kalender Atak, Michael Dewaele, Florian Rambow, Gert Hulselmans, Valerie Christiaens, Dmitry Svetlichnyy, Flavie Luciani, Laura Van den Mooter, Sofie Claerhout, Mark Fiers, Fabrice Jo et al. 2015, *Nat Comm*, p. 6: 6683.
32. *MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment.* Stefanie Riesenberger, Angela Groetchen, Robert Siddaway, Tobias Bald, Julia Reinhardt, Denise Smorra, Judith Kohlmeyer, Marcel Renn, Bengt Phung, Pia Aymans, Tobias Schmidt, Veit Hornung, Irwin Davidson, Colin R. Goding, Göran Jönsson, et a. 2015, *Nat Comm*, p. 6: 8755.
33. *Collagen abundance controls melanoma phenotypes through lineage-specific microenvironment sensing.* Miskolczi Z, Smith MP, Rowling EJ, Ferguson J, Barriuso J, Wellbrock C. 2018, *Oncogene*, pp. 37(23):3166-3182.
34. *Single-cell gene expression signatures reveal melanoma cell heterogeneity.* M Ennen, C Keime, D Kobi, G Mengus, D Lipsker, C Thibault-Carpentier, I Davidson. 2014, *Oncogene*, pp. 34, pages3251–3263.
35. *Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq.* Itay Tirosh, Benjamin Izar, Sanjay M. Prakadan, Marc H. Wadsworth, Daniel Treacy, John J. Trombetta, Asaf Rotem, Christopher Rodman, Christine Lian, George Murphy, Mohammad Fallahi-Sichani, Ken Dutton-Regester et al. 2016, *Science*.
36. *Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities.* Rambow F, Marine JC, Goding CR. 2019, *Genes Dev*, pp. 33(19-20):1295-1318.
37. *Towards minimal residual disease-directed therapy in melanoma.* Rambow F., Rogiers A., Marin-Bejar O., Aibar S., Femel J., Dewaela M., Karras P., Brown D., Chang YH., Debiec-Rychter M., et al. 2018, *Cell*, pp. 174: 843–855.e19.
38. *Mutations of the BRAF gene in human cancer.* Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Neil Davis, Ed Dicks, Rebecca Ewing, Yvonne Floyd, Kristian Gray, Sarah Hall, Rachel Hawes, Jaime Hughes, Vivian Kosmidou, Andrew Menzies, et al. 2002, *Nature*, pp. 417:949–954.
39. *BRAF inhibitors: the current and the future.* Zhang, W. 2015, *Current Opinion in Pharmacology*.

40. *Combination Therapies for the Treatment of Advanced Melanoma: A Review of Current Evidence*. **Voskoboynik M, Arkenau HT**. 2014, *Biochem Res Int*.
41. *Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi*. **Hugo W., Shi H., Sun L., Piva M., Song C., Kong X., Moriceau G., Hong A., Dahlman KB., Johnson DB., Sosman JA., Ribas A., Lo RS**. 2015, *Cell*, pp. 162(6):1271-85.
42. *Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress*. **Jennifer Tsoi, Lidia Robert, Kim Paraiso, ..., Nicolaos Palaskas, Antoni Ribas, Thomas G. Graeber**. 2018, *Cancer Cell*, pp. VOLUME 33, ISSUE 5, P890-904.E5.
43. *Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma*. **Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, Patt D, Chen TT, Berman DM, Wolchok JD**. 2015, *Journal of Clinical Oncology*.
44. *ive-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. **James Larkin, F.R.C.P., Ph.D., Vanna Chiarion-Sileni, M.D., Rene Gonzalez, M.D., Jean-Jacques Grob, M.D., Piotr Rutkowski, M.D., Ph.D., Christopher D. Lao, M.D., C. Lance Cowey, M.D., M.P.H., Dirk Schadendorf, M.D., John Wagstaff, M.D., et al**. 2019, *NEJM*, pp. 381:1535-1546.
45. *Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential*. **Sharma P, Allison JP**. 2015, *Cell*, p. 2 : Vol. 161.
46. *Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain*. **Hussein A. Tawbi, M.D., Ph.D., Peter A. Forsyth, M.D., Alain Algazi, M.D., Omid Hamid, M.D., F. Stephen Hodi, M.D., Stergios J. Moschos, M.D., Nikhil I. Khushalani, M.D., Karl Lewis, M.D., Christopher D. Lao, M.D., M.P.H., Michael A. Postow, M.D., et al**. 2018, *NEJM*, pp. 379:722-730.
47. *Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma*. **Jeffrey Weber, M.D., Ph.D., Mario Mandala, M.D., Michele Del Vecchio, M.D., Helen J. Gogas, M.D., Ph.D., Ana M. Arance, M.D., Ph.D., C. Lance Cowey, M.D., Stéphane Dalle, M.D., Ph.D., Michael Schenker, M.D., Vanna Chiarion-Sileni, M.D., et al**. 2017, *NEJM*, pp. 377:1824-1835.
48. *Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma*. **Alexander M.M. Eggermont, M.D., Ph.D., Christian U. Blank, M.D., Ph.D., Mario Mandala, M.D., Georgina V. Long, M.D., Ph.D., Victoria Atkinson, M.D., Stéphane Dalle, M.D., Andrew Haydon, M.D., Mikhail Lichinitser, M.D., Adnan Khattak, M.D., et al**. 2018, *NEJM*, pp. 378:1789-1801.
49. *Epithelial-mesenchymal transition is associated with a distinct tumor microenvironment including elevation of inflammatory signals and multiple immune checkpoints in lung adenocarcinoma*. **Lou Y Diao L, Parra Cuentas ER, Denning WL, Chen L, Fan YH, Byers LA, Wang J, Papadimitrakopoulou VA, Behrens C, Rodriguez J, Hwu P, Wistuba II, Heymach JV, Gibbons DL**. 2016, *Clinical Cancer Research*.
50. *Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma*. **Hugo W., Zaretsky JM., Sun L., Song C., Moreno BH., Hu-Lieskovan S., Berent-Maoz B., Pang J., Chmielowski B., Cherry G., Seja E., Lomeli S., Kong X., Kelley MC., Sosman JA., Johnson DB., Ribas A., Lo RS**. 2016, *Cell*, pp. 165(1):35-44.
51. *E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors*. **Hsu, M.Y., et al**. 2000, *Am J Pathol*, pp. 156, 1515–1525.
52. *Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature*. **Hoek, Keith S., et al**. 2006, *Pigment Cell Research*, pp. 290-302.
53. *CULTURE OF MELANOMA CELLS IN 3-DIMENSIONAL ARCHITECTURES RESULTS IN IMPAIRED IMMUNORECOGNITION BY CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES SPECIFIC FOR MELAN-A/MART-1 TUMOR-ASSOCIATED ANTIGEN*. **Sourabh Ghosh, MTech, Rachel Rosenthal, MD, Paul Zajac, PhD, Walter P. Weber, MD, Daniel Oertli, MD, Michael Heberer, MD, Ivan Martin, PhD, Giulio C. Spagnoli, MD, and Anca Reschner, PhD**. 2005, *Ann Surg*, pp. 242(6):851-858.
54. *Modeling Development and Disease with Organoids*. **Clevers, H**. 2016, *Cell*, pp. 165(7):1586-1597.

55. *Organoid modeling of the tumor immune microenvironment*. James T. Neal, Xingnan Li, Junjie Zhu, Valeria Giangarra, Caitlin L. Grzeskowiak, Jihang Ju, Iris H. Liu, Shin-Heng Chiou, Ameen A. Salahudeen, Amber R. Smith, Brian C. Deutsch, Lillian Liao, ..., Mark M. Davis, Calvin J. Kuo. 2018, *Cell*, pp. 175(7): 1972–1988.e16.
56. *Ex vivo treatment of patient biopsies as a novel method to assess colorectal tumour response to the MEK1/2 inhibitor, Selumetinib*. Sonia M. Novo, Stephen R. Wedge & Lesley A. Stark. 2017, Scientific report.
57. *Modeling Melanoma In Vitro and In Vivo*. Beaumont, Kimberley A., Mohana-Kumaran, Nethia and Haass, Nikolas K. 2014, *Healthcare*, pp. 2, 27-46.
58. *Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma*. Kuzu, Omer F., Nguyen, Felix D. and Sharma, Mohammad A. Noory and Arati. 2015, *Cancer Growth and Metastasis*, pp. 8(S1) 81–94.
59. *Studying cancer immunotherapy using patient-derived xenografts (PDXs) in humanized mice*. Choi Y, Lee S, Kim K, Kim SH, Chung YJ, Lee C. 2018, *Exp Mol Med*, p. 50(8):99.
60. *Creation of “Humanized” Mice to Study Human Immunity*. Todd Pearson, Dale L. Greiner, Leonard D. Shultz. 2008, *Curr Protoc Immunol*, p. 15.21.
61. *Human relevance of NRAS/BRAF mouse melanoma models*. Conde-Perez Alejandro, Lionel Larue. 2014, *European Journal of Cell Biology*, pp. 93(1-2):83-86.
62. *Malignant melanoma in transgenic mice*. M Bradl, A Klein-Szanto, S Porter, and B Mintz. 1991, *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 88(1): 164–168.
63. *Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background*. Ackermann J, Frutschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. 2005, *Cancer Res*, pp. 65(10):4005–4011.
64. *Cutaneous melanoma in genetically modified animals*. Larue, Lionel and Beermann, Friedrich. 2007, *Pigment Cell Research*, pp. 485-497.
65. *Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice*. Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, Larue L, Pritchard C, Marais R. 2009, *Cancer Cell*, pp. 15(4):294–303.
66. *Targeting BRAFV600E in an inducible murine model of melanoma*. Hooijkaas AI, Gadiot J, van der Valk M, Mooi WJ, Blank CU. 2012, *Am J Pathol*, pp. 181(3):785-94.
67. *Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma*. Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE Jr, You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M. 2009, *Nat Genet*, pp. 41(5):544–552.
68. *Mouse Cutaneous Melanoma Induced by Mutant BRAf Arises from Expansion and Dedifferentiation of Mature Pigmented Melanocytes*. Köhler C, Nittner D, Rambow F, Radaelli E, Stanchi F, Vandamme N, Baggiolini A, Sommer L, Berx G, van den Oord JJ, Gerhardt H, Blanpain C, Marine JC. 2017, *Cell Stem Cell*, pp. VOLUME 21, ISSUE 5, P679-693.E6.
69. *A novel mouse model demonstrates that oncogenic melanocyte stem cells engender melanoma resembling human disease*. Sun Q, Lee W, Mohri Y, Takeo M, Lim CH, Xu X, Myung P, Atit RP, Taketo MM, Moubarak RS, Schober M, Osman I, Gay DL, Saur D, Nishimura EK, Ito M. 2019, *Nat Commun*.
70. *Neonatal sunburn and melanoma in mice*. Noonan FP, Recio JA, Takayama H, Duray P, Anver MR, Rush WL, De Fabo EC, Merlino G. 2001, *Nature*, pp. 413(6853):271-2.
71. *Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data*. Kosuke Yoshihara, Maria Shahmoradgoli, Emmanuel Martínez, Rahulsimham Vegesna, Hoon Kim, Wandaliz Torres-Garcia, Victor Treviño, Hui Shen, Peter W. Laird, Douglas A. Levine, Scott L. Carter, Gad Getz, et al. 2013, *Nature Communications*.
72. *A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade*. Jerby-Arnon L, Shah P, Cuoco MS, Rodman C, Su MJ, Melms JC, Leeson R, Kanodia A, Mei S, Lin JR, Wang S, Rabasha B, Liu D, Zhang G, Margolais C, Ashenberg O1, Ott PA, Buchbinder EI, Haq R, Hodi FS, Boland GM, Sullivan RJ, Frederick DT et al. 2018, *Cell*, pp. 175(4):984-997.e24.
73. *Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry*. Newman Aaron M., Chloé B. Steen, Chih Long Liu, Andrew J. Gentles, Aadel A. Chaudhuri, Florian Scherer, Michael S. Khodadoust,

