

Microenvironnement inflammatoire et échappement à la réponse immunitaire anti-tumorale

Le microARN-155 réprime l'expression de MITF-M dans les mélanomes

NATHALIE ARTS

DÉCEMBRE 2014

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de docteur en sciences biomédicales et pharmaceutiques

Secteur des sciences de la santé

Président du Jury

Prof. Dominique Lison
Louvain Centre for Toxicology and Applied Pharmacology
Institut de Recherche Expérimentale et Clinique (IREC)
Université Catholique de Louvain

Membres du Jury

Prof. Lionel Larue
Développement normal et pathologies des mélanocytes
Institut Curie
Orsay, France

Prof. Jean-Christophe Marine
Laboratory for Molecular Cancer Biology
Katholieke Universiteit Leuven

Prof. Anabelle Decottignies
Genetic & epigenetic alterations in genomes
Institut de Duve
Université Catholique de Louvain

Prof. Charles De Smet
Genetic & epigenetic alterations in genomes
Institut de Duve
Université Catholique de Louvain

Prof. Patrick Jacquemin
Liver & Pancreas Development
Institut de Duve
Université Catholique de Louvain

Promoteur

Prof. Etienne De Plaen
Tumor Immunology & Antigen Processing
Institut Ludwig pour la Recherche contre le Cancer
Université Catholique de Louvain

Je souhaite tout d'abord remercier mon promoteur, le Professeur Etienne De Plaen pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci de m'avoir laissé la liberté de gérer mon projet tout en étant toujours disponible pour toute question ou discussion. Merci pour votre gentillesse, votre intérêt dans mon travail et la confiance que vous m'avez accordée. Je remercie également le Professeur Benoît Van den Eynde pour ses remarques et suggestions pertinentes.

Mes remerciements vont également au Dr. Guido Bommer pour son aide précieuse dans la mise au point des manip sur les miRNAs ainsi que dans la rédaction de l'article.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon jury pour leurs questions et remarques sur mon manuscrit mais aussi pour leur suivi et leurs conseils tout au long de ma thèse.

Je voudrais tout particulièrement remercier mes collègues sans qui la vie au labo n'aurait pas eu la même saveur. Juliette, Marc, mille fois merci pour toutes les discussions (scientifiques ou non), votre joie de vivre et votre soutien dans les moments plus difficiles. Je garde en mémoire nos sorties, nos soirées cinéma, notre « passion » commune pour les chats, nos magnifiques photos-montages, un IBBM mémorable et encore beaucoup d'autres choses. Merci pour votre amitié et pour avoir ensoleillé mes journées au labo. Merci également à Thérèse et à Simon.

Je tiens aussi à remercier les membres des différents laboratoires pour la bonne ambiance à notre étage. Merci à Caro, Julie, Olivier, Stéphanie D., Stéphanie L., Julia, Violette, Joanna, Florence, Alexandre, Céline, Rui, Nathalie V., Aline, Wenbin, Delia, Marjorie, Aurélie, Charlotte, Nathalie R., Tiphonie, David, Catherine, Marie-Sophie, Orian et Nicolas. Je voudrais remercier tout particulièrement Stefania avec qui j'ai pu collaborer au cours de mon projet et dont la gentillesse légendaire a rendu ce travail particulièrement agréable. Merci également à Olga qui avait débuté ce travail et qui m'a encadrée à mes débuts dans le labo. Enfin, merci à Julie d'avoir pris le temps de relire mon manuscrit et dont les conseils m'ont été fort utiles.

Un tout grand merci aux différents membres de l'Institut Ludwig et de l'Institut de Duve qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail. Un merci tout particulier à Julie et Suzanne pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur aide.

Qu'aurait été cette thèse sans vous les SBIM ! Caro, Jess, Val, Alex, Berny, Antoine, Auré, Laura, quelle chance de vous avoir eus à mes côtés durant ces années ! Merci d'avoir pu partager avec vous cette expérience et d'avoir toujours été là pour m'encourager, me remotiver, me permettre de décompresser et de relativiser. Merci pour votre amitié si précieuse, votre folie et votre capacité incroyable à toujours me donner le sourire. A très bientôt pour un verre au tram, un Noël déjanté, un voyage au ski ou un verre à la santé de Monsieur Ludwig ;-)

Je voudrais également remercier également mes amis qui, bien qu'ayant moins contribué à la partie scientifique de mon travail, ont été indispensables à l'accomplissement de ma thèse. Je voudrais tout particulièrement remercier Lau et Gé pour être toujours là depuis tellement longtemps. Merci aussi aux filles de Star Ice de m'avoir permis de décompresser quand la tension était au maximum.

Enfin, je voudrais terminer par dire un immense merci à ma famille, toujours présente. Merci à chacun d'entre vous d'avoir toujours été à mes côtés et de m'avoir soutenue et encouragée. On dit qu'on ne choisit pas sa famille mais moi je vous aurais tous choisi sans hésiter ! Merci pour tout !

Je dédie cette thèse à l'adorable petite Léo

Table des matières

Introduction	9
1. Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF)	12
1.1. La protéine MITF	12
1.2. Rôle de MITF-M dans les mélanocytes	23
1.3. MITF-M et mélanome	34
2. Les microARNs et leurs rôles dans le mélanome	41
2.1 Les microARNs	41
2.2 Les microARNs dans les mélanocytes et mélanomes	45
3. L'inflammation et le microenvironnement tumoral	49
3.1 L'inflammation	49
3.2 L'inflammation dans le microenvironnement tumoral	49
3.3 Analyse compréhensive des cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral des mélanomes	62
4. La réponse immunitaire adaptative anti-tumorale	63
4.1 La réponse immunitaire adaptative face aux mélanomes	63
4.2 Les mécanismes d'échappement des cellules tumorales face à la réponse immunitaire	68
But de l'étude	73
Résultats	77
1. Article 1 : Interleukins 1α and 1β secreted by some melanoma cell lines strongly reduce expression of MITF-M and melanocyte differentiation antigens	79
2. Résultats intermédiaires	93
3. Article 2 : microRNA-155, induced by Interleukin-1β, represses the expression of Microphthalmia-associated transcription factor (MITF-M) in melanoma cells	99
4. Résultats supplémentaires	129
5. Matériel et méthodes supplémentaires	134
Discussion et perspectives	135
1. Résumé des résultats obtenus	137
2. miR-155	139
2.1 Le rôle de miR-155 dans l'immunité et l'inflammation	139
2.2 miR-155 est un « oncomiR » dans différents cancers	141
3. Etude d'un modèle inductible de mélanome chez la souris	142
4. Le rôle du microenvironnement dans le phénomène de « changement de phénotype »	146
4.1 L'influence du microenvironnement inflammatoire sur le changement de phénotype des mélanomes	146

4.2 L'utilisation du changement de phénotype dans les mélanomes afin d'améliorer les thérapies anti-tumorales	148
5. Quelles sont les régions promotrices qui pourraient être impliquées dans la répression de la transcription de MITF-M en présence d'IL-1 β ?	151
Références	153

Abréviations

α -MSH	α -Melanocyte Stimulating Hormone
ACT	Adoptive Cell Transfer
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ago	Argonaute
AMP	Adénosine Monophosphate
AMPC	AMP cyclique
AP-1	Activator Protein-1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATF2	Activating Transcription Factor 2
BAGE	B Melanoma Antigen
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCR	B-Cell Receptor (Récepteur des cellules B)
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bHLH	basic-Helix-Loop-Helix
BIC	B-cell Integration Cluster
BRN-2	Brain-specific homeobox/POU domain protein 2
c-FLIP	c-FLICE-Inhibitory Protein
CBP	CREB-Binding Protein
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation (Immunoprécipitation de Chromatine)
CRE	cAMP Response Element
CREB	cAMP Response Element Binding protein
CTCF	CCCTC-binding Factor
CTL	Cytolytic T Lymphocyte (Lymphocyte T Cytolytique)
DC	Dendritic Cell (Cellule dendritique)
DCT	Dopachrome Tautomérase
DHFR	Dihydrofolate Reductase
DHI	5,6-dihydroxyindole
DHICA	Acide carboxylique-DHI-2
Dsh	Dishevelled
EBV	Epstein-Barr Virus
EDN3	Endothéline 3
EDNRB	Endothelin-Receptor type B
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition (Transition épithélio-mésenchymateuse)
ERK	Extracellular signal Regulated protein Kinase
FADD	Fas-Associated Death Domain protein
Fas-L	Ligand de Fas
FHC	Ferritin Heavy Chain
FoxD3	Forkhead box D3
GAGE	G Antigen
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
gp100	glycoprotéine 100
GSK3 β	Glycogene Synthase Kinase-3 β
HDAC	Histone Déacétylase
HGF	Hepatocyte Growth Factor

Hif1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
HLA	Human Leukocyte Antigen
IDO	Indolamine 2,3-Dioxygénase
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IL-1R	IL-1 Receptor
IL-1RacP	IL-1R accessory Protein
IRAK	IL-1R-associated Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	kilobase
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
LAGE	L Antigen
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LNA	Locked Nucleic Acid
LPS	Lipopolysaccharide
MAGE	Melanoma Antigen encoding Gene
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MART-1	Melanoma- associated Antigen Recognized by T cells
MATP	Melanoma-Associated Transporter Protein
MC1R	Melanocortin-1 Receptor (Récepteur aux mélanocortines 1)
mDC	myeloid Dendritic Cell (Cellule dendritique myéloïde)
MDE	MITF-M Distal Enhancer
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cell
MEK	MAPK/ERK kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexe Majeur d'Histocompatibilité)
MIR155HG	miR-155 Host Gene
miRISC	miRNA-Induced Silencing Complex
miRNA	microARN
MITF	Microphthalmia-associated Transcription Factor
MMP	Matrix Metalloprotease (Métalloprotéinase matricielle)
MTX	Méthotrexate
MYD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NEMO	NF- κ B Essential Modulator
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NK	Natural Killer
OC2	ONECUT-2
OCT	Optimal Cutting Temperature
p90Rsk	p90 Ribosomal S6 kinase
PAX3	Paired box gene 3
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PCRq	PCR quantitative
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
pDC	plasmacytoid Dendritic Cell (Cellule dendritique plasmacytoïde)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGLA	Poly(lactic-co-Glycolytic Acid)
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIAS3	Protein Inhibitor of Activated STAT3 protein
PKA	Protéine Kinase A
PKB	Protéine Kinase B (ou Akt)
PNAs	Peptide Nucleic Acids (Acides nucléiques peptidiques)
POMC	Pro-opiomélanocortine

RA	Rheumatoid Arthritis (Arthrite rhumatoïde)
Rb1	Retinoblastoma-associated protein 1
RGP	Radial Growth Phase
RIP1	Receptor-Interacting Protein 1
ROS	Reactive Oxygen Species (Espèces réactives de l'oxygène)
RPE	Retinal Pigment Epithelium (Epithélium pigmenté de la rétine)
RT	Reverse transcription (Transcription inverse)
SCF	Stem Cell Factor
SOCS1	Suppressor Of Cytokine Signaling 1
SOD2	Superoxide Dismutase 2
SOX10	Sry-like HMG box containing gene
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TAB1	TAK1 Binding subunit
TAB2	TAK1 Binding Protein 2
TAK1	TGF β -Activated Kinase
TAM	Tumor-Associated Macrophages
TAP	Transporters associated with Antigen Presentation
TBX2	T-Box transcription factor 2
TCF	T Cell Factor
TCR	T Cell Receptor (Récepteur des cellules T)
TDO	Tryptophane 2,3 Dioxygénase
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocyte (Lymphocyte infiltrant les tumeurs)
TLR	Toll-Like Receptor
TMECG	3, O-(3,4,5-Trimethoxylbenzoyl)-Epicatechin
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TRADD	TNF Receptor 1-Associated Death Domain
TRAF	TNF Receptor-Associated Factor
Treg	Lymphocyte T régulateur
TRP-1	Tyrosinase-Related Protein 1
TRPM1	Transient Receptor Potential cation channel, subfamily M, member 1
TYR	Tyrosinase
UTR	Untranslated Region (Région non traduite)
UV	Ultraviolet
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPG	Vertical Growth Phase
WS	Waardenburg Syndrome (Syndrome de Waardenburg)
WSA2	Syndrome de Waardenburg de type 2 dû à une mutation dans le gène <i>MITF</i>

Résumé

Le gène *MITF* (*Microphthalmia-associated transcription factor*) donne naissance à différents transcrits et protéines grâce à l'utilisation de promoteurs spécifiques. Dans les mélanocytes et mélanomes, c'est l'isoforme MITF-M qui est spécifiquement exprimée et qui va jouer un rôle, entre autres, dans la différenciation de ces cellules. MITF-M est en effet capable de stimuler l'expression de gènes impliqués dans la mélanogenèse tels que *TYR* (*tyrosinase*), *MLANA* (*Melan-A/MART1*) ou *SILV* (*gp100/pMel17*). L'expression de ces gènes dans les mélanomes va permettre l'apparition d'antigènes de différenciation pouvant être reconnus à la surface des cellules par des CTL (Cytolytic T Lymphocytes ou Lymphocytes T Cytolytiques) spécifiques, capables d'induire la lyse de ces cellules tumorales.