- Mohammad S. Esfahani, Bogdan A. Luca, David Steiner, Maximilian Diehn & Ash A. Alizadeh.** 2019, *Nature Biotechnology*, pp. 37, pages773–782.
74. *Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles.* **Newman Aaron M., Chih Long Liu, Michael R. Green, Andrew J. Gentles, Weiguo Feng, Yue Xu, Chuong D. Hoang, Maximilian Diehn, and Ash A. Alizadeh.** 2015, *Nat Methods*, pp. 12(5): 453–457.
75. *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.* **Gavin P. Dunn, Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, Robert D. Schreiber.** 2002, *Nature Immunology*, pp. 3, 991–998.
76. *Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy.* **Jake S. O'Donnell, Michele W. L. Teng, Mark J. Smyth.** 2019, *Nature review clinical oncology*, pp. 16, 151–167.
77. *Regulatory T cells in skin.* **Niwa Ali, Michael D Rosenblum.** 2017, *Immunology*, pp. 152, 373-381.
78. *Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions.* **JW, Streilein.** 1983, *J Invest Dermatol* , pp. 80:12S–16S.
79. *Skin immune sentinels in health and disease.* **Nestle Frank O, Di Meglio Paola, Qin Jian-Zhong, Nickoloff Brian J.** 2009, *Nat Rev Immunol*, pp. 9(10): 679–691.
80. *Discovery of specialized NK cell populations infiltrating human melanoma metastases.* **Lucas Ferrari de Andrade, Yuheng Lu, Adrienne Luoma, Yoshinaga Ito, Deng Pan, Jason W. Pyrdol, Charles H. Yoon, Guo-Cheng Yuan, and Kai W. Wucherpfennig.** 2019, *Journal of Clinical Investigation*, p. 5;4(23).
81. *A gene signature predicting natural killer cell infiltration and improved survival in melanoma patients.* **Joseph Cursons, Fernando Souza-Fonseca Guimaraes, Momeneh Foroutan, Ashley Anderson, Frédéric Hollande, Soroor Hediye-Zadeh, Andreas Behren, Nicholas D Huntington, Melissa J Davis.** 2019, *Cancer Immunology Research*.
82. *Innate immunity in cutaneous melanoma.* **C Mignogna, E Scali, C Camastra, I Presta, P Zeppa, T Barni, G Donato, U Bottoni, A Di Vito.** 2017, *Clinical and experimental dermatology*, pp. Volume 42, Issue 3, pages 243-250.
83. *The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin.* **Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK, Kupper TS.** 2006, *J Immunol*, pp. 176:4431–4439.
84. *Tissue-resident memory T cells and their biological characteristics in the recurrence of inflammatory skin disorders.* **Ling Chen, Zhu Shen.** 2020, *Cellular and molecular immunology*, pp. 17, 64-75.
85. *$\gamma\delta$ T Cell-Based Immunotherapy in Melanoma: State of the Art.* **F. Toia, A. B. Di Stefano, S. Meraviglia, E. Lo Presti, R. Pirrello, G. Rinaldi, F. Fulfaro, F. Dieli, and A. Cordova.** 2019, *Journal of Oncology*.
86. *The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers.* **Andrew J. Gentles, Aaron M. Newman, Chih Long Liu, Scott V. Bratman, Weiguo Feng, Dongkyoon Kim, Viswam S. Nair, Yue Xu, Amanda Khuong, Chuong D. Hoang, Maximilian Diehn, Robert B. West, Sylvia K. Plevritis, and Ash A. Alizadeh.** 2015, *Nat Med*, pp. 21(8): 938–945.
87. *Regulation of skin cell homeostasis by $\gamma\delta$ T cells.* **JM Jameson, LL Sharp, DA Witherden, WL Havran.** 2004, *Front Biosci*, p. 1:2640:51.
88. *Functions of skin resident $\gamma\delta$ T cells.* **Amanda S MacLeod, Wendy L Havran.** 2011, *Cell Mol Life Sci*, pp. 68(14):2399-2408.
89. **Murphy, Kenneth.** *Janeway's Immunobiology 8th edition.* s.l. : Garland Science, 2014.
90. *Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years After Melanoma Surgery.* **Mackie Rona M, Reid Robin, Junor Brian.** 2003, *N Engl J Med*, pp. 348 (6), 567-8.
91. *Notch signaling in lymphocyte development.* **Guidos, CJ.** 2002, *Semin Immunol*, pp. 14(6):395-404.
92. *V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity.* **Roth, David B.** 2014, *Microbiol Spectr.*
93. *Recent advances in iNKT cell development .* **Kristin Hogquist, Hristo Georgiev.** 2020, F1000Research.
94. *Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR $\alpha\beta$ thymocytes in vivo.* **K M Murphy, A B Heimberger, D Y Loh.** 1990, *Science*, pp. 250(4988):1720-3.
95. *Transforming Growth Factor-beta signaling in $\alpha\beta$ thymocytes promotes negative selection.* **Mark J. McCarron, Magali Irla, Arnaud Sergé, Saidi M'Homa Soudja, Julien C. Marie.** 2019, *Nat Commun*, p. 10: 5690.

96. *T-cell receptor diversity as a prognostic biomarker in melanoma patients.* Julie Charles, Stephane Mouret, Isabelle Challende, Marie-Therese Leccia, Florence De Fraipont, Solene Perez, Nadia Plantier, Joel Plumas, Manuarii Manuel, Laurence Chaperot, Caroline Aspod. 2020, *Pigment Cell Melanoma Res*, pp. 33(4):612-624.
97. *Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy.* Dranoff, Glenn. 2004, *Nat Rev Cancer*, pp. 4(1):11-22.
98. *The host STING pathway at the interface of cancer and immunity.* Leticia Corrales, Sarah M. McWhirter, Thomas W. Dubensky, Thomas F. Gajewski. 2016, *J Clin Invest*, pp. 126(7): 2404–2411.
99. *The STING pathway and the T cell-inflamed tumor microenvironment.* Seng-Ryong Woo, Leticia Corrales, Thomas F. Gajewski. 2015, *Trends Immunol*, pp. 36(4): 250–256.
100. *Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy.* Stefani Spranger, Daisy Dai, Brendan Horton, Thomas F. Gajewski. 2017, *Cancer Cell*, pp. 711-723.e4.
101. *Loss of new chemokine CXCL14 in tumor tissue is associated with low infiltration by dendritic cells (DC), while restoration of human CXCL14 expression in tumor cells causes attraction of DC both in vitro and in vivo.* Galina V. Shurin, Robert Ferris, Irina L. Tourkova, Lori Perez, Anna Lokshin, Levent Balkir, Bobby Collins, Gurkamal S. Chatta and Michael R. Shurin. 2005, *J Immunol*, pp. 174:5490–5498.
102. *Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance.* Nisha Nagarsheth, Max S. Wicha, and Weiping Zou. 2017, *Nat Rev Immunol*, pp. 17(9): 559–572.
103. *Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells.* Stutte S, Quast T, Gerbitzki N, Savinko T, Novak N, Reifemberger J, Homey B, Kolanus W, Alenius H, Förster I. 2010, *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 107(19):8736-41.
104. *Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells.* Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, Allan RS, Wojtasiak M, Shortman K, Carbone FR, Brooks AG, Heath WR. 2009, *Nat Immunol*, pp. 10:488-495.
105. *Cross-presentation of cutaneous melanoma antigen by migratory XCR1+CD103- and XCR1+CD103+ dendritic cells.* Ben Wylie, Elke Seppanen, Kun Xiao, Rachael Zemek, Damien Zanker, Sandro Prato, Bree Foley, Prue H Hart, Richard A Kroczeck, Weisan Chen, and Jason Waithman. 2015, *Oncoimmunology*, p. 4(8): e1019198.
106. *Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 α + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity.* Kai Hildner, Brian T. Edelson, Whitney E. Purtha, Mark Diamond, Hirokazu Matsushita, Masako Kohyama, Boris Calderon, Barbara Schraml, Emil R. Unanue, Michael S. Diamond, Robert D. Schreiber, Theresa L. Murphy, Kenneth M. Murphy. 2008, *Science*, pp. 322(5904): 1097–1100.
107. *Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells .* Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, Gajewski TF. 2011, *J Exp Med*, pp. 208:2005–2016.
108. *Functions of Murine Dendritic Cells.* Vivek Durai, Kenneth M. Murphy. 2016, *Immunity Review*.
109. *Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily.* Leslie Summers deLuca, Jennifer L. Gommerman. 2012, *Nature reviews Immunology*, pp. 12,339-351.
110. *Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment.* Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, McKee M, Gajewski TF. 2009, *Cancer Research*, pp. 69(7):3077-85.
111. *CXCR3 in T cell function.* Joanna R. Groom, Andrew D. Luster. 2011, *Exp Cell Res*, pp. 317(5): 620–631.
112. *CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer therapy.* Ryuma Tokunaga, Wu Zhang, Madiha Naseem, Alberto Puccini, Martin D Berger, Shivani Soni, Michelle McSkane, Hideo Baba, Heinz-Josef Lenz. 2018, *Cancer Treatment Review*, pp. 40-47.
113. *Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity.* Spranger S, Bao R, Gajewski TF. 2015, *Nature*, pp. 523:231–35.
114. *Chemoattractant Receptors BLT1 and CXCR3 Regulate Antitumor Immunity by Facilitating CD8+ T Cell Migration into Tumors.* Chheda ZS, Sharma RK, Jala VR, Luster AD, Haribabu B. 2016, *J Immuno*, pp. 197:2016–2026.
115. *Cooperation between Constitutive and Inducible Chemokines Enables T Cell Engraftment and Immune Attack in Solid Tumors.* Denarda Dangaj, Marine Bruand, Alizée J. Grimm, ..., Sylvie Rusakiewicz, Mauro Delorenzi, George Coukos. 2019, *Cancer Cell*, pp. 35(6):885-900.e10.

116. *Somatic FAS mutations are common in patients with genetically undefined autoimmune lymphoproliferative syndrome.* Dowdell KC, Niemela JE, Price S, Davis J, Hornung RL, Oliveira JB, Puck JM, Jaffe ES, Pittaluga S, Cohen JI, Fleisher TA, Rao VK. 2010, *Blood*, pp. 115(25):5164-9.
117. *Cancer Immunotherapy Targets Based on Understanding the T Cell-Inflamed Versus Non-T Cell-Inflamed Tumor Microenvironment.* Gajewski Thomas F, Corrales Leticia, Williams Jason, Horton Brendan, Sivan Ayelet, Spranger Stefani. 2017, *Adv Exp Med Biol*, pp. 1036: 19–31.
118. *The features of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome.* Pauline Girard, Julie Charles, Camille Cluzel, Emmanuelle Degeorges, Olivier Manches, Joel Plumas, Florence De Fraipont, Marie-Therese Leccia, Stephane Mouret, Laurence Chaperot, Caroline Aspod. 2019, *Oncoimmunology*, p. 8(8):1601483.
119. *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.* Pardoll, Drew M. 2012, *Nat Rev Cancer*, pp. 12(4): 252–264.
120. *CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction.* Rudd CE, Taylor A, Schneider H. 2009, *Immunol. Rev.*, pp. 229:12–26.
121. *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection.* Barber D, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. 2006, *Nature*, pp. 439(7077):682-7.
122. *The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells.* Xin Yu, Kristin Harden, Lino C Gonzalez, Michelle Francesco, Eugene Chiang, Bryan Irving, Irene Tom, Sinisa Ivelja, Canio J Refino, Hilary Clark, Dan Eaton, Jane L Grogan. 2009, *Nat Immunol*, pp. 10(1):48-57.
123. *TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle.* Nicholas A. Manieri, Eugene Y. Chiang, Jane L. Grogan. 2016, *Cell*, pp. 20-28.
124. *Deficiency of host CD96 and PD-1 or TIGIT enhances tumor immunity without significantly compromising immune homeostasis.* Harjunpää H, Blake SJ, Ahern E, Allen S, Liu J, Yan J, Lutzky V, Takeda K, Aguilera AR, Guillerey C, Mittal D, Li XY, Dougall WC, Smyth MJ, Teng MWL. 2018, *Oncoimmunology*, p. 7(7):e1445949.
125. *LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4.* Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, Hercend T. 1990, *J Exp Med*, pp. 171(5):1393-405.
126. *Efficacy of BMS-986016, a monoclonal antibody that targets lymphocyte activation gene-3 (LAG-3), in combination with nivolumab in pts with melanoma who progressed during prior anti-PD-1/PD-L1 therapy in all-comer and biomarker-enriched populations.* Ascierto P.A., Bono P., Bhatia S., Melero I., Nyakas M.S., Svane I.-M., Larkin J., Gomez-Roca C., Schadendorf D., Dummer R., et al. 2017, *Ann Oncol*.
127. *New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of TIM3.* Alex Friedlaender, Alfredo Addeo, and Giuseppe Banna. 2019, *ESMO open*, p. 4(Suppl 3): e000497.
128. *CD160 activation by herpesvirus entry mediator augments inflammatory cytokine production and cytolytic function by NK cells.* Šedý JR, Bjordahl RL, Bekiaris V, Macauley MG, Ware BC, Norris PS, Lurain NS, Benedict CA, Ware CF. 2013, *J Immunol*, pp. 191(2):828-36.
129. *M7824, a novel bifunctional anti-PD-L1/TGF β Trap fusion protein, promotes anti-tumor efficacy as monotherapy and in combination with vaccine.* Karin M. Knudson, Kristin C. Hicks, Xiaoling Luo, Jin-Qiu Chen, Jeffrey Schlom, Sofia R. Gameiro. 2018, *Oncoimmunology*, p. 7(5): e1426519.
130. *Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma.* Sade-Feldman M, Yizhak K, Bjorgaard SL, Ray JP, de Boer CG, Jenkins RW, Lieb DJ, Chen JH, Frederick DT, Barzily-Rokni M, Freeman SS, Reuben A, Hoover PJ, Villani AC, Ivanova E, Portell A, Lizotte PH, Aref AR, Eliane JP, Hammond MR, ..., Nir Hacohen. 2018, *Cell*, pp. 175(4):998-1013.
131. *Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma.* Hanjie Li, Anne M. van der Leun, Ido Yofe, Yaniv Lubling, ..., Ton N. Schumacher, Amos Tanay, Ido Amit. 2019, *Cell*, pp. 176, 775–789.

132. *Mutational Landscape and Sensitivity to Immune Checkpoint Blockers*. Roman M. Chabanon, Marion Pedrero, Céline Lefebvre, Aurélien Marabelle, Jean-Charles Soria, Sophie Postel-Vinay. 2016, *Clinical Cancer Research*, pp. 22(17): 4309-4321.
133. *Natural Killer Cell Recognition of Melanoma: New Clues for a More Effective Immunotherapy*. Raquel Tarazona, Esther Duran, Rafael Solana. 2015, *Front Immunol*, p. 6:649.
134. *Proteasomes in immune cells: more than peptide producers?* Groettrup M, Kirk CJ, Basler M. 2010, *Nat Rev Immunol*, pp. 10(1):73-8.
135. *Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy*. Padmanee Sharma, Siwen Hu-Lieskovan, Jennifer A. Wargo, and Antoni Ribas. 2017, *Cell*, pp. 168,707-723.
136. *HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank*. Mendez R, Aptsiauri N, Del Campo A, Maleno I, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F, Garcia-Lora A. 2009, *Cancer Immunol Immunother*, pp. 58(9):1507-15.
137. *Well-Defined Melanoma Antigens as Progression Markers for Melanoma: Insights into Differential Expression and Host Response Based on Stage*. Hodi, F. Stephen. 2006, *Clinical Cancer Research*, pp. 12(3):673-678.
138. *Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules*. Guillaume B, Chapiro J, Stroobant V, Colau D, Van Holle B, Parvizi G, Bousquet-Dubouch MP, Théate I, Parmentier N, Van den Eynde BJ. 2010, *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 107(43):18599-604.
139. *Immunoproteasome expression is associated with better prognosis and response to checkpoint therapies in melanoma*. Shelly Kalaora, Joo Sang Lee, Eilon Barnea, Ronen Levy, Polina Greenberg, Michal Alon, Gal Yagel, Gitit Bar Eli, Roni Oren, Aviyah Peri, Sushant Patkar, Lital Bitton, Steven A Rosenberg, Michal Lotem, Yishai Levin, Arie Admon, Eytan Ruppim, Yardena Samuel. 2020, *Nature Communications*, p. 11:896.
140. *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Bousiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. 2001, *Nat Immunol*, pp. 2(3):261-8.
141. *Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint*. Chong Sun, Riccardo Mezzadra, Ton N. Schumacher. 2018, *Immunity*, pp. 48:434-452.
142. *PD-L1 Is Upregulated by Simultaneous Amplification of the PD-L1 and JAK2 Genes in Non-Small Cell Lung Cancer*. Seiichi Ikeda, Tatsuro Okamoto, Shinji Okano, Yuichiro Umemoto, Tetsuzo Tagawa, Yosuke Morodomi, Mikihiro Kohno, Shinichiro Shimamatsu, Hirokazu Kitahara, Yuzo Suzuki, Takatoshi Fujishita, Yoshihiko Maehara. 2016, *Journal of Thoracic Oncology*, pp. 11(1):62-71.
143. *The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition*. Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. 2013, *Clin Cancer Res*, pp. 19:598-609.
144. *Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression*. Angel Garcia-Diaz, Daniel Sanghoon Shin, Blanca Homet Moreno, Justin Saco, Helena Escuin-Ordinas, Gabriel Abril Rodriguez, Jesse M.Zaretsky, Lu Sun, Willy Hugo, Xiaoyan Wang,...,Roger S.Lo, Antoni Ribas. 2017, *Cell Reports*, pp. 19(6): 1189-1201.
145. *MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1*. Stephanie C. Casey, Ling Tong, Yulin Li, Rachel Do, Susanne Walz, Kelly N. Fitzgerald, Arvin M. Gouw, Virginie Baylot, Ines Gütgemann, Martin Eilers, Dean W. Felsher. 2016, *Science*, pp. 352(6282):227-231.
146. *A Mechanism of Hypoxia-Mediated Escape from Adaptive Immunity in Cancer Cells*. Ivraym B. Barsoum, Chelsea A. Smallwood, D. Robert Siemens, Charles H. Graham. 2014, *Cancer Research*, pp. 74(3):665-674.
147. *Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma*. Atefi M, Avramis E, Lassen A, Wong DJ, Robert L, Foulad D, Cerniglia M, Titz B, Chodon T, Graeber TG, Comin-Anduix B, Ribas A. 2014, *Clin. Cancer Res.*, pp. 20:3446-3457.