Au cours de notre étude, nous avons tout d'abord pu démontrer qu'un microenvironnement inflammatoire comprenant de l'IL-1 β (Interleukine-1 β) induisait une diminution d'expression des antigènes de différenciation consécutive à une diminution d'expression de MITF-M. Ceci permettait une réduction de la reconnaissance des cellules tumorales par des CTL spécifiques de ces antigènes de différenciation. Nous avons également pu déterminer que cette répression était dépendante de JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et NF- κ B (Nuclear Factor- κ B).

L'étude des mécanismes responsables de cette répression a permis de montrer que le promoteur classique de *MITF-M* ne semblait pas impliqué dans la répression de celui-ci en présence d'IL-1 β bien qu'une répression de la transcription semblait impliquée. Dès lors, celle-ci se produirait sur une séquence du gène *MITF* différente du promoteur classique et encore non identifiée. En revanche, nous avons pu mettre en évidence un rôle du microARN (miRNA) miR-155 dans cette répression. En effet, ce miRNA était surexprimé dans 4 lignées de mélanome incubées avec de l'IL-1 β qui montraient une répression de l'expression de MITF-M. En revanche, son expression n'était pas induite dans 3 lignées de mélanome qui ne montraient pas de répression de MITF-M en présence d'IL-1 β . Nous avons pu confirmer son implication en utilisant un inhibiteur spécifique de miR-155. Enfin, nous avons pu montrer *in vivo*, dans des tumeurs de souris, une anti-corrélation entre, d'une part, l'expression de *MITF-M* et de la *tyrosinase* et, d'autre part, l'expression de miR-155 et de l'IL-1 β .

En résumé, nos résultats ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, nous avons démontré, pour la première fois, que miR-155 était capable de cibler *MITF-M* dans un microenvironnement inflammatoire. Dès lors, l'inhibition de miR-155 pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique permettant une amélioration des traitements d'immunothérapie ou de chimiothérapie classiques.

Summary

Gene *MITF* (*Microphthalmia-associated transcription factor*) generates several transcripts and proteins through the use of different promoters. The MITF-M isoform is expressed exclusively in melanocytes and is a key transcription factor that regulates, among others, many genes involved in differentiation. Indeed, MITF-M induces the expression of differentiation genes like *TYR* (*tyrosinase*), *MLANA* (*Melan-A/Mart-1*) or *SILV* (*pMel17/gp100*). In melanoma cells, the expression of these genes produce antigens that can be recognized at the surface of the tumor cells by specific CTLs (Cytolytic T Lymphocytes) able to induce the death of these cells.

In the course of our study, we demonstrated that an inflammatory environment characterized by the presence of IL-1 β (Interleukin-1 β) reduced the expression of differentiation antigens consecutive to a reduction of MITF-M expression. We showed that this repression reduced the recognition of melanoma cells by CTLs directed against melanocytic differentiation antigens. We also found that this process was JNK (c-Jun N-terminal Kinase) and NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) dependent.

The study of the mechanisms involved in this repression of MITF-M expression induced by IL-1 β allowed us to show that the classical MITF-M promoter did not seem to be involved. However, transcriptional repression seemed to occur on a sequence of the *MITF* gene that differs from the classical promoter and that we were unable to identify. Following this, we found that the microRNA-155 known to be induced by NF- κ B has a role in this process. Indeed, we observed that the downregulation of MITF-M was paralleled by an upregulation of miR-155 in 4 melanoma cell lines treated with IL-1 β . On the other hand, the expression of miR-155 was not induced by IL-1 β in 3 melanoma cell lines which did not show any downregulation of MITF-M. We confirmed the role of miR-155 in the IL-1 β induced repression of MITF-M by using a miR-155 specific inhibitor. Finally, in a mouse model of melanoma, we observed a strong negative correlation between the expression levels of MITF-M and tyrosinase on one hand, and miR-155 and IL-1 β on the other hand.

To conclude, our results allowed us to identify a new mechanism developed by tumor cells to escape the immune response in an inflammatory environment. We demonstrated for the first time that miR-155 was able to repress the expression of MITF-M in melanoma cells. Therefore, the inhibition of miR-155 could be a new therapeutic approach to improve the classical immunotherapy or chemotherapy of human melanomas.

Introduction

Le mélanome cutané est un cancer très agressif issu de la transformation maligne des mélanocytes. Ce cancer, dont l'incidence ne cesse d'augmenter, possède un potentiel métastatique élevé ainsi qu'une forte résistance à la chimiothérapie (Eggermont et al., 2014). En effet, si l'ablation chirurgicale de la tumeur primaire permet la guérison, la survie médiane des patients souffrant d'un mélanome métastatique est seulement de 6 à 9 mois (Balch et al., 2009). De nombreuses études se sont intéressées à la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement et la progression du mélanome afin de mettre au point des thérapies ciblées contre ces cellules tumorales. Ceci a permis le développement de traitements inhibant spécifiquement les voies de signalisation activées par des mutations dans les mélanomes comme $V600E$ BRAF par exemple. Si ces thérapies donnent actuellement des résultats encourageants, les bénéfices sont souvent de courte durée et les rechutes fréquentes (Eggermont et al., 2014). De plus, ces stratégies sont efficaces uniquement quand la mutation ciblée est présente, soit dans environ 60% des cas pour la mutation $V600E$ BRAF (Davies et al., 2002).

L'immunothérapie devrait être une stratégie particulièrement efficace contre le mélanome étant donné la nature immunogénique de ce type de tumeur. En effet, il a été démontré qu'il pouvait exister une réponse immunitaire anti-tumorale contre les mélanomes (Germeau et al., 2005; Nagorsen et al., 2003). Cependant, de nombreux mécanismes sont également capables d'induire une répression de cette réponse immunitaire permettant l'échappement des cellules tumorales (Boon et al., 2006). Dès lors, afin de permettre une efficacité maximale de ce type de traitement, il est essentiel d'améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires pouvant influencer l'interaction entre les cellules tumorales et le système immunitaire. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés aux conséquences du développement d'un microenvironnement tumoral inflammatoire sur l'expression de Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF-M). En effet, ce facteur de transcription essentiel des mélanomes pourrait jouer un rôle majeur dans l'échappement des cellules tumorales face à la réponse immunitaire.

1. Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF)

1.1. La protéine MITF

C'est en étudiant les mutations présentes chez des souris blanches aux petits yeux, descendantes d'une souris irradiée, que Paula Hertwig a découvert le locus *Mitf* il y a environ 70 ans (Hodgkinson et al., 1993). Les analyses de ces souris microphthalmiques ont alors montré que les mutations de *Mitf* avaient une influence non seulement sur les 2 types de cellules pigmentées de l'organisme, les mélanocytes et les cellules pigmentées de la rétine (Retinal Pigment Epithelium ou RPE), mais également sur les ostéoclastes et les cellules mastocytaires (Arnheiter, 2010; Steingrimsson et al., 2004).

1.1.1. La protéine MITF : structure et isoformes

Le gène *MITF* est localisé dans la région p12.3-14.1 du chromosome 3 et code un facteur de transcription basique hélice-boucle-hélice de type tirette à leucine (basic-Helix-Loop-Helix-leucine zipper ou bHLH-Zip) actif sous forme de dimère (Hou and Pavan, 2008; Watanabe et al., 2002). Il possède au moins 9 promoteurs distincts capables d'induire l'expression de 9 transcrits spécifiques (Figure 1A). Ceux-ci possèdent un premier exon unique mais partagent des exons 2 à 9 communs, incluant les séquences codantes des domaines de type bHLH-Zip. Il s'agit des isoformes A, J, C, Mc, E, H, D, B et M, exprimées sélectivement dans certains types cellulaires et tissus (Hou and Pavan, 2008).

L'isoforme M, dont l'exon 1M spécifique code une séquence de 11 acides aminés, est exprimée exclusivement dans les mélanocytes et les mélanomes et est un régulateur clé dans ces cellules (Figure 1B) (Shibahara et al., 2001). L'isoforme A est ubiquitaire et est la forme prédominante dans le RPE. Les isoformes B, H et J sont ubiquitaires alors que l'isoforme C est exprimée principalement dans le RPE, de même que l'isoforme D qui est également présente dans les macrophages et ostéoclastes. Les isoformes E et Mc sont, quant à elles, exprimées dans les cellules mastocytaires (Denat and Larue, 2007; Shahlaee et al., 2007; Shibahara et al., 2001). Ces différentes isoformes possèdent donc des extrémités N-terminales distinctes mais partagent le même domaine basique de liaison à l'ADN ainsi que le même domaine de dimérisation (Shahlaee et al., 2007; Steingrimsson et al., 2004).

De plus, un épissage alternatif au niveau de l'exon 6 permet l'inclusion (+) ou l'exclusion (-) de 6 acides aminés (ACIFPT) en amont du domaine basique ; la forme (+) se lie à l'ADN avec une affinité supérieure de 20% à celle de la forme (-) (Hemesath et al., 1994). Ceci est en accord avec

le fait que l'isoforme (-) induit, *in vitro*, une plus faible expression de la tyrosinase, un gène cible de MITF-M, que l'isoforme (+) (Murakami et al., 2007). Cet épissage alternatif est présent dans de nombreux tissus et a été identifié pour les isoformes A, H, M, E, J et Mc de MITF (Murakami et al., 2007). Enfin, l'isoforme (+) serait l'isoforme principale (90%) dans les mélanocytes mais serait moins prédominante dans les mélanomes (Primot et al., 2010).

Les différentes isoformes de MITF sont des facteurs de transcription capables de se lier à des promoteurs contenant une « E-box » de type palindromique CACGTG, ou non palindromique CATGTG. Cependant, les sites de fixation au niveau des promoteurs de gènes spécifiques des mélanocytes, régulés par l'isoforme MITF-M, sont plus stricts. En effet, pour être activés, ces gènes doivent contenir une « M-box » comprenant la séquence « E-box » CATGTG à laquelle doit être ajoutée un résidu T en 5' (Aksan and Goding, 1998; Hemesath et al., 1994). La liaison de MITF sur ses promoteurs cibles peut se faire sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère avec les membres de la famille MITF-TFE comprenant TFE3, TFEB et TFEC, grâce à des interactions hydrophobes entre les leucines à l'intérieur de l'hélice (Hemesath et al., 1994; Levy et al., 2006). Cependant, ces 3 facteurs ne semblent pas impliqués dans le développement mélanocytaire étant donné que la délétion des gènes codant ces facteurs n'influence pas le développement des mélanocytes chez la souris (Hou and Pavan, 2008). Dès lors, MITF-M agirait sous forme d'homodimère au cours de ce processus.