148. *Une étude préliminaire à partir de la lignée de mélanome A375 suggère que l'expression de PD-L1 est associée à un phénotype invasif. Deux populations PD-L1+ et PD-L1- ont été stabilisées en culture à partir de la lignée de mélanome A375 puis caractérisées.* **Valentina Audrito, Sara Serra, Aureliano Stingi, Francesca Orso, Federica Gaudino, Cinzia Bologna, Francesco Neri, Giulia Garaffo, Romina Nassini, Gianna Baroni, Eliana Rulli, Daniela Massi, Salvatore Oliviero, ..., Silvia Deaglio.** 2017, *Oncotarget*, pp. 8:15894-15911.
149. *CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity.* **Marian L. Burr, Christina E. Sparbier, Yih-Chih Chan, James C. Williamson, Katherine Woods, Paul A. Beavis, Enid Y. N. Lam, Melissa A. Henderson, Charles C. Bell, ..., Paul J. Lehner, Mark A. Dawson.** 2017, *Nature*, pp. 549, 101–105.
150. *Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5.* **Seung-Oe Lim, Chia-Wei Li, Weiya Xia, Jong-Ho Cha, Li-Chuan Chan, Yun Wu, Shih-Shin Chang, Wan-Chi Lin, Jung-Mao Hsu, Yi-Hsin Hsu, Taewan Kim, Wei-Chao Chang, Jennifer L.Hsu, Hirohito Yamaguchi, Qingqing Ding, Yan Wang, Yi Yang, ..., Mien-Chie Hung.** 2016, *Cancer Cell*, pp. 30(6):925-939.
151. *Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance.* **Zhang J, Bu X, Wang H, Zhu Y, Geng Y, Nihira NT, Tan Y, Ci Y, Wu F, Dai X, Guo J, Huang YH, Fan C, Ren S, Sun Y, Freeman GJ, Sicinski P, Wei W.** 2018, *Nature*, pp. 553(7686):91-95.
152. *T cells in the human metastatic melanoma microenvironment express site-specific homing receptors and retention integrins.* **Salerno EP, Olson WC, Mcskimming C, Shea S, Slingluff CL Jr.** 2014, *Int J Cancer*, pp. 134:563–74.
153. *A potential immune escape mechanism by melanoma cells through the activation of chemokine-induced T cell death.* **Mellado M, de Ana AM, Moreno MC, Martínez C, Rodríguez-Frade JM.** 2001, *Current Biology*, pp. 11(9):691-6.
154. *Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth.* **Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, Cerwenka A.** 2012, *J Immunol*, pp. 189(12):5602-11.
155. *CCR5+ Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Enriched and Activated in Melanoma Lesions.* **Blattner C, Fleming V, Weber R, Himmelhan B, Altevogt P, Gebhardt C, Schulze TJ, Razon H, Hawila E, Wildbaum G, Utikal J, Karin N, Umansky V.** 2018, *Cancer Research*, pp. 78(1):157-167.
156. *Blockade of CCR5-mediated myeloid derived suppressor cell accumulation enhances anti-PD1 efficacy in gastric cancer.* **Yang L, Wang B, Qin J, Zhou H, Majumdar APN, Peng F.** 2018, *Immunopharmacol Immunotoxicol*, pp. 40(1):91-97.
157. *TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells.* **Julien C. Marie, John J. Letterio, Marc Gavin, Alexander Y. Rudensky.** 2005, *J Exp Med*, pp. 201(7): 1061–1067.
158. *Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma.* **Vence L, Palucka AK, Fay JW, Ito T, Liu YJ, Banchereau J, Ueno H.** 2007, *Proc Natl Acad Sci*, pp. 104(52):20884-9.
159. *Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg.* **Andrea Facciabene, Xiaohui Peng, Ian S. Hagemann, Klara Balint, Andrea Barchetti, Li-Ping Wang, Phyllis A. Gimotty, C. Blake Gilks, Priti Lal, Lin Zhang, George Coukos.** 2011, *Nature*, pp. 475:226–230.
160. *Oncogenic BRAFV600E governs regulatory T-cell recruitment during melanoma tumorigenesis.* **Tamer B Shabaneh, Aleksey K Molodtsov, Shannon M Steinberg, Peisheng Zhang, Gretel M Torres, Gadisti A Mohamed, Andrea Boni, Tyler J Curiel, Christina V Angeles, Mary Jo Turk.** 2018, *Cancer Res*, pp. 78 (17), 5038-5049.
161. *Upregulation of PD-L1, IDO and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells.* **Spranger S., Spaapen R., Zha Y., Williams J., Meng Y., Ha TT., Gajewski TF.** 2013, *Sci Transl Med*, p. 5(200):200ra116.
162. *Understanding Local Macrophage Phenotypes In Disease: Shape-shifting macrophages.* **Taylor, Kate Liddiard and Philip R.** 2015, *Nature Medicine*, pp. 21,119-120.
163. *TAMeless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis.* **Zaidi, Shweta Aras and M Raza.** 2017, *British Journal of Cancer*, pp. 117, 1583–1591.

164. *Downregulation of sphingosine kinase-1 induces protective tumor immunity by promoting M1 macrophage response in melanoma.* **Mrad M, Imbert C, Garcia V, Rambow F, Therville N, Carpentier S, Ségui B, Levade T, Azar R, Marine JC, et al.** 2016, *Oncotarget*, pp. 7: 71873-71886.
165. *Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Signaling Regulates Macrophage Proliferation and Activation.* **Hartley GP, Chow L, Ammons DT, Wheat WH, Dow SW.** 2018, *Cancer Immunol Res*, pp. (10):1260-1273.
166. *PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity.* **Sydney R. Gordon, Roy L. Maute, Ben W. Dulken, Gregor Hutter, Benson M. George, Melissa N. McCracken, Rohit Gupta, Jonathan M. Tsai, Rahul Sinha, Daniel Corey, Aaron M. Ring, Andrew J. Connolly & Irving L. Weissman.** 2017, *Nature*, pp. 545, 495–499.
167. *Gene signature in melanoma associated with clinical activity: a potential clue to unlock cancer immunotherapy.* **Gajewski TF, Louahed J, Brichard VG.** 2010, *Cancer J*, pp. 16(4):399-403.
168. *Mecanism of tumor cell-intrinsic immune evasion.* **Spranger S, Gajewski TF.** 2017, *Annual Review of Cancer Biology*, pp. 2:213-228.
169. *Peripheral Blood TCR Repertoire Profiling May Facilitate Patient Stratification for Immunotherapy against Melanoma.* **S A. Hogan, A Courtier, P F. Cheng, N F. Jaberg-Bentele, S M. Goldinger, M Manuel, S Perez, N Plantier, JF Mouret, T DL Nguyen-Kim, M I.G. Raaijmakers, P Kvistborg, N Pasqual, R Dummer and M P. Levesque.** 2019, *Cancer Immunology Research*, pp. 7(1):77-85.
170. *CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis.* **van der Leun Anne M, Thommen Daniela S, Schumacher Ton N.** 2020, *Nature Review Cancer*, pp. 20,218-232.
171. *Targeted Next Generation Sequencing Identifies Markers of Response to PD-1 Blockade.* **Johnson DB, Frampton GM, Rieth MJ, Yusko E, Xu Y, Guo X, Ennis RC, Fabrizio D, Chalmers ZR, Greenbowe J, Ali SM, Balasubramanian S, Sun JX, He Y, Frederick DT, Puzanov I, Balko JM, Cates JM, Ross JS, Sanders C, ..., Sosman JA, Lovly CM.** 2016, *Cancer Immunol Res*, pp. 4(11):959-967.
172. *Modulation of the immune microenvironment by tumor-intrinsic oncogenic signaling.* **Kim Bich Nguyen, Stefani Spranger.** 2020, *Journal of Cell Biology*, p. 219 (1): e201908224.
173. *PAK4 inhibition improves PD-1 blockade.* **Gabriel Abril-Rodriguez, Davis Y. Torrejon, Wei Liu, Jesse M. Zaretsky, Theodore S. Nowicki, ..., Catherine S. Grasso and Antoni Ribas.** 2020, *Nature cancer*, pp. 46-58.
174. *Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated.* **PengW, Chen JQ, Liu C, Malu S, Creasy C et al.** 2016, *Cancer Discov*, pp. 6:202–16.
175. *CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity.* **Shom Goel, Molly J. DeCristo, April C. Watt, Haley BrinJones, Jaclyn Sceneay, Ben B. Li, Naveed Khan, Jessalyn M. Ubellacker, Shaozhen Xie, Otto Metzger-Filho, Jeremy Hoog, Matthew J. Ellis, Cynthia X. Ma, ..., Sandra S. McAllister, Jean J. Zhao.** 2017, *Nature*, pp. 548, 471–475.
176. *CDK4/6 inhibition augments antitumor immunity by enhancing T-cell activation.* **Deng J, Wang ES, Jenkins RW, Li S, Dries R, Yates K, Chhabra S, Huang W, ..., Barbie DA, Gray NS, Wong KK.** 2018, *Cancer Discovery*, pp. 8, 216-233.
177. *The BRAF–MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells.* **Hidetoshi Sumimoto, Fumie Imabayashi, Tomoko Iwata, Yutaka Kawakami.** 2006, *J Exp Med*, pp. 203(7): 1651–1656.
178. *BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma.* **Dennie Tompers Frederick, Adriano Piris, Alexandria P. Cogdill, Zachary A. Cooper, Cecilia Lezcano, Cristina R. Ferrone, Devarati Mitra, Andrea Boni, Lindsay P. Newton, Chengwen Liu, Weiyi Peng, ..., David E. Fisher, Jennifer A. Wargo.** 2013, *Clin Cancer Res*, pp. 19(5): 1225–1231.
179. *Vemurafenib enhances MHC induction in BRAFV600E homozygous melanoma cells.* **Bishu Sapkota, Charles E. Hill, Brian P. Pollack.** 2013, *Oncoimmunology*, p. 2(1): e22890.
180. *Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade.* **Anusha Kalbasi, Antoni Ribas.** 2020, *Nature review*, pp. 20:25-39.

181. *Tumor cell oxidative metabolism as a barrier to PD-1 blockade immunotherapy in melanoma.* Yana G. Najjar, Ashley V. Menk, Cindy Sander, Uma Rao, Arivarasan Karunamurthy, Roma Bhatia, Shuyan Zhai, John M. Kirkwood, Greg M. Delgoffe. 2019, *Journal of Clinical Investigation Insight*, p. 4(5):e124989.
182. *Resistance of melanoma to immune checkpoint inhibitors is overcome by targeting the sphingosine kinase-1.* Caroline Imbert, Anne Montfort, Marine Fraisse, Elie Marcheteau, Julia Gilhodes, Elodie Martin, Florie Bertrand, Marlène Marcellin, Odile Burlet-Schiltz, Anne Gonzalez de Peredo, Virginie Garcia, ..., Nathalie Andrieu-Abadie, Céline Colacios. 2020, *Nature communications*, p. 11:437.
183. *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells.* Greenburg G, Hay ED. 1982, *J Cell Biol*, pp. 95(1): 333–339.
184. *Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease.* Hervé Acloque, Meghan S. Adams, Katherine Fishwick, Marianne Bronner-Fraser, M. Angela Nieto. 2009, *J Clin Invest*, pp. 119(6): 1438–1449.
185. *EMT: 2016.* Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. 2016, *Cell*, pp. 166,21-45.
186. *The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer.* Tam WL, Weinberg RA. 2013, *Nat Med*, pp. 19, 1438–1449.
187. *Identification of the tumour transition states occurring during EMT.* Ievgenia Pastushenko, Audrey Brisebarre, Alejandro Sifrim, Marco Fioramonti, ..., Isabelle Salmon, Jean-Christophe Marine, Thierry Voet, Panagiota A Sotiropoulou, Cédric Blanpain. 2018, *Nature*, pp. 556(7702):463-468.
188. *Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition.* David M Gonzalez, Damian Medici. 2014, *Science Sig*, p. 7(344):re8.
189. *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition.* Samy Lamouille, Jian Xu, Rik Derynck. 2014, *Nat Rev Mol Cell Biol*, pp. 15(3):178-96.
190. *Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition.* Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY. 2014, *Curr. Opin. Cell Biol.*, pp. 31, 56–66.
191. *Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition: focusing on hypoxia and TGF- β signaling.* Yueh-Te Lin, Kou-Juey Wu. 2020, *Journal of Biomedical Science*, pp. 27-39.
192. *Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells.* Marta Santisteban, Jennifer M. Reiman, Michael K. Asiedu, Marshall D. Behrens, Aziza Nassar, Kimberly R. Kalli, Paul Haluska, James N. Ingle, Lynn C. Hartmann, Masoud H. Manjili, Derek C. Radisky, Soldano Ferrone, Keith L. Knutson. s.l. : *Cancer Res*, 2009, Vols. 69(7): 2887–2895.
193. *Permissive State of EMT: The Role of Immune Cell Compartment.* Vita Fedele, Davide Melisi. 587, s.l. : *Front Oncol*, 2020, Vol. 10.
194. *Role of Hypoxic Stress in Regulating Tumor Immunogenicity, Resistance and Plasticity.* Stéphane Terry, Rania Faouzi Zaarour, Goutham Hassan Venkatesh, Amirtharaj Francis, Walid El-Sayed, Stéphanie Buart, Pamela Bravo, Jérôme Thiery, Salem Chouaib. 2018, *Int J Mol Sci*, p. 19(10): 3044.
195. *Acquisition of tumor cell phenotypic diversity along the EMT spectrum under hypoxic pressure: Consequences on susceptibility to cell-mediated cytotoxicity.* Terry S., Buart S., Tan T.Z., Gros G., Noman M.Z., Lorens J.B., Mami-Chouaib F., Thiery J.P., Chouaib S. 2017, *Oncol Immunology*, p. 6:e1271858.
196. *EMT is controlled by four major interconnected regulatory networks. Proteins involved in transcriptional.* Bram De Craene, Geert Berx. 2013, *Nature reviews cancer*, pp. 13(2):97-110.
197. *Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression.* Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. 2000, *J Biol Chem*, pp. 275, 2727-2732.
198. *Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex.* Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. 2004, *Mol Cell Biol*, pp. 24,306-149.

199. *SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis.* **V Byles, L Zhu, J D Lovaas, L K Chmielewski, J Wang, D V Faller, Y Dai.** 2012, *Oncogene*, pp. 31(43):4619-4629.
200. *miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions.* **Helge Siemens, Rene Jackstadt, Sabine Hüntten, Markus Kaller, Antje Menssen, Ursula Götz, Heiko Hermeking.** 2011, *Cell Cycle*, pp. 10(24):4256-4271.
201. *The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1.* **Philip A Gregory, Andrew G Bert, Emily L Paterson, Simon C Barry, Anna Tsykin, Gelareh Farshid, Mathew A Vadas, Yeeseom Khew-Goodall, Gregory J Goodall.** 2005, *Nat Cell Biol*, pp. 10(5):593-601.
202. *A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells.* **Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T.** 2008, *EMBO Rep*, pp. 9:582-589.
203. *An ESRP-regulated splicing programme is abrogated during the epithelial-mesenchymal transition.* **Claude C Warzecha, Peng Jiang, Karine Amirikian, Kimberly A Dittmar, Hezhe Lu, Shihao Shen, Wei Guo, Yi Xing, Russ P Carstens.** 2010, *EMBO J*, pp. 29(19):3286-300.
204. *A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastatic disease.* **Masahiro Yanagisawa, Deborah Huvelde, Pamela Kreinest, Christine M. Lohse, John C. Cheville, Alexander S. Parker, John A. Copland, Panos Z. Anastasiadis.** 2008, *J Chem Biol*, pp. 283(26): 18344–18354.
205. *TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP.* **K Horiguchi, K Sakamoto, D Koinuma, K Semba, A Inoue, S Inoue, H Fujii, A Yamaguchi, K Miyazawa, K Miyazono, M Saitoh.** 2012, *Oncogene*, pp. 31, 3190–3201.
206. *Snail represses the splicing regulator epithelial splicing regulatory protein 1 to promote epithelial–mesenchymal transition.* **Lauren M Reinke, Yilin Xu, Chonghui Cheng.** 2012, *J Biol Chem*, pp. 287, 36435–36442.
207. *An EMT-driven alternative splicing Program Occurs in Human Breast Cancer and Modulates Cellular Phenotype.* **Irina M. Shapiro, Albert W. Cheng, Nicholas C. Flytzanis, Michele Balsamo, John S. Condeelis, Maja H. Oktay, Christopher B. Burge, Frank B. Gertler.** 2011, *Plos One Genet*, p. 7(8): e1002218.
208. *Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition.* **Valentina Evdokimova, Cristina Tognon, Tony Ng, Peter Ruzanov, Natalya Melnyk, Dieter Fink, Alexey Sorokin, Lev P Ovchinnikov, Elai Davicioni, Timothy J Triche, Poul H B Sorensen.** 2009, *Cancer Cell*, pp. 15(5):402-415.
209. *The F-box protein Ppa is a common regulator of core EMT factors Twist, Snail, Slug, and Sip1.* **Rachel Lander, Kara Nordin, Carole LaBonne.** 2011, *J Cell Biol*, pp. 194(1): 17–25.
210. *Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions.* **Zhibo Yang, Suresh Rayala, Diep Nguyen, Ratna K Vadlamudi, Shiuan Chen, Rakesh Kumar.** 2005, *Cancer Res*, pp. 65(8):3179-84.
211. *Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail.* **Cheng Du, Chuanyou Zhang, Sazzad Hassan, Md Helal Uddin Biswas, K C Balaji.** 2010, *Cancer Res*, pp. 70(20): 7810–7819.
212. *Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin.* **Long J, Zuo D, Park M.** 2005, *J Biol Chem*, pp. 280, 35477–35489.
213. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity.* **Nicolas Skrypek, Steven Goossens, Eva De Smedt, Niels Vandamme, Geert Berx.** *Trends Genet*, 2017, pp. 33(12):943-959.
214. *Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression.* **Williams TM, Moolten D, Burlein J, Romano J, Bhaerman R, Godillot A, Mellon M, Rauscher FJD, Kant JA.** 1991, *Science*, p. 254(5039):1791.
215. *Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis.* **Funahashi J, Sekido R, Murai K, Kamachi Y, Kondoh H.** 1993, *Development*, pp. 119(2):433–446.

216. *Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors*. **Alexander Gheldof, Paco Hulpiau, Frans Van Roy, Bram De Craene, Geert Berx**. 2012, Cellular and Molecular Life Sciences, pp. volume 69, pages2527–2541.
217. *Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer*. **Genetta T, Ruezinsky D, Kadesch T**. 1994, Mol Cell Biol, pp. 14(9):6153–6163.
218. *SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes*. **Verschueren K, Remacle JE, Collart C, Kraft H, Baker BS, Tylzanowski P, Nelles L, Wuytens G, Su MT, Bodmer R**. 1999, J Biol Chem, p. 274(29):20489.
219. *ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types*. **Waltraut Lehmann, Dirk Mossmann, Julia Kleemann, Kerstin Mock, Chris Meisinger, Tilman Brummer, Ricarda Herr, Simone Brabletz, Marc P Stemmler, Thomas Brabletz**. 2016, Nat Commun, p. 15;7:10498.
220. *The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease*. **C Vandewalle, F Van Roy, G Berx**. 2009, Cell Mol Life Science, pp. 66(5):773-87.
221. *Generation of the floxed allele of the SIP1 (Smad-interacting protein 1) gene for Cre-mediated conditional knockout in the mouse*. **Higashi Y., Maruhashi M., Nelles L., Van de Putte T., Verschueren K., Miyoshi T., Yoshimoto A., Kondoh H., Huylebroeck D**. 2002, Genesis, pp. 32:82–84.
222. *deltaEF1, a zinc finger and homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multiple lineages*. **Takagi T, Moribe H, Kondoh H, Higashi Y**. 1998, Development, pp. 125:21–31.
223. *Complementary expression pattern of Zfhx1 genes Sip1 and deltaEF1 in the mouse embryo and their genetic interaction revealed by compound mutants*. **Miyoshi T, Mitsuji Maruhashi, Tom Van De Putte, Hisato Kondoh, Danny Huylebroeck, Yujiro Higashi**. 2006, Dev Dyn, pp. 235(7):1941-52.
224. *Non-redundant functions of EMT transcription factors*. **Marc P Stemmler, Rebecca L Eccles, Simone Brabletz, Thomas Brabletz**. 2019, Nat Cell Biol, pp. 21, 102-112.
225. *Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway*. **Postigo, Antonio A**. 2003, EMBO J, pp. 22:2443–2452.
226. *ZEB1, ZEB2, and the miR-200 family form a counterregulatory network to regulate CD8+ T cell fates*. **Tianxia Guan, Dominguez Claudia X, Robert A Amezcua, Brian J Laidlaw, Jijun Cheng, Jorge Henao-Mejia, Adam Williams, Richard A Flavell, Jun Lu, Susan M Kaech**. 2018, J Exp Med, pp. 215(4):1153-1168.
227. *Terminal NK cell maturation is controlled by concerted actions of T-bet and Zeb2 and is essential for melanoma rejection*. **Mary J van Helden, Steven Goossens, Cécile Daussy, Anne-Laure Mathieu, Fabrice Faure, Antoine Marçais, Niels Vandamme, Natalie Farla, Katia Mayol, Sébastien Viel, ..., Geert Berx, Thierry Walzer**. 2015, J Exp Med, pp. 212(12):2015-25.
228. *Zeb1 represses TCR signaling, promotes the proliferation of T cell progenitors and is essential for NK1.1 + T cell development*. **Jiang Zhang, Mélanie Wencker, Quentin Marliac, Aurore Berton, Uzma Hasan, Raphaël Schneider, Daphné Laubretton, Dylan E Cherrier, Anne-Laure Mathieu, Amaury Rey, Wenzheng Jiang, Julie Caramel, ...Thierry Walzer**. 2020, Cell Mol Immunol.
229. *ZEBs: Novel Players in Immune Cell Development and Function*. **Charlotte L.Scott, Kyla D.Omilusik**. 2019, Trends in Immunology, pp. 40(5):431-446.
230. *The snail gene required for mesoderm formation in Drosophila is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers*. **Alberga A, Boulay JL, Kempe E, Dennefeld C, Haenlin M**. 1991, Development, pp. 111(4):983-92.
231. *The Drosophila developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers*. **Boulay J. L., Dennefeld C., Alberga A**. 1987, Nature, pp. 330,395 -398.
232. *EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness*. **Ester Sánchez-Tilló, Yongqing Liu, Oriol de Barrios, Laura Siles, Lucia Fanlo, Miriam Cuatrecasas, Douglas S. Darling, Douglas C. Dean, Antoni Castells, Antonio Postigo**. 2012, Cellular and Molecular Life Sciences, pp. 69, 3429–3456.