Les isoformes de MITF sont exprimées dans différents types cellulaires et activent des gènes distincts. Étant donné que seule leur extrémité amino-terminale les différencie, celle-ci devrait donc avoir un rôle dans la spécification des gènes qu'elle régule. Une étude sur les isoformes MITF-M et -Mc semble confirmer cette supposition (Takemoto et al., 2002). En effet, en utilisant soit un promoteur spécifique des cellules mastocytaires normalement activé par l'isoforme MITF-Mc, soit le promoteur de la tyrosinase activé uniquement par l'isoforme MITF-M, il a été démontré que seule l'isoforme MITF-M était capable d'activer les deux promoteurs. L'isoforme MITF-Mc n'était en effet pas capable d'activer le promoteur de la tyrosinase (Takemoto et al., 2002). Cette expérience a été réalisée dans 3 types cellulaires différents : des fibroblastes NIH3T3 et des cellules de mélanome B16 murins ainsi qu'une lignée mastocytaire humaine HMC-1. Les mêmes résultats ont été obtenus dans chaque lignée. De plus, il a été démontré dans la même étude que les deux isoformes étaient capables de se lier avec environ la même affinité aux 2 promoteurs. Ceci suggère que d'autres facteurs, comme l'histone acétyl-transférase p300/CBP, connue pour se lier à MITF-M pour activer ses gènes cibles, reconnaîtraient la partie amino-terminale de MITF-M. Ces facteurs interagiraient avec MITF-M pour induire la

transcription de ses gènes cibles alors qu'ils ne reconnaîtraient pas l'isoforme Mc (Takemoto et al., 2002). Cette hypothèse a également été confirmée dans cette étude en montrant que la perte de la partie amino-terminale spécifique de l'isoforme Mc suffisait pour permettre l'activation d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur tyrosinase (Takemoto et al., 2002).

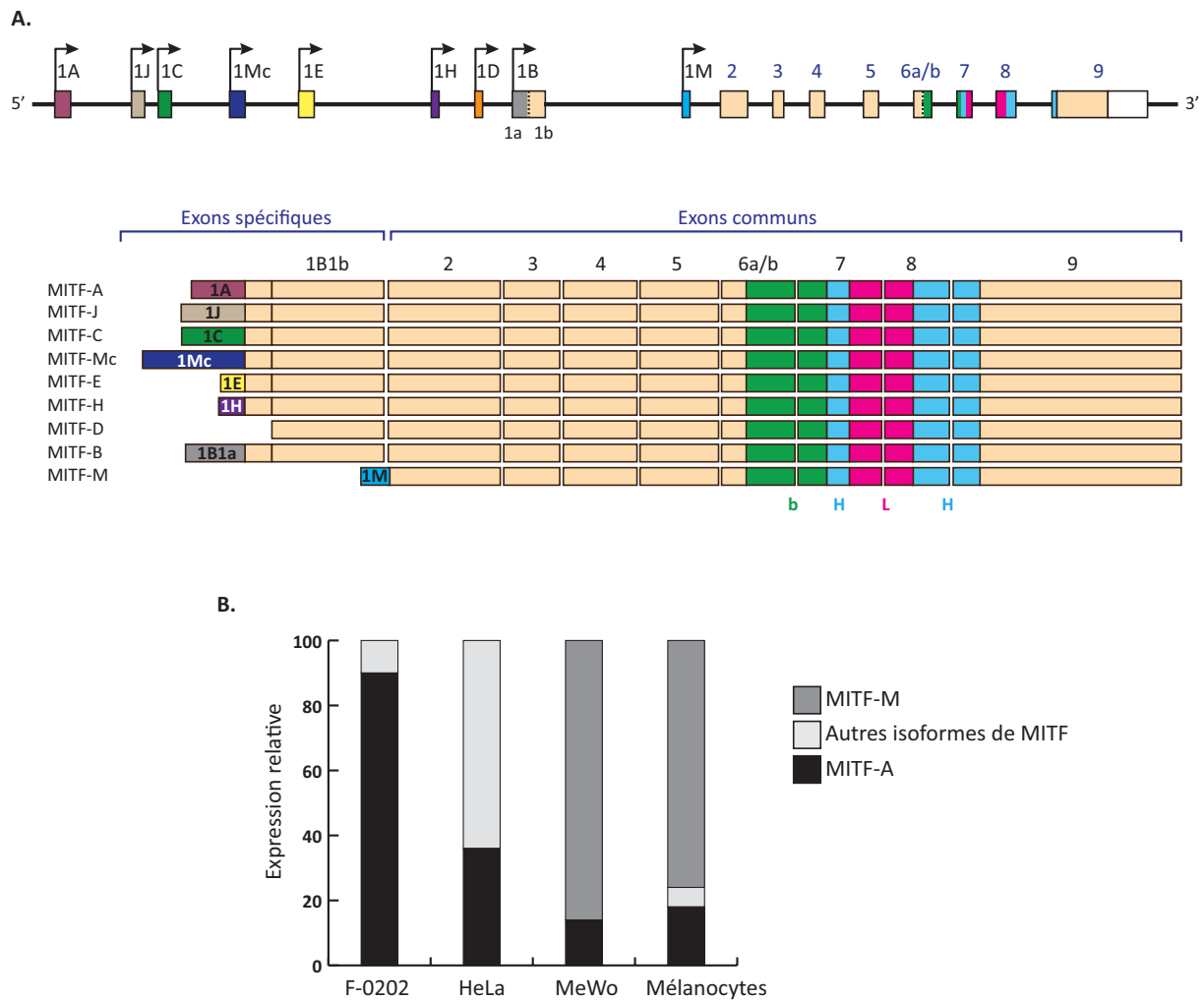


Figure 1

A. Le gène *MITF*

9 promoteurs alternatifs permettent l'expression de 9 isoformes de MITF possédant un premier exon spécifique et 8 exons communs. De plus, l'exon 1B possède une première partie appelée 1B1a présente uniquement dans l'isoforme B et une deuxième partie, 1B1b présente dans les isoformes A, J, C, Mc, E, H, B et D. Dans ces isoformes, l'exon 1B1b est présent juste après le premier exon spécifique. Le promoteur M est le seul à se situer en aval du promoteur B et donc à ne pas contenir cet exon 1B1b. L'isoforme D utilise l'ATG contenu dans l'exon 1B1b comme premier codon.

La taille du gène *MITF* est d'environ 230 kb.

bHLH : basic-Helix-Loop-Helix

Adapté de (Denat and Larue, 2007; Hou and Pavan, 2008)

B. Expression des isoformes de MITF dans différentes lignées cellulaires humaines

F-0202 : cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine (RPE) - **HeLa** : lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus - **MeWo** : lignée cellulaire de mélanome - **Mélanocytes**

Adapté de (Yasumoto et al., 1998)

1.1.2. Régulation transcriptionnelle de MITF-M

1.1.2.1. *Les facteurs de transcription régulant MITF-M*

Le promoteur du gène codant MITF-M peut être ciblé par différents facteurs de transcription dont PAX3 (Paired box protein 3), CREB (cAMP-Response Element Binding protein), SOX10 (Sry-like HMG box containing gene), BRN-2/POU3F2 (Brain-specific homeobox/POU domain protein 2) ou MITF-M lui-même (Figure 2A) (Hsiao and Fisher, 2014).

PAX3 et SOX10 sont exprimés dans les cellules de la crête neurale qui donnent naissance aux mélanocytes et y induisent l'expression de MITF-M. Ces deux facteurs de transcription sont capables d'activer l'expression de *MITF-M* en se fixant sur des sites distincts du promoteur, mais auraient également un effet synergique permettant une activation plus soutenue (Bondurand et al., 2000; Busca and Ballotti, 2000). PAX3 se fixe sur une séquence localisée entre -260 et -244 ainsi que sur une autre séquence localisée entre -40 et -26 en amont du site d'initiation de la transcription (Steingrimsen et al., 2004). SOX10 possède 7 sites de fixation sur le promoteur de *MITF-M* qui permettent des liaisons d'intensité variable avec l'ADN. Ils sont tous situés entre -535 et -192 avant le site d'initiation de la transcription (Bondurand et al., 2000; Steingrimsen et al., 2004).

Le facteur de transcription BRN-2 (aussi appelé POU3F2), de la famille POU, est également capable de réguler l'expression de MITF-M. Deux populations distinctes de cellules de mélanomes exprimant soit fortement le facteur de transcription BRN-2 et peu ou pas de MITF-M, soit des niveaux faibles de BRN-2 et des niveaux plus élevés de MITF-M, peuvent être isolées (Goodall et al., 2008). Il a été démontré que l'expression de BRN-2 favorisait l'invasion et était capable d'induire la répression de *MITF-M* en ciblant directement son promoteur juste en amont de la « TATA box » (Goodall et al., 2008). De plus, MITF-M est également capable de réguler BRN-2 via l'induction de l'expression du microARN-211. En effet, ce microARN transcrit à partir d'un intron de *TRPM1* (*Transient Receptor Potential cation channel, subfamily M, member 1*), un gène cible de MITF-M, est capable de cibler et de réprimer l'expression de BRN-2 (Boyle et al., 2011; Margue et al., 2013). Il existe donc une boucle de régulation induisant une expression anti-corrélée entre MITF-M et BRN-2. Enfin, BRN-2, sous sa forme non phosphorylée, est également capable de réprimer l'expression de PAX3 alors qu'il l'active lorsqu'il est phosphorylé sur la Ser362 et la Thr361 (Berlin et al., 2012). BRN-2 induit la répression de l'expression de MITF-M à la fois sous sa forme phosphorylée et non phosphorylée (Berlin et al., 2012).

Le facteur de transcription OC2 (ONECUT-2) est également capable de stimuler l'expression de MITF-M (Jacquemin et al., 2001). Cependant, le rôle précis de ce facteur de transcription n'a pas encore été déterminé.

Les différents sites de fixation pour les facteurs de transcription ciblant le promoteur de *MITF-M* se situent donc dans une région assez proche du site d'initiation de la transcription. Cependant, un site activateur supplémentaire contenant 2 sites de fixation pour SOX10 a également été découvert 14,5 kb en amont du site d'initiation de la transcription. Ce site est appelé MDE (MITF-M Distal Enhancer) (Watanabe et al., 2002).

1.1.2.2. *La régulation de MITF-M via la voie de signalisation Wnt/ β -caténine*

La voie de signalisation Wnt est capable de réguler l'expression de *MITF-M*, particulièrement au cours du développement des mélanocytes (Figure 2B). En absence d'activation du récepteur Frizzled par un ligand Wnt, la β -caténine se trouve dans le cytoplasme dans un complexe protéique comprenant les protéines APC (Adenomatous Polyposis Coli), axine et GSK3 β (Glycogene Synthase Kinase-3 β). La GSK3 β peut alors phosphoryler la β -caténine au niveau de résidus sérine et thréonine, ce qui va induire son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Gordon and Nusse, 2006). L'activation de la voie canonique Wnt via la liaison des ligands Wnt1 ou Wnt3a, principalement, va inhiber la capacité de GSK3 β à phosphoryler la β -caténine. Cette dernière s'accumule alors dans le cytoplasme avant d'être transloquée dans le noyau où elle s'associe aux facteurs LEF (Lymphoid Enhancer Factor) ou TCF (T Cell Factor) pour activer ses gènes cibles, y compris *MITF-M*. Ce dernier possède 3 sites de liaison LEF1 dans son promoteur (Gordon and Nusse, 2006; Hsiao and Fisher, 2014; Steingrimsson et al., 2004; Takeda et al., 2000).

1.1.2.3. *La régulation de MITF-M via la voie de signalisation α -Melanocyte Stimulating Hormone (α -MSH)*

Sous l'effet des rayons UV de la lumière solaire, la pigmentation de la peau est stimulée afin de protéger les cellules (Figure 2C). Les kératinocytes, sous l'action des UV, peuvent en effet stimuler la production de mélanine par les mélanocytes en sécrétant de l' α -MSH, une hormone provenant du clivage du précurseur protéique POMC (Pro-opiomélanocortine) (Busca and Ballotti, 2000). En se fixant sur le MC1R (Melanocortin-1 Receptor ou Récepteur aux mélanocortines 1) présent à la surface des mélanocytes, cette hormone induit l'activation de

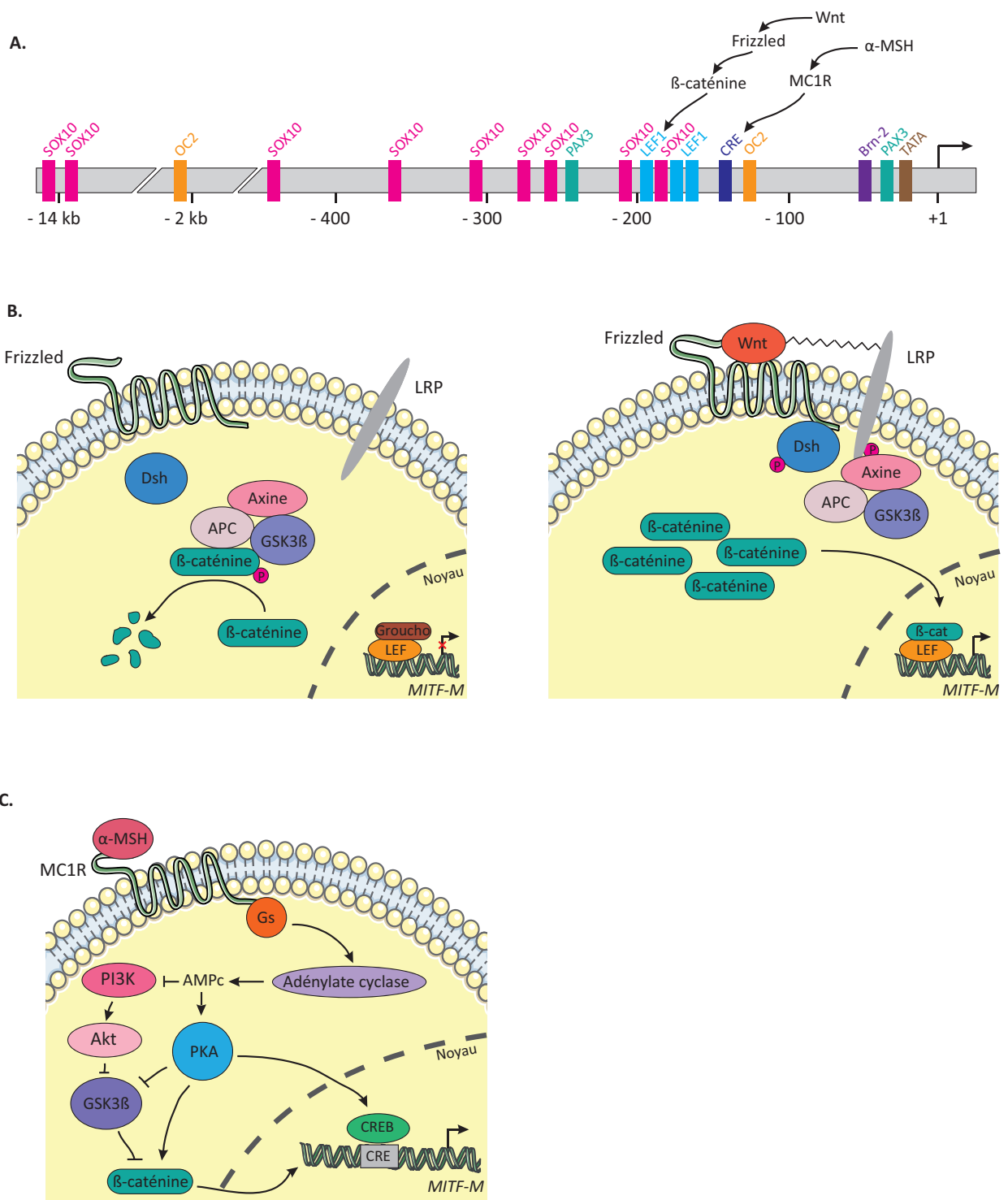
l'adénylate cyclase et la production d'AMPc (AMP cyclique). Celui-ci lie les sous-unités régulatrices de la PKA (Protéine Kinase A), ce qui l'active en libérant ses sous-unités catalytiques. Ces dernières vont alors être libres de phosphoryler leurs substrats, tels que le facteur de transcription CREB. Celui-ci est capable de se lier sur une séquence CRE (cAMP Response Element) présente dans le promoteur de *MITF-M* afin d'induire l'expression de ce dernier (Hsiao and Fisher, 2014; Steingrimssson et al., 2004). Le rôle de l'AMPc sur le promoteur de *MITF-M* est spécifique des mélanocytes, ce qui suggère une coopération avec un autre facteur de transcription caractéristique de ce type cellulaire dans cette régulation. Certains résultats suggèrent que ce facteur spécifique serait SOX10. En effet, l'utilisation de la forskoline, un inducteur d'AMPc, ne suffit pas à induire l'expression de *MITF-M* dans des cellules de neuroblastome. Néanmoins, la forskoline combinée à la surexpression de SOX10 dans ces mêmes cellules permet l'induction de l'expression de *MITF-M* (Huber et al., 2003). Ceci expliquerait comment un signal ubiquitaire, comme la production d'AMPc, induit une réponse spécifique dans un tissu particulier.

De plus, cette voie de signalisation peut également coopérer avec d'autres voies pour réguler l'expression de *MITF-M*. En effet, la PKA, activée via l' α -MSH, est également capable de phosphoryler la GSK3 β sur la Ser9. Ceci l'inactive et empêche donc la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation de la β -caténine. De plus, la PKA est également capable de phosphoryler directement la β -caténine sur la Ser675, ce qui, contrairement à la phosphorylation par la GSK3 β , favorise sa stabilisation (Bellei et al., 2011). Cependant, d'autres études montrent également que l'augmentation de la production d'AMPc induirait l'inhibition de la PI3-kinase (Phosphatidylinositol-3-kinase). Celle-ci n'est alors plus capable de phosphoryler la PKB (Protéine Kinase B ou Akt), la rendant inactive et l'empêchant ainsi de réprimer GSK3 β . Cette dernière pourrait, d'une part, phosphoryler la β -caténine et induire ainsi sa dégradation, et d'autre part phosphoryler la protéine *MITF-M* sur la Ser298. Ceci favoriserait la liaison de *MITF-M* à ses gènes cibles et augmenterait dès lors son activité transcriptionnelle (Denat and Larue, 2007; Khaled et al., 2002).

1.1.3. Régulations post-traductionnelles de MITF-M

MITF-M peut être soumis à des modifications post-traductionnelles (Figure 2D). Au cours du développement, l'activation de la voie des MAP kinases via la liaison de SCF (Stem Cell Factor) sur son récepteur c-Kit mène à la phosphorylation de MITF-M sur la Ser73 par la kinase ERK (Extracellular signal Regulated protein Kinase) et sur la Ser409 par p90Rsk (p90 Ribosomal S6 kinase) (Wu et al., 2000). La phosphorylation de la Ser73 permet une stimulation transitoire de la mélanogenèse en augmentant la capacité transcriptionnelle de MITF-M via le recrutement du co-activateur p300/CBP (CREB-Binding Protein) (Wu et al., 2000). La phosphorylation de la Ser409 a, quant à elle, été impliquée dans l'inhibition de l'interaction entre MITF-M et PIAS3 (Protein Inhibitor of Activated STAT3 protein). En effet, la liaison de PIAS3 à MITF-M inhibe la capacité de celui-ci à se lier à l'ADN de ses gènes cibles, réprimant ainsi son activité transcriptionnelle. Cependant, lorsque la voie des MAP kinases est activée et que MITF-M est phosphorylée sur la Ser409, l'affinité de PIAS3 pour MITF-M diminue alors que celle pour STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) (alors également phosphorylé via l'induction de la voie des MAP kinases) augmente. Ceci induit alors un changement de partenaire de prédilection pour PIAS3 qui se lie à STAT3 et qui laisse MITF-M capable d'aller activer ses gènes cibles (Levy et al., 2003; Thingnes et al., 2012). Cependant, la protéine MITF-M phosphorylée sur ces deux sérines est ensuite rapidement ubiquitinée et dégradée par le protéasome (Busca and Ballotti, 2000; Wu et al., 2000). Contrairement à une régulation transcriptionnelle, cette régulation post-traductionnelle permet donc une induction en quelques minutes de l'activité de MITF-M (Wu et al., 2000). Enfin, l'AMPc, dont l'expression est induite par la voie α -MSH, peut aussi activer la protéine Ras et ainsi induire la voie des MAP kinases (Busca and Ballotti, 2000).

L'activité transcriptionnelle de MITF-M peut également être influencée par l'ajout de groupements SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) sur les résidus Lys182 et Lys316 grâce à un système semblable à l'ubiquitination (Miller et al., 2005; Murakami and Arnheiter, 2005). Cette sumoylation induirait une plus faible transcription à partir des promoteurs contenant plusieurs sites de liaison pour MITF-M, comme ceux des gènes codant la tyrosinase, TRP-1 (Tyrosinase Related Protein-1) ou DCT (Dopachrome Tautomérase). Elle n'aurait cependant pas d'effet sur les promoteurs ne contenant qu'un seul site de liaison comme celui régulant l'expression de gp100 (glycoprotéine 100) (Miller et al., 2005; Murakami and Arnheiter, 2005). Ceci pourrait être dû à l'inhibition d'une réponse synergique, normalement favorisée par les multiples sites de liaison de MITF-M sur un même promoteur, ou via le recrutement de co-répresseurs.



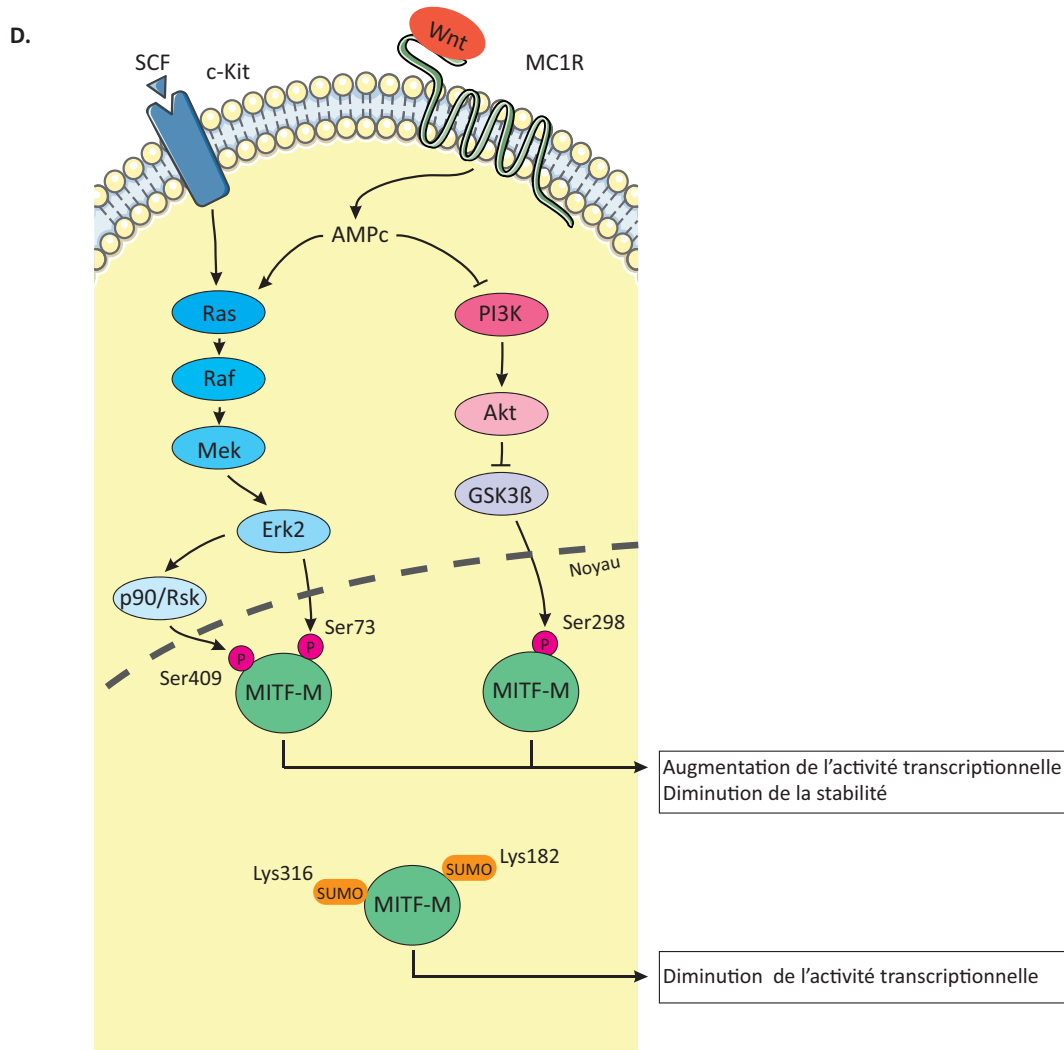


Figure 2 : La régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle de MITF-M

A. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de MITF-M

Représentation schématique de la région en amont du départ de la transcription de l'exon 1M de *MITF* ainsi que des sites de liaison pour les facteurs de transcription la ciblant.