233. *Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells.* **Xin Ye, Wai Leong Tam, Tsukasa Shibue, Yasemin Kaygusuz, Ferenc Reinhardt, Elinor Ng Eaton, Robert A Weinberg.** 2015, *Nature*, pp. 525(7568):256-60.
234. *Beyond epithelial to mesenchymal transition: a novel role for the transcription factor Snail in inflammation and wound healing.* **Hotz B, Visekruna A, Buhr HJ, Hotz HG.** 2010, *J Gastrointest Surg*, pp. 14(2):388-97.
235. *Expression of Snail protein in tumor-stroma interface.* **C Francí, M Takkunen, N Dave, F Alameda, S Gómez, R Rodríguez, M Escrivà, B Montserrat-Sentís, T Baró, M Garrido, F Bonilla, I Virtanen, A García de Herreros.** 2006, *Oncogene*, pp. 25:5134–5144.
236. *Deletion of the SLUG (SNAI2) gene results in human piebaldism.* **Manuel Sánchez-Martín, Jesús Pérez-Losada, Arancha Rodríguez-García, Belén González-Sánchez, Bruce R Korf, W Kuster, Celia Moss, Richard A Spritz, I Sánchez-García.** 2003, *Am J Med Genet A*, pp. 122A(2):125-32.
237. *The twist gene: isolation of a Drosophila zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern.* **B Thisse, M el Messal, F Perrin-Schmitt.** 1987, *Nucleic Acids Research*, pp. 15:3439–3453.
238. *The Heterodimeric TWIST1-E12 Complex Drives the Oncogenic Potential of TWIST1 in Human Mammary Epithelial Cells.* **Laurent Jacquaroud, Charlotte Bouard, Geoffrey Richard, Léa Payen, Mojgan Devouassoux-Shisheboran, Douglas B. Spicer, Julie Caramel, Guillaume Collin, ..., Stéphane Ansieau.** 2016, *Neoplasia*, pp. 18(5): 317–327.
239. *Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity.* **Drazen Šošić, James A Richardson, Kai Yu, David M Ornitz, Eric N Olson.** 2003, *Cell*, pp. 112(2):169-80.
240. *twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis.* **Chen ZF, Behringer RR.** 1995, *Genes & Development*, pp. 9:686–699.
241. *The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome.* **Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Danse JM, Bloch-Zupan A, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F.** 1998, *Hum Mol Genet*, pp. 7(6):945–957.
242. *The clonal evolution of tumor cell populations.* **Nowel, PC.** 1976, *Science*, pp. 194(4260):23-8.
243. *The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression.* **Amparo Cano, Mirna A. Pérez-Moreno, Isabel Rodrigo, Annamaria Locascio, María J. Blanco, Marta G. del Barrio, Francisco Portillo, M. Angela Nieto.** 2000, *Nat Cell Biol*, pp. 2,76-83.
244. *Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment.* **Thomas Brabletz, Andreas Jung, Simone Reu, Marc Porzner, Falk Hlubek, Leoni A. Kunz-Schughart, Ruth Knuechel, Thomas Kirchner.** 2001, *PNAS*, pp. 98 (18):10356-10361.
245. *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.* **Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA.** 2004, *Cell*, pp. 117(7):927-39.
246. *Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer.* **Anthony J Trimboli, Koichi Fukino, Alain de Bruin, Guo Wei, Lei Shen, Stephan M Tanner, Nicholas Creasap, Thomas J Rosol, Michael L Robinson, Charis Eng, Michael C Ostrowski, Gustavo Leone.** 2008, *Cancer Res*, pp. 68(3):937-45.
247. *Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression.* **Don L. Gibbons, Wei Lin, Chad J. Creighton, Zain H. Rizvi, Philip A. Gregory, Gregory J. Goodall, Nishan Thilaganathan, Liqin Du, Yiqun Zhang, Alexander Pertsemidid, Jonathan M. Kurie.** 2009, *Genes Dev*, pp. 23(18): 2140–2151.
248. *The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer.* **Krebs AM, Mitschke J, Laserra Losada M, Schmalhofer O, Boerries M, Busch H, Boettcher M, Mougiakakos D, Reichardt W, Bronsert P, Brunton VG, Pilarsky C, Winkler TH, Brabletz S, Stemmler MP, Brabletz T.** 2017, *Nat Cell Biol*, pp. 19(5): 518-529.

249. *Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer.* **Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS, Kalluri R.** 2015, *Nature*, pp. 527(7579):525-530.
250. *Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis.* **Jeff H. Tsai, Joana Liu Donaher, Danielle A. Murphy, Sandra Chau, Jing Yang.** 2012, *Cancer Cell*, pp. 22(6): 725-736.
251. *Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1.* **Oscar H.Ocaña, Rebeca Córcoles, Ángels Fabra, Gema Moreno-Bueno, Hervé Acloque, Sonia Vega, Alejandro Barral-Gimeno, Amparo Cano, M. Angela Nieto.** 2012, *Cancer Cell*, pp. 22(6): 709-724.
252. *Different thresholds of ZEB1 are required for Ras-mediated tumour initiation and metastasis.* **Liu Y, Lu X, Huang L, Wang W, Jiang G, Dean KC, Clem B, Telang S, Jenson AB, Cuatrecasas M, Chesney J, Darling DS, Postigo A, Dean DC.** 2014, *Nature Communications*, p. 5:5660.
253. *Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors.* **Puisieux Alain, Thomas Brabletz, Julie Caramel.** 2014, *Nat Cell Biol*, pp. 16(6):488-494.
254. *Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence.* **Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron de Fromental C, Puisieux A.** 2008, *Cancer Cell*, pp. 14(1): 79-89.
255. *Epidermal Growth Factor Receptor and Mutant p53 Expand an Esophageal Cellular Subpopulation Capable of Epithelial-to-Mesenchymal Transition through ZEB Transcription Factors.* **Shinya Ohashi, Mitsuteru Natsuzaka, Gabrielle S. Wong, Carmen Z. Michaylira, Katharine D. Grugan, Douglas B. Stairs, Jiri Kalabis, Maria E. Vega, Ross A. Kalman, Momo Nakagawa, Andres J. Klein-Szanto, Meenhard Herlyn, ..., Hiroshi Nakagawa.** 2010, *Cancer Research*, pp. 70(10):4174-4184.
256. *Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence.* **Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, Higashi Y, Dean DC.** 2008, *Development*, pp. 135: 579-588.
257. *EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice.* **Anne-Pierre Morel, George W. Hinkal, Clémence Thomas, Frédérique Fauvet, Stéphanie Courtois-Cox, Anne Wierinckx, Mojgan Devouassoux-Shisheboran, Isabelle Treilleux, Agnès Tissier, ..., Stéphane Ansieau, Alain Puisieux.** 2012, *Plos Genet*, p. 8(5): e1002723.
258. *Different Levels of Twist1 Regulate Skin Tumor Initiation, Stemness, and Progression.* **Beck Benjamin, Lapouge Gaele, Rorive Sandrine, Drogat Benjamin, Desaedelaere Kylie, Delafaille Stephanie, Dubois Christine, Salmon Isabelle, Willekens Karen, Marine Jean-Christophe, Blanpain Cédric.** 2015, *Cell Stem Cell*, pp. 16(1):67-79.
259. *Breast-cancer stem cells-beyond semantics.* **Badve S, Nakshatri H.** 2012, *Lancet Oncol*, pp. 13:e43-8.
260. *A stemness-related ZEB1-MSRB3 axis governs cellular pliancy and breast cancer genome stability.* **Morel, Anne-Pierre, et al.** 2017, *Nature Medicine*, pp. 23, 568-578.
261. *EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications.* **Shibue T, Weinberg RA.** 2017, *Nat Rev Clin Oncol*, pp. 14:611-29.
262. *Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer.* **Zhang Z1, Lee JC, Lin L, Olivas V, Au V, LaFramboise T, Abdel-Rahman M, Wang X, Levine AD, Rho JK, Choi YJ, Choi CM, Kim SW, Jang SJ, Park YS, Kim WS, Lee DH, Lee JS, Miller VA, Arcila M, Ladanyi M, Moonsamy P, Sawyers C, Boggon TJ, Ma PC, ..., Bivona TG.** 2012, *Nat Genet*, pp. 44:852-60.
263. *Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters.* **M Saxena, M A Stephens, H Pathak, A Rangarajan.** 2011, *Cell Death Dis*, p. 2(7): e179.
264. *ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1.* **Zhang P, Wei Y, Wang L, Debeb BG, Yuan Y, Zhang J, Yuan J, Wang M, Chen D, Sun Y, Woodward WA, Liu Y, Dean DC, Liang H, Hu Y, Ang KK, Hung MC, Chen J, Ma L.** 2014, *Nat Cell Biol*, pp. 16(9):864-75.