Adapté de (Steingrimsdottir et al., 2004)

B. et C. Les voies de signalisation participant à la régulation MITF-M

B. En absence de ligand Wnt (à gauche), la β -caténine est associée à un complexe protéique et phosphorylée par GSK3 β , ce qui induit sa dégradation. Les gènes cibles de Wnt sont alors réprimés par l'association de LEF avec l'inhibiteur Groucho. La liaison de Wnt aux récepteurs Frizzled et LRP (à droite) induit la phosphorylation de LRP, ce qui recrute l'axine. Dishevelled (Dsh) est également phosphorylé et le complexe Axine-APC-GSK3 β est inhibé, ce qui permet l'accumulation de la β -caténine dans le cytosol. La β -caténine est alors capable de transloquer dans le noyau où elle remplace Groucho en s'associant avec LEF et induit l'activation de gènes incluant *MITF-M*.

C. La liaison de l' α -MSH sur son récepteur MC1R, un récepteur couplé aux protéines G présent dans les mélanocytes, stimule la protéine Gs, qui active l'adénylate cyclase, une enzyme capable de convertir l'ATP en AMPc. L'AMPc agit alors comme second messenger pour activer la PKA. Celle-ci va d'une part transloquer dans le noyau, où elle va phosphoryler CREB, un facteur de transcription qui se lie sur une séquence CRE située dans le promoteur de *MITF-M*. D'autre part, la PKA va phosphoryler GSK3 β sur la Ser9, ce qui l'inactive et l'empêche d'induire la dégradation de la β -caténine. Cette dernière peut alors activer ses gènes cibles dont *MITF-M*. L'augmentation des niveaux intra-cellulaire d'AMPc va également inhiber la PI3-kinase qui ne phosphoryle plus Akt, rendant alors cette dernière inactive et incapable de réprimer GSK3 β .

Adapté de (Busca and Ballotti, 2000; Gordon and Nusse, 2006)

D. La régulation post-traductionnelle de MITF-M

La liaison de SCF sur son récepteur c-Kit active la voie des MAP kinases en induisant un changement de conformation de la protéine G Ras. Ceci favorise sa liaison avec du GTP à la place du GDP, ce qui l'active. La protéine Ras activée induit alors une cascade de phosphorylation en phosphorylant Raf, qui à son tour phosphoryle Mek. Mek phosphoryle alors Erk2, qui, d'une part transloque dans le noyau pour phosphoryler MITF-M sur la Ser73 et d'autre part phosphoryle p90/Rsk qui transloque également dans le noyau pour phosphoryler MITF-M sur la Ser409. L'AMPc, dont la synthèse est induite par la liaison de l' α -MSH sur son récepteur MC1R (voir figure 2C), est également capable d'activer la protéine Ras et de favoriser ainsi la phosphorylation de MITF-M sur les Ser73 et Ser409. L'activation de GSK3 β induite par l'AMPc (voir figure 2C) permettrait également à celle-ci de phosphoryler MITF-M sur la Ser298. La phosphorylation des Ser73, Ser409 et Ser298 induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle transitoire car elle favorise également la dégradation de MITF-M par le protéasome. MITF-M peut également être sumoylé sur les Lys182 et Lys316, ce qui diminue son activité transcriptionnelle sur les promoteurs contenant plusieurs sites de liaison pour MITF-M.

Adapté de (Denat and Larue, 2007)

1.2. Rôle de MITF-M dans les mélanocytes

1.2.1. Rôle de MITF-M dans le développement des mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules pigmentées qui dérivent de cellules pluripotentes provenant de la crête neurale (Thomas and Erickson, 2008). Une population distincte de ces cellules, appelées mélanoblastes, est capable de migrer dorso-latéralement depuis le tube neural entre les somites et l'ectoderme pour envahir la couche basale de l'épiderme ainsi que les follicules pileux où elle se différencie en mélanocytes (Figure 3A) (Adameyko et al., 2009; Thomas and Erickson, 2008). Les mélanoblastes qui envahissent l'épiderme se différencient en mélanocytes producteurs de mélanine (Gleason et al., 2008). En revanche, les mélanoblastes qui migrent vers le follicule pileux atteignent soit le bulbe, où ils deviennent des mélanocytes différenciés, soit la région du « bulge » (renflement), où ils deviennent des cellules capables d'auto-renouvellement aussi appelées « stem cell-like » (Figure 3B) (Hou and Pavan, 2008; Nishimura et al., 2002). A chaque cycle pileux, les mélanocytes « stem cell-like » sont activés pour produire de nouveaux mélanocytes différenciés dans le bulbe ou s'auto-renouveler. La perte de ces mélanocytes « stem cell-like » ou leur incapacité à s'activer induit le grisonnement des cheveux (Nishimura et al., 2005).

La différenciation des cellules de la crête neurale en mélanoblastes nécessite la présence de plusieurs facteurs de transcription tels que MITF-M, PAX3, SOX10, EDN3 (Endothéline 3), dont plusieurs sont impliqués dans la régulation de l'expression de *MITF-M* (Thomas and Erickson, 2008). Ce facteur de transcription joue donc un rôle clé dans le processus de différenciation des mélanoblastes. Ceci peut être illustré par l'existence, chez la souris, de plus de 25 mutations différentes de *Mitf* responsables de déficiences au niveau des mélanocytes allant jusqu'à la disparition complète de ces cellules (Opdecamp et al., 1997). PAX3 est exprimé dans le tube neural dorsal avant la migration depuis la crête neurale ; SOX10 est présent dans les cellules migrant depuis la crête neurale et MITF-M est exprimé dans les mélanoblastes dorsaux du tube neural (Steingrimsen et al., 2004). Si PAX3 et SOX10 sont déjà exprimés préalablement et sont donc nécessaires à l'établissement de plusieurs lignées provenant de la crête neurale, MITF-M est exprimé dans les mélanoblastes juste après la migration des cellules depuis le tube dorsal et avant le commencement de la migration dorso-latérale, ce qui coïncide avec la spécification du lignage mélanocytaire (Opdecamp et al., 1997; Thomas and Erickson, 2008).

Les voies de signalisation Wnt et Kit, toutes deux capables de réguler l'expression de *MITF*, sont impliquées dans le développement des mélanocytes. La voie Wnt favorise la différenciation en mélanoblastes (Jin et al., 2001). En effet, chez la souris, l'expression de Wnt3a est détectée au jour embryonnaire 7,5, soit avant l'expression de *Mitf*, détectée aux jours embryonnaires 9,5-10,5. Ceci induirait l'expression de *Mitf* et favoriserait donc la différenciation en mélanoblastes (Jin et al., 2001; Takeda et al., 2000). En revanche, un antagoniste de la voie Wnt, *Frzb-1*, est exprimé à des niveaux élevés dans les neuroblastes et glioblastes et à des niveaux faibles dans les mélanoblastes (Jin et al., 2001). La voie de signalisation Kit est également essentielle pour la différenciation en mélanoblaste. Alors que la répression de Kit entraîne une diminution de la migration et de la prolifération, son induction permet une augmentation du nombre de mélanocytes dans des cultures de cellules provenant de la crête neurale (Lahav et al., 1994; Thomas and Erickson, 2008). Une mutation hétérozygote de Kit chez l'humain mène au piébalisme, maladie caractérisée par des tâches de couleur blanche au niveau des cheveux et de la peau, dues à une absence de mélanocytes (Giebel and Spritz, 1991). De plus, la signalisation via la voie Kit, en combinaison avec l'expression de *MITF*, est nécessaire à l'activation de la tyrosinase dans les mélanoblastes (Hou and Pavan, 2008).

Enfin, le facteur de transcription FoxD3 (Forkhead box D3), exprimé dans certaines cellules de la crête neurale, est quant à lui capable de réprimer directement l'expression de *MITF* dans les mélanomes et les mélanoblastes aviaires en se liant à PAX3 pour empêcher ce dernier de se lier au promoteur de *MITF* (Thomas and Erickson, 2009). L'inhibition de FoxD3 est une étape critique dans la spécification des mélanoblastes depuis des précurseurs bipotents capables de générer des cellules gliales ou des mélanoblastes (Thomas and Erickson, 2008).

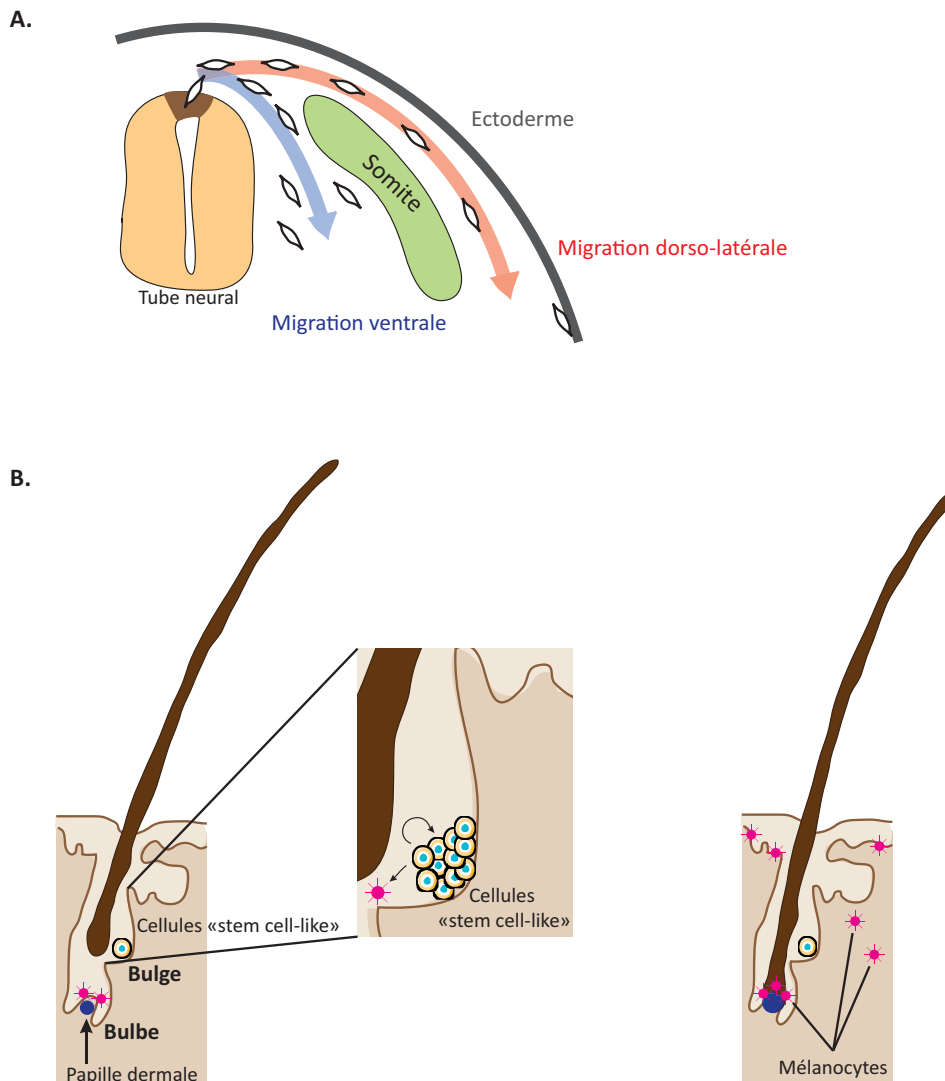


Figure 3 : Le développement des mélanocytes

A. La migration des mélanoblastes

Les cellules de la crête neurale migrent ventralement (bleu) ou dorso-latéralement (rouge). Elles expriment FoxD3, SOX10 et PAX3 avant la migration. SOX10 et PAX3 sont encore exprimés durant la délamination (ou détachement des cellules de la crête neurale) et la migration des mélanoblastes. Chez la souris, l'expression de c-Kit est induite avant la migration des mélanoblastes (Wilson et al., 2004). Quand les mélanoblastes quittent le tube neural, l'expression de FoxD3 est réprimée tandis que celle de Mitf est induite et reste exprimée durant la migration des cellules. L'expression de la tyrosinase se produit au moment de l'invasion de l'ectoderme chez les mammifères et les oiseaux. Dans ces mêmes espèces, les neuroblastes et glioblastes exprimant FoxD3 migrent ventralement.

Adapté de (Thomas and Erickson, 2008)

B. Les mélanocytes dans le follicule pileux

Les mélanoblastes qui atteignent le follicule pileux se différencient en mélanocytes producteurs de mélanine dans le bulbe et en cellules «stem cell-like» dans le «bulge» (ou renflement). Ces cellules «stem cell-like» quiescentes sont capables soit de s'auto-renouveler soit de donner naissance à de nouveaux mélanocytes différenciés.

Adapté de (Silver et al., 2006)

1.2.2. Les gènes régulés par MITF-M

Les différentes isoformes de MITF régulent de nombreux gènes dans les cellules dans lesquelles elles sont exprimées. En effet, MITF est capable de réguler certains gènes spécifiques des ostéoclastes ou des cellules mastocytaires (Hsiao and Fisher, 2014; Steingrimsdottir et al., 2004). Ici, nous nous focaliserons sur les gènes régulés par MITF-M dans les mélanocytes où ce facteur de transcription joue un rôle primordial à la fois dans la différenciation, la survie et la prolifération des cellules.

1.2.2.1. *Différenciation*

Afin de protéger l'ADN des cellules vis à vis des rayonnements UV, les mélanocytes produisent de la mélanine dans un compartiment cellulaire appelé mélanosome. Ils exportent ensuite la mélanine dans les kératinocytes grâce à leurs longs prolongements dendritiques qui s'infiltrant entre ces cellules (Das et al., 2001). L'étape limitante de la formation de la mélanine est régulée par la tyrosinase. Celle-ci catalyse l'oxydation de la tyrosine en dopaquinone, alors que TRP-1 et DCT sont impliquées dans des étapes en aval menant à la production d'eumélanine (Figure 4) (Das et al., 2001).

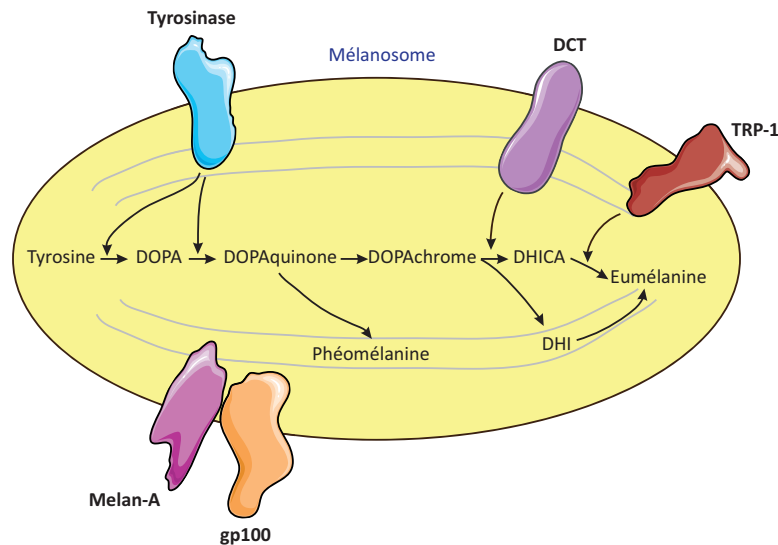


Figure 4 : Le mélanosome

La synthèse de mélanine se déroule dans le mélanosome et implique la participation de différentes enzymes. La tyrosinase réalise l'étape limitante d'oxydation de la tyrosine en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) qui est rapidement convertie en DOPAquinone, une structure instable qui peut donner naissance aux deux types de mélanines. La synthèse de phéomélanine, une mélanine jaune-rouge, nécessite la présence de cystéine. En revanche, lorsqu'il n'y a pas de cystéine disponible, la DOPAquinone se transforme spontanément en DOPAchrome puis, grâce à l'action de DCT et de TRP-1, en eumélanine brun-noir.

DHICA (acide carboxylique-DHI-2) - DHI (5,6-dihydroxyindole)

Adapté de (Das et al., 2001)

MITF-M est capable d'induire l'expression des enzymes clés de la mélanogenèse grâce à des « M-Box » présentes sur les promoteurs des gènes codant la tyrosinase, TRP-1 et DCT (Bertolotto et al., 1998; Yasumoto et al., 1994). En plus de la « M-Box », plusieurs sites de fixation pour le facteur de transcription SOX10 ont également été identifiés dans le promoteur du gène codant DCT et permettraient une activation synergique du promoteur en combinaison avec MITF-M dans les mélanocytes (Ludwig et al., 2004). De plus, un site de liaison pour LEF dans le promoteur du gène codant DCT permettrait également une activation de celui-ci via une association MITF-M/LEF (Schepsky et al., 2006). Enfin, MITF-M est également capable d'interagir directement avec la β -caténine pour activer des gènes cibles de MITF-M. En effet, l'association de la β -caténine avec MITF-M permet une induction plus importante de l'expression de la tyrosinase et de TRP-1 en détournant la β -caténine de ses gènes cibles de la voie canonique Wnt (Schepsky et al., 2006).

Cependant, bien que l'expression de MITF-M soit nécessaire à la régulation des gènes impliqués dans la mélanogenèse, elle n'est pas suffisante pour induire ces derniers (Gaggioli et

al., 2003). La présence d'autres facteurs non identifiés dans les mélanocytes ou un contexte chromatinien particulier serait nécessaire pour permettre l'expression de ces gènes (Gaggioli et al., 2003). Ceci permettrait également une expression restreinte des gènes de la mélanogenèse dans les mélanocytes, seules cellules présentant toutes les conditions nécessaires à leur expression.

MITF-M est également capable de réguler l'expression de *MLANA/MART1* ainsi que de *SILV/PMEL17/gp100* via des « E-Box » présentes dans leurs promoteurs (Du et al., 2003). Ces deux gènes donnent naissance à des protéines exprimées dans le mélanosome où Melan-A formerait un complexe avec gp100 et aurait un rôle dans l'expression, la stabilité et le processing de ce dernier. gp100, quant à lui, influencerait la structure de ce compartiment (Hoashi et al., 2005). De plus, l'expression de MC1R, lui-même impliqué dans la régulation de MITF-M, serait également régulé par MITF-M via des « E-Box » au niveau de son promoteur, induisant ainsi une boucle de régulation positive entre ces deux protéines (Aoki and Moro, 2002).

Enfin, MITF-M pourrait également jouer un rôle dans la morphologie dendritique des mélanocytes. La régulation du gène *snai2/slug* par mitf a été démontrée dans le Xénope (Kumasaka et al., 2005). Il a également été montré que l'expression de SNAI2 était corrélée positivement avec celle de MITF et que des niveaux élevés de SNAI2 étaient présents dans les naevi, plus faibles dans les mélanomes primaires et très faibles dans les mélanomes métastatiques humains (Shirley et al., 2012). La régulation potentielle de SNAI2 par MITF influencerait donc la morphologie des mélanocytes et mélanomes, peut-être via la régulation des E-cadhérines, des cibles connues de SNAI2. Cependant, l'expression de SNAI2 ne semble pas associée à celle des E-cadhérines dans les mélanomes, indiquant peut-être l'implication d'autres facteurs dans la régulation morphologique de ces cellules (Shirley et al., 2012). D'autre part, des niveaux faibles d'expression de MITF ne sont plus capables de stimuler l'expression de Dia1, une protéine impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Ceci favorise le potentiel invasif des cellules (Carreira et al., 2006).

1.2.2.2. *Survie*

MITF-M est également impliqué dans la survie des mélanoblastes et mélanocytes via la régulation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) grâce à une séquence « E-Box » localisée dans son promoteur (McGill et al., 2002). Ceci a été mis en évidence à l'aide des souris *Mitf*^{vit/+} et *Bcl2*^{+/-}. La mutation récessive « vit » pour « vitiligo » induit une diminution de l'affinité de liaison de Mitf à ses séquences cibles. Cependant, les souris *Mitf*^{vit/+} ne montrent pas de perte de mélanocytes (McGill et al., 2002). Les souris hétérozygotes *Bcl2*^{+/-} ne présentent également aucun phénotype. Cependant, le croisement de ces deux souches donne des animaux dont les mélanocytes disparaissent au fil du temps (McGill et al., 2002). Cette expérience montre donc la coopération nécessaire entre Mitf et son gène cible *Bcl-2* pour permettre la survie des mélanocytes. Enfin, il a également été démontré que MITF-M était capable de se lier au promoteur et d'induire l'expression de *Hif1α* (*Hypoxia inducible factor 1α*) dans des mélanocytes humains (Busca et al., 2005). Ce facteur de transcription serait ensuite capable d'induire l'expression de gènes anti-apoptotiques (Busca et al., 2005).

1.2.2.3. *Prolifération*

MITF-M a un rôle paradoxal en ce qui concerne la prolifération cellulaire. Il peut soit la favoriser soit l'inhiber.

Tout d'abord, des niveaux moyens d'expression de MITF-M induisent l'expression de CDK2 (Cyclin-Dependent Kinase 2), une protéine impliquée dans la transition G1/S du cycle cellulaire (Du et al., 2004). MITF-M est également capable de stimuler l'expression du récepteur aux facteurs de croissance c-Met dans les mélanocytes humains, favorisant ainsi la prolifération cellulaire (McGill et al., 2006). Enfin, MITF-M est également capable d'induire l'expression de TBX2 (T-Box transcription factor 2), un membre de la famille des facteurs de transcription T-box. Celui-ci serait nécessaire au maintien de la prolifération et supprimerait la sénescence en inhibant l'expression de p21 (Carreira et al., 2000; Vance et al., 2005).

En revanche, des niveaux élevés de MITF-M peuvent inhiber la prolifération afin de favoriser la différenciation des mélanocytes (Carreira et al., 2006). MITF-M induit alors l'expression de gènes codant des protéines ayant une activité anti-proliférative comme p16-INK4a qui, en empêchant la phosphorylation de la protéine Rb1 (Retinoblastoma-associated protein 1), provoque l'arrêt du cycle cellulaire (Loercher et al., 2005). De plus, MITF-M est également capable, non seulement de stimuler l'expression de p21, mais également de coopérer avec la

forme hypo-phosphorylée de Rb1 afin de favoriser cette activation transcriptionnelle menant à l'arrêt du cycle cellulaire (Carreira et al., 2005).

MITF-M peut donc jouer des rôles variés et parfois antagonistes dans les mélanocytes. Le modèle « rhéostat », proposé pour la première fois par l'équipe de Goding à l'université d'Oxford, permet de concilier ces différents rôles (Figure 5) (Carreira et al., 2006). Ce modèle montre que MITF-M est capable d'intégrer une large gamme de signaux influençant son activité et l'orientant vers une régulation particulière de gènes menant à l'apoptose, à la prolifération ou à la différenciation, en fonction de son niveau d'expression (Carreira et al., 2006). Si la notion de « niveau d'expression » de MITF-M est difficile à évaluer, d'autres facteurs tels que les modifications post-traductionnelles peuvent également favoriser la fixation de MITF sur un gène cible plutôt qu'un autre. Le modèle rhéostat permet donc de mieux comprendre pourquoi MITF-M régule des gènes différents en fonction du contexte dans lequel il se trouve, même si le mécanisme précis de cette régulation n'est pas encore totalement élucidé.