265. *Epithelial-mesenchymal status renders differential responses to cisplatin in ovarian cancer.* **Miow QH, Tan TZ, Ye J, Lau JA, Yokomizo T, Thiery J, Mori S.** 2015, *Oncogene*, pp. 34(15):1899-907.
266. *Downregulation of miR-429 contributes to the development of drug resistance in epithelial ovarian cancer by targeting ZEB1.* **Jing Zou, Ling Liu, Qi Wang, Fuqiang Yin, Zhijun Yang, Wei Zhang, Li Li.** 2017, *Am J Transl Res*, pp. 9(3): 1357–1368.
267. *The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance.* **Siebzehnrubl FA, Silver DJ, Tugertimur B, Deleyrolle LP, Siebzehnrubl D, Sarkisian MR, ..., Brabletz T, Reynolds BA, Steindler DA.** 2013, *EMBO Mol Med*, pp. 5:1196–212.
268. *ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat.* **Simone Meidhof, Simone Brabletz, Waltraut Lehmann, Bogdan-Tiberius Preca, Kerstin Mock, Manuel Ruh, Julia Schüler, Maria Berthold, Anika Weber, Ulrike Burk, Michael Lübbert, Martin Pühr, Zoran Culig, ..., Thomas Brabletz.** 2015, *EMBO Mol Med*, pp. 7(6): 831–847.
269. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to Immunosuppression in Breast Carcinomas.* **Dongre A, Rashidian M, Reinhardt F, Bagnato A, Keckesova Z, Ploegh HL, Weinberg RA.** 2017, *Can Res*, pp. 77(15):3982-3989.
270. *Epithelial-to-mesenchymal Transition contributes to Immunosuppression in Breast Carcinomas.* **Anushka Dongre, Mohammad Rashidian, Ferenc Reinhardt, Aaron Bagnato, Zuzana Keckesova, Hidde L. Ploegh, Robert A Weinberg.** 2017, *Cancer Res*, pp. 77(15): 3982–3989.
271. *New insights into the role of EMT in tumor immune escape.* **Stéphane Terry, Pierre Savagner, Sandra Ortiz-Cuaran, Linda Mahjoubi, Pierre Saintigny, Jean-Paul Thiery, Salem Chouaib.** 2017, *Molecular Oncology*, pp. 11:824-846.
272. *Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis.* **Akalay I, Janji B, Hasmim M, Noman MZ, Andre F, De Cremoux P, Bertheau P, Badoual C, Vielh P, Larsen AK.** 2013, *Cancer Res*, pp. 73, 2418–2427.
273. *Immunoproteasome deficiency is a feature of non-small cell lung cancer with a mesenchymal phenotype and is associated with a poor outcome.* **Satyendra C. Tripathi, Haley L. Peters, Ayumu Taguchi, Hiroyuki Katayama, Hong Wang, Amin Momin, Mohit Kumar Jolly, Muge Celiktaş, Jaime Rodriguez-Canales, Hui Liu, Carmen Behrens, Ignacio I. Wistuba, Eshel Ben-Jacob, ..., Samir M. Hanash, Edwin J. Ostrin.** 2016, *PNAS*, pp. 113(11): E1555–E1564.
274. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Autophagy Induction in Breast Carcinoma Promote Escape from T-cell-Mediated Lysis.* **Intissar Akalay, Bassam Janji, Meriem Hasmim, Muhammad Zaeem Noman, Fabrice André, Patricia De Cremoux, Philippe Bertheau, Cécile Badoual, Philippe Vielh, Annette K. Larsen, Michèle Sabbah, Tuan Zea Tan, Joan Herr Keira, ..., Salem Chouaib.** 2013, *Cancer Research*, pp. 73(8):2418-2427.
275. *Targeting WNT1-inducible signaling pathway protein 2 alters human breast cancer cell susceptibility to specific lysis through regulation of KLF-4.* **Akalay I, Tan TZ, Kumar P, Janji B, Mami-Chouaib F, Charpy C, Vielh P, Larsen AK, Thiery JP, Sabbah Met, Chouaib S.** 2015, *Oncogene*, pp. 34, 2261–2271.
276. *Acquisition of tumor cell phenotypic diversity along the EMT spectrum under hypoxic pressure: Consequences on susceptibility to cell-mediated cytotoxicity.* **Stéphane Terry, Stéphanie Buart, Tuan Zea Tan, Gwendoline Gros, Muhammad Zaeem Noman, James B. Lorens, Fathia Mami-Chouaib, Jean Paul Thiery, Salem Chouaib.** 2017, *Oncol Immunology*, p. 6(2): e1271858.
277. *WEE1 inhibition alleviates resistance to immune attack of tumor cells undergoing epithelial-mesenchymal transition.* **Hamilton DH, Huang B, Fernando RI, Tsang KY, Palena C.** 2014, *Cancer Res*, pp. 74, 2510–2519.
278. *Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression.* **Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn YH, Byers LA, Zhang X, Yi X, Dwyer D, Lin W, Diao L, Wang J, Roybal J, Patel M, Ungewiss C, Peng D, Antonia S, Mediavilla-Varela M, Robertson G, Suraokar M, ..., Qin FX.** 2014, *Nat Comm*, p. 5:5241.
279. *A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition.* **Milena P. Mak, Pan Tong, Lixia Diao, Robert J. Cardnell,**

Don L. Gibbons, William N. William, Ferdinandos Skoulidis, Edwin R. Parra, Jaime Rodriguez-Canales, Ignacio I. Wistuba, ..., Kevin R. Coombes, Jing Wang, Lauren Averett Byers. 2016, *Clin Cancer Res*, pp. 22(3):609-20.

280. *Epithelial-Mesenchymal Transition Is Associated with a Distinct Tumor Microenvironment Including Elevation of Inflammatory Signals and Multiple Immune Checkpoints in Lung Adenocarcinoma.* **Lou Y, Diao L, Cuentas ER, Denning WL, Chen L, FanYH, Byers LA, Wang J, Papadimitrakopoulou VA, Behrens C, ..., Gibbons DL.** 2016, *Clin Cancer Res*, pp. 22(14):3630-42.

281. *Hypoxia-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma Induces an Immunosuppressive Tumor Microenvironment to Promote Metastasis.* **Long-Yun Ye, Wei Chen, Xue-Li Bai, Xing-Yuan Xu, Qi Zhang, Xue-Feng Xia, Xu Sun, Guo-Gang Li, Qi-Da Hu, Qi-Han Fu, and Ting-Bo Liang.** 2016, *Can Res*, pp. 76(4):818-30.

282. *ZEB1-regulated inflammatory phenotype in breast cancer cells.* **Katsura Akihiro, Yusuke Tamura, Satoshi Hokari, Mayumi Harada, Masato Morikawa, Tsubasa Sakurai, Kei Takahashi, Anna Mizutani, Jun Nishida, Yuichiro Yokoyama, ..., Daizo Koinuma.** 2017, *Molecular oncology*, pp. 11(9): 1241-1262.

283. *Deletion of the SLUG (SNAI2) gene results in human piebaldism.* **Sánchez-Martín M, Pérez-Losada J, Rodríguez-García A, González-Sánchez B, Korf BR, Kuster W, Moss C, Spritz RA, Sánchez-García I.** 2003, *AM J Med Genet*, pp. 122 A, 125–13.

284. *Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance.* **Nishimura EK, Suzuki M, Igras V, Du J, Lonning S, Miyachi Y, Roes J, Beermann F, Fisher DE.** 2010, *Cell Stem Cell*, pp. 6(2):130-40.

285. *Zeb1 represses Mitf and regulates pigment synthesis, cell proliferation, and epithelial morphology.* **Liu Y, Ye F, Li Q, Tamiya S, Darling DS, Kaplan HJ, Dean DC.** 2009, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*, pp. 50, 5080–5088.

286. *EMT-inducing transcription factors, drivers of melanoma phenotype switching.* **Tang Y, Durand S, Caramel J.** 2020, *Cancers*, p. in press.

287. *Melanoma cells revive an embryonic transcriptional network to dictate phenotypic heterogeneity.* **Niels Vandamme, Geert Berx.** 2014, *Front Oncol*, pp. 4, 352.

288. *Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma.* **Strub T, Giuliano S, Ye T, Bonet C, Keime C, Kobi D, Le Gras S, Cormont M, Ballotti R, Bertolotto C, Davidson I.** 2011, *Oncogene*, pp. 30(20):2319-32.

289. *Elevated expression of MITF counteracts B-RAF–stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation.* **Claudia Wellbrock, Richard Marais.** 2005, *J Cell Biol*, pp. 170(5): 703–708.

290. *Effect of downregulation of ZEB1 on vimentin expression, tumor migration and tumorigenicity of melanoma B16F10 cells and CSCs.* **Jun Dou, Xiangfeng He, Yurong Liu, Yaqian Wang, Fengshu Zhao, Xiaoying Wang, Dengyu Chen, Fangfang Shi, Jing Wang.** 2014, *Cell Biology International*, pp. 38(4):452-461.

291. *The EMT transcription factor ZEB2 promotes proliferation of primary and metastatic melanoma while suppressing an invasive, mesenchymal-like phenotype.* **Niels Vandamme, Geertrui Denecker, Kenneth Bruneel, Gillian Blancke, Özden Akay, Joachim Taminau, Jordy De Coninck, Eva De Smedt, Nicolas Skrypek, Wouter Van Loocke, Jasper Wouters, David Nittner, ..., Jean-Christophe Marine, Geert Berx.** 2020, *Cancer Res*.

292. *The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection.* **Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P.** 2015, *Cell Syst*, pp. 1(6):417-425.

293. *MITF-high and MITF-low cells and a novel subpopulation expressing genes of both cell.* **Marie Ennen, Céline Keime, Giovanni Gambi, Alice Kiény, Sebastien Coassolo, Christelle Thibault-Carpentier, Fanny Margerin-Schaller, Guillaume Davidson, Constance Vagne, Dan Lipsker, Irwin Davidson.** 2017, *Clin Cancer Res*, pp. 23(22):7097-7107.

294. *Pleiotropic roles for ZEB1 in cancers.* **Caramel J, Ligier M, Puisieux A.** 2018, *Cancer Research*, pp. 78(1):30-35.

295. *Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) Regulates Immune Cell Migration into Melanoma.* **Gabriela M Wiedemann, Celina Aithal, Angelina Kraechan, Constanze Heise, Bruno L Cadilha, Jin Zhang, Peter Duewell, Robert Ballotti, Stefan Endres, Corine Bertolotto, Sebastian Kobold.** 2019, *Trans Oncol*, pp. 12(2): 350–360.