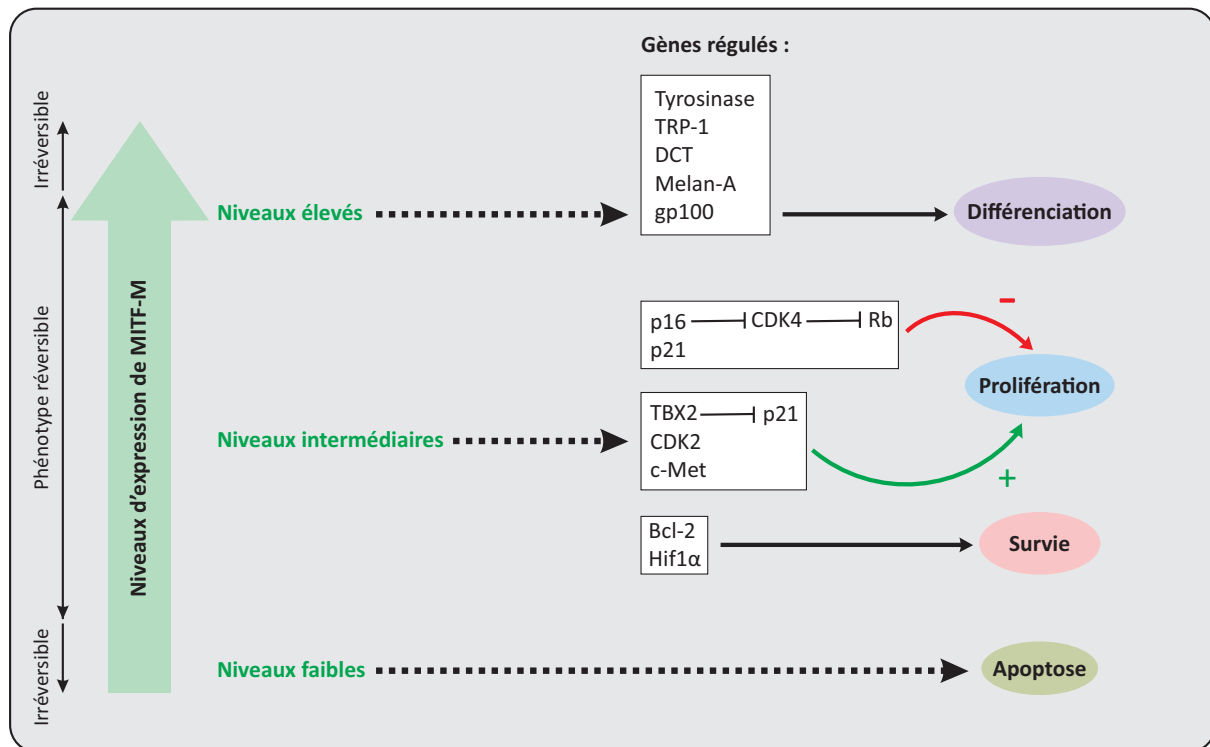


Figure 5 : Le modèle rhéostat

En absence d'expression de MITF-M dans les mélanocytes ou mélanoblastes, les cellules entrent en apoptose. Des niveaux faibles d'expression de MITF-M induisent un blocage des cellules en phase G1 ainsi que l'apparition de propriétés invasives tandis que des niveaux intermédiaires favorisent plutôt la prolifération des cellules et la perte de ce potentiel invasif. Enfin, des niveaux élevés d'expression de MITF-M stoppent la prolifération pour orienter les cellules vers un phénotype différencié en activant les gènes responsables de la mélanogenèse. Mis à part les phénotypes extrêmes représentés par l'apoptose et la différenciation complète, les phénotypes intermédiaires sont réversibles et peuvent varier au cours du temps en fonction des signaux régulant l'expression de MITF-M.

Adapté de (Carreira et al., 2006; Wellbrock et al., 2008)

1.2.3. Les maladies génétiques dues aux mutations de MITF

Plus de 25 mutations différentes du gène *Mitf* ont été identifiées chez la souris, dont la moitié sont récessives et n'engendrent donc un phénotype que dans les animaux homozygotes (Steingrímsson et al., 2004). Toutes les mutations de *Mitf* affectent les mélanocytes à des degrés variés. Dans la plupart des cas, les souris mutantes homozygotes pour *Mitf* sont microphthalmiques, montrent des défauts de pigmentation et une surdité due à l'absence de mélanocytes dans l'oreille interne (Steingrímsson et al., 2004; Tachibana, 2001). De plus, certaines mutations engendrent aussi des défauts au niveau des ostéoclastes menant parfois à de l'ostéopétrose (Hou and Pavan, 2008; Steingrímsson et al., 2004). L'étude de souris possédant des mutations au niveau du domaine de liaison à l'ADN, du domaine de dimérisation ou du domaine de transactivation de *Mitf* a permis d'identifier les différentes fonctions de cette protéine. Cependant, il existe également des mutations génétiques héréditaires de *MITF* chez l'humain, responsables de différentes maladies.

Le syndrome de Waardenburg (*Waardenburg Syndrome* ou *WS*) est ainsi dû à des mutations impliquant les facteurs de transcription *SOX10*, *MITF*, *PAX3* et *SNAI2* ainsi que les molécules de signalisation *EDNRB* (Endothelin Receptor type B) et *EDN3* (Pingault et al., 2010). Sa prévalence est estimée à 1/42.000 et ce syndrome est responsable d'environ 1-3% des surdités congénitales totales (Read and Newton, 1997). Les principaux symptômes associés au *WS* sont des anomalies de la pigmentation, de l'hétérochromie ainsi qu'une perte de l'audition dont la sévérité peut être variable (Pingault et al., 2010). De plus, quatre types de *WS* ont été décrits en fonction de la présence ou l'absence de certains symptômes, liés aux fonctions des gènes mutés induisant la maladie. Le type 1 et le type 3 sont dûs à des mutations dans le gène *PAX3*, le type 2 est causé principalement par des mutations au niveau de *MITF* et le type 4, aussi appelé Shah-Waardenburg, est associé à des mutations de *SOX10*, *EDN3* ou *EDNRB* (Figure 6) (Hou and Pavan, 2008; Pingault et al., 2010; Smith et al., 2000; Watanabe et al., 2002). Des mutations au niveau du gène *MITF* ont été détectées dans environ 15% des cas de *WS2*, dès lors appelés *WS2A* (Read and Newton, 1997). Ces mutations sont essentiellement hétérozygotes et se situent principalement au niveau des exons 7 et 8, soit au niveau des séquences codant les motifs basiques partagés par les différentes isoformes de *MITF*. Deux mutations provoquant un épissage erroné ont également été identifiées dans l'intron 1M, spécifique de l'isoforme *MITF-M* (Pingault et al., 2010; Read and Newton, 1997).

Le syndrome de Tietz est une maladie autosomale dominante associée soit à une délétion au niveau du résidu Arg217 dans la région basique de MITF, soit à une mutation ponctuelle transformant le résidu Asn210 en Lys210 (Smith et al., 2000). Ces mutations empêchent la liaison de la protéine mutée à l'ADN en agissant comme des formes dominantes négatives de MITF (Shibahara et al., 2001). Les symptômes comprennent une hypopigmentation importante ainsi qu'une surdité prononcée congénitale (Hou and Pavan, 2008; Shibahara et al., 2001; Smith et al., 2000). Ce syndrome a été décrit dans deux familles uniquement et se différencie du WS2 par une surdité congénitale et profonde avec une pénétrance complète, une hypopigmentation généralisée (et non sous forme de taches) et pas d'hétérochromie des yeux (Smith et al., 2000). En effet, chez les patients souffrant du syndrome de Tietz, même en cas de mutation hétérozygote, la protéine mutante MITF est capable de dimériser, soit avec une protéine sauvage, soit avec une protéine mutante. Dans tous les cas, le dimère résultant ne pourra fixer sa séquence cible que faiblement, ce qui rend cette mutation dominante négative. En revanche, dans le WS2, la protéine MITF mutée n'interfère pas avec la protéine sauvage, qui est alors capable d'avoir une activité fonctionnelle. Dans ce cas, le mécanisme responsable des symptômes est donc l'haploinsuffisance (Smith et al., 2000).

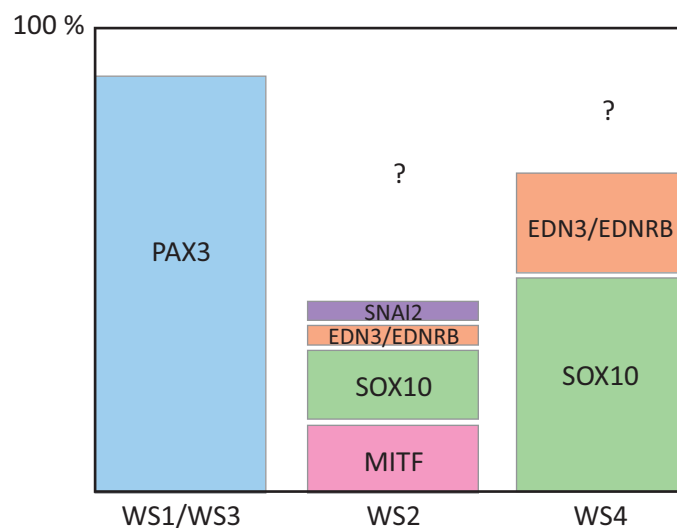


Figure 6 : Le syndrome de Waardenburg (WS)

Importance relative des mutations impliquées dans le développement des différents types de syndrome de Waardenburg. Le gène *MITF* est muté dans environ 15% des WS2 (appelés alors WS2A). La fréquence des mutations *EDN3/EDNRB* dans le WS2 est inférieure à 5% mais ces mutations ne sont pas assez fréquentes pour être plus précis.

Adapté de (Pingault et al., 2010)

1.3. MITF-M et mélanome

1.3.1. La transformation maligne du mélanome

La transformation des mélanocytes en mélanomes cutanés implique différentes phases au cours desquelles les cellules peuvent subir des modifications génétiques et épigénétiques (Figure 7). Durant la phase d'initiation, la prolifération anormale des mélanocytes permet l'apparition de naevi bénins ou dysplasiques ayant perdu le contact avec les kératinocytes. Ensuite, les cellules peuvent entrer en RGP (Radial Growth Phase), une phase durant laquelle elles deviennent capables de se diviser de manière horizontale sans toutefois pouvoir passer la lame basale. La transition entre la RGP et la VGP (Vertical Growth Phase) est une étape critique au cours de laquelle les cellules vont franchir la lame basale et envahir le derme. Les cellules en VGP seraient également moins dépendantes en facteurs de croissance exogènes. Finalement, les cellules peuvent entrer dans la dernière phase en passant dans la circulation sanguine ou lymphatique pour créer des métastases (Chin, 2003; Conde-Perez and Larue, 2014). Des analyses par microdamiers (microarrays) de cellules en VGP ont montré une induction de plusieurs gènes impliqués dans la chimiotaxie et les réponses inflammatoires, dans l'adhésion entre cellules et dans l'organisation de la matrice extracellulaire (Ryu et al., 2007). Par exemple, il a été observé une surexpression des gènes CXCL1, CXCL2, IL-8, IL-6 et MMP1 dans des cellules de mélanome en VGP par rapport à des cellules en RGP. La majorité de ces gènes sont également surexprimés dans les mélanomes métastatiques (Ryu et al., 2007). Il est à noter que les mélanomes métastatiques peuvent provenir à la fois de cellules en RGP ou en VGP. De même, seulement la moitié des mélanomes cutanés proviendrait de naevi, ce qui signifie que les mélanomes peuvent également surgir *de novo* dans la peau normale. Enfin, la progression du mélanome pourrait s'effectuer sans passer par toutes ces étapes (Zaidi et al., 2008).

Au niveau génétique, il a été démontré que 66% des mélanomes malins présentent une mutation activatrice de la protéine BRAF, une sérine/thréonine kinase présente dans la voie des MAP kinases et dont l'activation est normalement induite par des facteurs de croissance (Davies et al., 2002). Plus particulièrement, la mutation V600E est présente dans environ 90% des cas où la protéine est mutée (Davies et al., 2002). On peut également observer une mutation de NRAS mais seulement dans 20% des mélanomes (Davies et al., 2002; Goel et al., 2006). L'activation constitutive de la voie des MAP kinases qui en résulte va induire une croissance anormale des mélanocytes menant à la sénescence. Dès lors, sans modifications génétiques supplémentaires,

les lésions vont rester bénignes et ne vont pas évoluer vers un phénotype malin. En effet, la mutation de BRAF peut déjà être détectée dans 80% des naevi alors qu'une majorité d'entre eux ne progressera pas vers le mélanome (Pollock et al., 2003). Dès lors, pour permettre l'initiation du mélanome, cette étape de sénescence doit être contournée grâce à l'apparition d'autres lésions génétiques dans les cellules (Conde-Perez and Larue, 2014). La perte d'expression du locus *CDKN2A* codant les protéines p16-INK4a et p14-ARF impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, ou l'activation de la voie Wnt, qui réprime l'expression de p16-INK4a vont permettre le passage de l'étape de sénescence (Conde-Perez and Larue, 2014; Hoek and Goding, 2010). De même, la perte de l'expression du gène suppresseur de tumeur *PTEN* a également été impliquée dans la phase d'initiation du mélanome (Conde-Perez and Larue, 2014; Goel et al., 2006). En revanche, contrairement à d'autres cancers, les mélanomes ne montrent que peu de mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* (Gembarska et al., 2012). Cependant, l'expression de ce gène pourrait être inhibée dans les mélanomes via une voie impliquant MDM4, un régulateur négatif de la fonction de p53. En effet, MDM4 serait surexprimé dans environ 60% des mélanomes humains, ce qui favoriserait la survie et la prolifération des cellules en réprimant la fonction de p53 (Gembarska et al., 2012). Après être passé à travers l'étape de sénescence, le mélanome peut progresser en phase radiale RGP (Hoek and Goding, 2010).