296. *Epithelial-mesenchymal transition (EMT) signature is inversely associated with T-cell infiltration in non-small cell lung cancer (NSCLC).* Young Kwang Chae, Sangmin Chang, Taeyeong Ko, Jonathan Anker, Sarita Agte, Wade Iams, Wooyoung M. Choi, Kyoungmin Lee, Marcelo Cruz. 2018, Scientific Reports, pp. 8, 2918.
297. *Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells.* Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. 2009, Cancer cell, pp. 15(3):195-206.
298. *The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies.* Shogo Kumagai, Yosuke Togashi, Takahiro Kamada, Eri Sugiyama, Hitomi Nishinakamura, Yoshiko Takeuchi, Kochin Vitaly, Kota Itahashi, Yuka Maeda, Shigeyuki Matsui, Takuma Shibahara, Yasuho Yamashita, ..., Hiroyoshi Nishikawa. 2020, Nature Immunol.
299. *Specific targeting of CD163+ TAMs mobilizes inflammatory monocytes and promotes T cell-mediated tumor regression.* Anders Etzerodt, Kyriaki Tsalkitzi, Maciej Maniecki, William Damsky, Marcello Delfini, Elodie Baudoin, Morgane Moulin, Marcus Bosenberg, Jonas Heilskov Graversen, Nathalie Auphan-Anezin, Søren Kragh Moestrup, Toby Lawrence. 2019, J Exp Med, pp. 216(10): 2394–2411.
300. *Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy.* Catherine Sautès-Fridman, Florent Petitprez, Julien Calderaro, Wolf Herman Fridman. 2019, Nature review, pp. 19; 307-325.
301. *Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma.* Rita Cabrita, Martin Lauss, Adriana Sanna, Marco Donia, Mathilde Skaarup Larsen, Shamik Mitra, Iva Johansson, Bengt Phung, Katja Harbst, Johan Vallon-Christersson, Alison van Schoiack, Kristina Lövgren, Sarah Warren, Karin Jirström, Håkan Olsson, et al. 2020, Nature, pp. 577, pages561–565.
302. *B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response.* Beth A. Helmink, Sangeetha M. Reddy, [...] Jennifer A. Wargo. 2020, Nature, pp. 577, 549–555.
303. *TNF Superfamily Networks: bidirectional and interference pathways of the herpesvirus entry mediator (TNFSF14).* C. Ware, J. Sedy. 2011, Current opinion in immunology, pp. 23(5):627-631.
304. *LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer.* Y Zhai, R Guo, T L Hsu, G L Yu, J Ni, B S Kwon, G W Jiang, J Lu, J Tan, M Ugustus, K Carter, L Rojas, F Zhu, C Lincoln, G Endress, L Xing, S Wang, K O Oh, R Gentz, S Ruben, M E Lippman, S L Hsieh, D Yang. 1998, J Clin Invest, pp. 102(6):1142-51.
305. *CD160 Activation by Herpesvirus Entry Mediator Augments Inflammatory Cytokine Production and Cytolytic Function by NK Cells.* John R. Šedý, Ryan L. Bjordahl, Vasileios Bekiaris, Matthew G. Macauley, Brian C. Ware, Paula S. Norris, Nell S. Lurain, Chris A. Benedict and Carl F. Ware. 2013, The journal of immunology, pp. 191,(2):828-836.
306. *CD160 is essential for NK-mediated IFN- γ production.* Tony C. Tu, Nicholas K. Brown, Tae-Jin Kim, Joanna Wroblewska, Xuanming Yang, Xiaohuan Guo, Seoyun Hyunji Lee, Vinay Kumar, Kyung-Mi Lee, Yang-Xin Fu. 2015, J Exp Med, pp. 212(3): 415–429.
307. *HVEM has a broader expression than PD-L1 and constitutes a negative prognostic marker and potential treatment target for melanoma.* Nausicaa Malissen, Nicolas Macagno, Samuel Granjeaud, Clémence Granier, Vincent Moutardier, Caroline Gaudy-Marqueste, Nadia Habel, Marion Mandavit, Bernard Guillo, Christine Pasero, Eric Tartour, Robert Ballotti, Jean-Jacques Grob,. 2019, Oncoimmunology, p. 8(12): e1665976.
308. *EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications.* Tsukasa Shibue, Robert A Weinberg. 2017, Nat Rev Clin Oncol, pp. 14(10):611-629.
309. *Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade.* Pei-Ling Chen, Whijae Roh, Alexandre Reuben, Zachary A. Cooper, Christine N. Spencer, Peter A. Prieto, John P. Miller, Roland L. Bassett, Vancheswaran Gopalakrishnan, ..., Jennifer A. Wargo. 2016, Cancer Discovery, pp. 6(8):827-837.
310. *Directed Phenotype Switching as an Effective Antimelanoma Strategy.* Saez-Ayala M, Montenegro M.F, Sanchez-del-Campo L, Fernandez-Perez MP, Chazarra S, Freter R, Middleton M, Pinero-Madrona A, Cabezas-Herrera J, Goding CR, Rodriguez-Lopez JN. 2013, Cancer cell, pp. 24(1):105-119.

311. *Cooperative targeting of melanoma heterogeneity with an AXL antibody-drug conjugate and BRAF* / M. Boshuizen J, Koopman LA, Krijgsman O, Shahrabi A, Heuvel EG, Van Den, Ligtenberg MA, Vredevogd DW, Kemper K, Kuilman T, Song J, ... Daniel S Peeper, Paul W H I Parren. 2018, *Nature Medicine*, pp. 24, 203-212.
312. *Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway*. Vasanthi S. Viswanathan, Matthew J. Ryan, Harshil D. Dhruv, Shubhroz Gill, Ossia M. Eichhoff, Brinton Seashore-Ludlow, Samuel D. Kaffenberger, John K. Eaton, Kenichi Shimada, Andrew J. Aguirre, Srinivas R. Viswanathan, ..., Stuart L. Schreiber. 2017, *Nature*, pp. 547, 453–457.
313. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition : Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity*. Skrypek N, Goossens S, Smedt E De, Vandamme N, Berx G. 2017, *Trends Genet*, pp. 1-17.
314. *The Histone Methyltransferase Ezh2 Controls Mechanisms of Adaptive Resistance to Tumor* Article *The Histone Methyltransferase Ezh2 Controls Mechanisms of Adaptive Resistance to Tumor Immunotherapy*. Daniel Zingg, Natalia Arenas-Ramirez, Dilara Sahin, Rodney A. Rosalia, Ana T. Antunes, Jessica Haeusel, Lukas Sommer, Onur Boyman. 2017, *Cell Reports*, pp. 20(4): 854-867.
315. *HDAC inhibition upregulates PD-1 ligands in melanoma and augments immunotherapy with PD-1 blockade*. Woods DM, Sodré AL, Villagra A, Sarnaik A, Sotomayor EM, Weber J. 2015, *Cancer Immunol Res*, pp. 3, 1375–1385.
316. *Combining epigenetic drugs with other therapies for solid tumours — past lessons and future promise*. Morel D, Jeffery D, Aspeslagh S, Almouzni G, Postel-Vinay S. 2020, *Nat. Rev. Clin. Oncol*, pp. 17, 91–107.
317. *Targeted agents and immunotherapies: Optimizing outcomes in melanoma*. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. 2017, *Nat. Rev. Clin. Oncol*, pp. 14, 463–482.

ROLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION ZEB1 DANS L'ÉCHAPPEMENT AU SYSTÈME IMMUNITAIRE ET LA RÉSISTANCE AUX TRAITEMENTS DANS LE MELANOME

Le mélanome est le plus agressif des cancers cutanés dont le traitement a été révolutionné avec l'émergence des thérapies ciblées et immunothérapies. Malgré les progrès sans précédent, de sévères problèmes de résistances sont encore à surmonter. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus de plasticité des cellules cancéreuses majeur impliqué dans la tumorigénèse, l'acquisition de propriétés souches, l'échappement au système immunitaire et la résistance au traitement des carcinomes. Dans le mélanome, le facteur de transcription inducteur d'EMT ZEB1 joue un rôle oncogénique majeur au cours du développement et de la progression des mélanomes. Les objectifs de mes travaux de thèse étaient de définir l'implication de ZEB1 : (i) dans la régulation du phénotype des cellules de mélanome et la résistance aux thérapies ciblées et (ii) l'échappement au système immunitaire des mélanomes.

Nos travaux ont pu montrer que ZEB1 favorise la résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK en induisant un phénotype souche MITF faible/NGFR fort des mélanomes mutés pour BRAFV600E. L'expression de ZEB1 est augmentée dans les cellules de mélanome résistantes (résistance innée et acquise), en comparaison avec les cellules sensibles. Alors que ZEB1 favorise l'émergence de cellules résistantes, le ciblage de ZEB1 restaure la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF démontrant l'intérêt de la stratégie d'un point de vue thérapeutique.

De plus, l'analyse de l'infiltrat immunitaire d'une cohorte de mélanomes humains a mis en évidence l'infiltration réduite par les lymphocytes T CD8 dans les tumeurs de mélanome au fort niveau d'expression de ZEB1. L'implémentation d'approches de gain et perte de fonction *in vivo* dans des modèles syngéniques de mélanomes murins a démontré le rôle de ZEB1 sur la régulation de la croissance tumorale et la modulation de la composition de l'infiltrat immunitaire, en partie en contrôlant le recrutement des lymphocytes T CD8. Au niveau moléculaire, ceci peut être expliqué par une production réduite des chémokines attractrices des T CD8 dans le sécrétome des tumeurs ZEB1 fortes. Enfin, nous avons démontré les conséquences de ce remodelage du microenvironnement immunitaire sur la réponse aux anti-PD-1. L'inactivation de ZEB1 synergise avec les anti-PD1 dans le contrôle de la croissance tumorale.

Dans l'ensemble, nos travaux démontrent le rôle majeur de ZEB1 dans la plasticité phénotypique des mélanomes et ouvre de nouvelles perspectives en terme de stratégies de combinaisons thérapeutiques, aussi bien avec les thérapies ciblées que les immunothérapies.

Mots clés : mélanome métastatique, plasticité phénotypique, EMT-TF, ZEB1, résistance au traitement, échappement au système immunitaire

ROLE OF ZEB1 TRANSCRIPTION FACTOR IN IMMUNE ESCAPE AND RESISTANCE TO TREATMENT IN MELANOMA

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer whose treatment has been revolutionized with the emergence of both targeted- and immunotherapies. Nevertheless, despite these major breakthroughs, the treatment of metastatic melanoma is still faced with severe problems of resistance. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a major cancer cell plasticity process driving tumorigenesis, stemness, immune escape and resistance to treatment in carcinoma. In melanoma, the EMT transcription factor ZEB1 is a key oncogenic factor. The objectives of my work were to define its implication: (i) in regulating the phenotype of melanoma cells and their resistance to MAPK-targeted therapies and (ii) the escape to the immune control.

Our work showed that ZEB1 promotes resistance to MAPK inhibitors by driving a stem-like MITF^{low}/NGFR^{high} phenotype in BRAFV600E melanomas. Indeed, ZEB1 expression is increased in innate as well as acquired resistant melanomas cells, compared to sensitive cells. While ZEB1 expression promotes the emergence of resistant cells, targeting ZEB1 increases the sensitivity to BRAF inhibitor, highlighting the interest of this combination from a therapeutic point of view.

Moreover, analyses of the immune infiltrate in a cohort of human melanoma samples demonstrate that high ZEB1 expression in tumor cells is associated to a decreased infiltration by T CD8 lymphocytes. *Zeb1* gain or loss of function approaches *in vivo* in syngeneic melanoma mouse models showed that ZEB1 regulates tumor growth and modifies the composition of the immune infiltrate, in part by controlling T CD8 lymphocytes recruitment in the tumor. At the molecular level, this may be due to a decreased production of T CD8 attracting chemokines in the secretome of ZEB1-high tumors. Finally, we highlighted the consequences of this remodeling of the immune infiltrate on the response to anti-PD-1. *Zeb1* targeting synergized with anti-PD-1 in inducing regression of mouse tumors.

Overall, our work demonstrates the major role of ZEB1 in melanoma cell plasticity and opens new avenues in terms of combination strategies with both targeted and immunotherapies.

Keywords : Melanoma, cellular plasticity, EMT-TF, ZEB1, resistance to treatment, immune escape