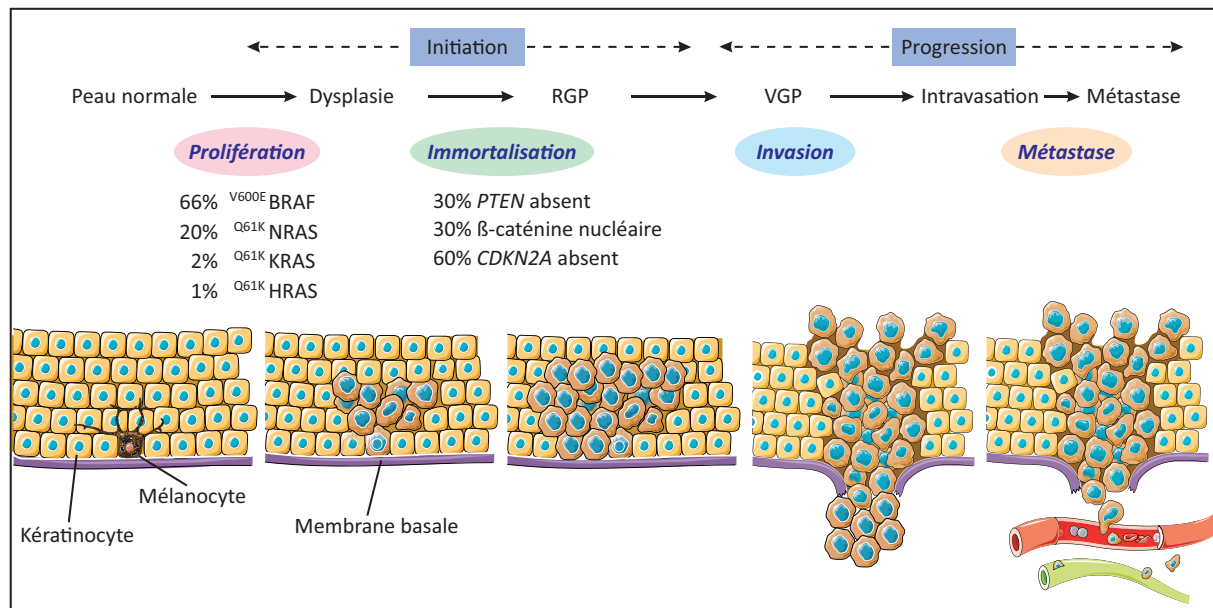


Figure 7 : Représentation schématique du développement du mélanome

Le développement du mélanome comprend deux processus majeurs : l'initiation et la progression. Durant l'étape d'initiation, les protéines de la voie des MAPK (BRAF, NRAS, HRAS, KRAS) sont impliquées dans la prolifération. Les protéines de la voie PI3-Kinase (PTEN), de la voie Wnt (β -caténine) et les produits du gène *CDKN2A* (p16-INK4a et p14-ARF) sont, quant à eux, impliqués dans le contournement de l'étape de sénescence.

RGP, Radial Growth Phase ; VGP, Vertical Growth Phase

Adapté de (Conde-Perez and Larue, 2014)

1.3.2. Rôle de MITF-M dans le mélanome

Le rôle de MITF-M dans le développement et la progression du mélanome est complexe étant donné les nombreux gènes qu'il régule. L'amplification génétique du locus *MITF* a été observée dans 10% des mélanomes primaires et 20% des mélanomes métastatiques (Garraway et al., 2005). Cependant, les mélanomes sont formés d'une population hétérogène de cellules qui peuvent exprimer MITF-M à des niveaux très variés. Plusieurs études montrent que les cellules de mélanome peuvent être divisées en deux populations distinctes : une première population comprenant des cellules exprimant peu de MITF-M et associées à un phénotype invasif et une deuxième population contenant des cellules exprimant des niveaux plus élevés de MITF-M et associées à un phénotype prolifératif (Eichhoff et al., 2010; Goodall et al., 2008; Hoek et al., 2008). Si ces deux populations sont capables d'induire des tumeurs chez des souris, l'analyse des mélanomes induits montre que ceux-ci peuvent présenter les deux types de phénotype après induction. Ceci suggère que les cellules de mélanome sont capables de changer de phénotype en fonction du microenvironnement (Hoek et al., 2008).

Les voies de régulation canonique et non canonique de Wnt, capables de réguler l'expression de MITF-M ont été impliquées dans le développement des mélanomes. Il a ainsi été montré que les patients porteurs de mélanomes fortement métastatiques exprimant peu de MITF-M montraient également des niveaux élevés de ligand Wnt5a, alors que les patients porteurs de mélanomes moins agressifs exprimaient peu de Wnt5a et des niveaux élevés de MITF-M (Hoek et al., 2006). Si la voie Wnt non canonique est donc associée à l'agressivité, en revanche, l'activation de la voie canonique de Wnt via le ligand Wnt3a diminue la capacité des cellules de mélanome à former des métastases et augmente leur pigmentation, en activant les gènes responsables de la mélanogenèse (Chien et al., 2009). De plus, des niveaux élevés de β -caténine dans le noyau, à la fois dans des mélanomes primaires ou des métastases, sont corrélés avec une diminution d'expression de marqueurs de prolifération ainsi qu'une amélioration du pronostic vital (Chien et al., 2009). Enfin, il a également été démontré que, dans un échantillon de 65 mélanomes malins humains, seulement 1/3 montraient une localisation nucléaire de la β -caténine. Parmi ceux-ci, un seul cas présentait une mutation d'une sérine phosphorylable de la β -caténine en proline, empêchant sa dégradation (Rimm et al., 1999). La β -caténine favoriserait également l'immortalisation des mélanocytes en réprimant la transcription de *p16-INK4a*. Ceci, conjointement à une activation de la voie des MAP kinases, mènerait à l'apparition du mélanome (Delmas et al., 2007). La voie Wnt canonique et la β -caténine seraient donc

impliquées dans le développement des mélanomes mais leur activation prolongée favorisant la différenciation et diminuant la capacité des tumeurs à former des métastases serait favorable pour le patient. En revanche, l'activation de la voie non canonique Wnt5a dans les mélanomes favoriserait l'apparition des métastases.

Récemment, une étude a pu analyser le rôle de MITF dans le mélanome en fonction de son niveau d'expression grâce à un modèle de knock-out conditionnel dans le poisson zèbre (Lister et al., 2014). En effet, le poisson zèbre possède uniquement deux isoformes de *mitf* codés par deux gènes (a et b) dont *mitf-a* est le seul essentiel au développement des mélanocytes. En inactivant uniquement *mitf-a*, l'activité de *mitf* n'est pas perdue dans les autres types cellulaires. Ceci rend l'analyse des mutants moins compliquée chez le poisson zèbre que chez la souris. Dans ce modèle de poisson zèbre, l'allèle hypomorphique *mitfa*^{vc7} contient une mutation dans un site accepteur d'épissage, ce qui réduit le niveau de transcrits correctement épissés (Johnson et al., 2011). Cette mutation est conditionnelle, dépendante de la température. Lorsque des poissons portant cette mutation se trouvent dans une eau à moins de 26°C, ils développent un nombre réduit de mélanocytes tandis qu'ils n'en développent quasiment aucun dans une eau à plus de 28°C. Des températures intermédiaires permettent la présence d'un nombre normal de mélanocytes. Le croisement de ces poissons zèbres avec une lignée transgénique exprimant ^{V600E}braf a permis d'analyser le rôle de *mitf* dans le mélanome lorsqu'il est exprimé à un niveau normal, faible ou quasiment nul. Si la perte quasi-complète de *mitf* permet aux poissons de ne pas développer de mélanome, sa simple diminution, au contraire, permet le développement de tumeurs dans 27% des cas. Ce pourcentage est comparable à celui obtenu dans des poissons zèbres portant une mutation inactivant p53 associée à la mutation ^{V600E}braf (Lister et al., 2014). Dans ces poissons zèbres, l'activité de *mitf* est donc réduite mais suffisante pour activer les gènes cibles impliqués dans la prolifération et la survie (*cdk2*, *p16*, *p21*, *bcl-2*, *hif1α*), mais pas ceux impliqués dans la mélanogenèse (*tyr* et *dct*) (Lister et al., 2014).

En ce qui concerne le rôle de *mitf* dans le maintien des mélanomes, la même équipe a pu démontrer que, lorsqu'ils inhibaient totalement l'activité de *mitf* dans des poissons zèbres ayant préalablement développé des mélanomes en condition de faible expression de *mitf*, les tumeurs régressaient. Cette régression était associée à une activité caspase élevée. Cependant, lorsque *mitf* était réexprimé à de faibles niveaux après cette phase de régression, on observait une réapparition des tumeurs qui colonisaient à nouveau le site originel. Ceci pouvait être dû soit à une régression incomplète des tumeurs primaires, soit à la présence de cellules de mélanomes

n'exprimant presque pas de *mitf*, quiescentes et capables de régénérer la tumeur dès que l'expression de *mitf* devenait suffisante (Lister et al., 2014).

Ces résultats sont en accord avec le modèle rhéostat qui prédit que des niveaux très faibles de MITF favorisent l'apoptose, des niveaux intermédiaires permettent la prolifération des cellules et des niveaux élevés induisent leur différenciation. Cette étude nous montre donc que, pour se développer et proliférer chez le poisson zèbre, les mélanomes doivent maintenir une activité de *mitf* compatible avec l'activation des gènes cibles impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. Ceci nécessite un niveau d'expression de *mitf* intermédiaire. En effet, des niveaux d'expression trop élevés de *mitf* favorisent un arrêt du cycle cellulaire et une différenciation accrue alors que des niveaux trop faibles d'expression de *mitf* induisent l'apoptose (Lister et al., 2014). Dès lors, l'amplification génétique du locus *MITF* observée dans certains mélanomes servirait peut-être à garantir une expression suffisante de ce gène dans ces cellules afin d'éviter l'apoptose consécutive à un niveau trop faible d'expression de MITF-M (Garraway et al., 2005; Lister et al., 2014).

2. Les microARNs et leurs rôles dans le mélanome

2.1 Les microARNs

Les miRNAs (microARNs) sont de petits ARN simple brin endogènes de 19 à 25 nucléotides de long, capables de réguler un ARNm (ARN messenger) cible de manière post-transcriptionnelle en induisant sa dégradation ou en inhibant sa traduction. Un seul miRNA est capable de cibler jusqu'à des centaines d'ARNm et un même ARNm peut être régulé par plusieurs miRNAs (Krol et al., 2010). Dès lors, ces petits ARN participent à la régulation de presque tous les mécanismes cellulaires investigués jusqu'à présent (Krol et al., 2010). Il a été suggéré que les miRNAs régulaient l'expression de plus de 50% de tous les gènes codants chez les mammifères (Krol et al., 2010; Siomi and Siomi, 2010).

2.1.1 La synthèse des microARNs

Les miRNAs sont transcrits principalement par l'ARN polymérase de type II sous forme de précurseurs appelés pri-miRNAs (Figure 8). Ils proviennent de gènes indépendants ou d'introns contenus dans des gènes codant d'autres protéines (Krol et al., 2010; Siomi and Siomi, 2010). Le pri-miRNA est une molécule d'ARN se repliant sur elle-même, prenant ainsi une structure en épingle à cheveux qui est clivée par l'enzyme Drosha dans le noyau. Cette coupure libère alors uniquement l'épingle à cheveux d'environ 70 nucléotides appelée pré-miRNA. Le pré-miRNA est ensuite exporté dans le cytoplasme où il subit un deuxième clivage par l'enzyme Dicer qui coupe la « boucle » de l'épingle à cheveux pour libérer un ARN double brin d'environ 20 nucléotides (Ha and Kim, 2014; Krol et al., 2010; Siomi and Siomi, 2010). Le brin formé par le miRNA mature de ce duplex s'associe ensuite avec le complexe protéique miRISC (miRNA-Induced Silencing Complex) composé entre autres de la protéine Ago (Argonaute) qui lie le miRNA pour aller ensuite se fixer sur un ARNm cible (Ha and Kim, 2014; Krol et al., 2010; Siomi and Siomi, 2010; Wu and Belasco, 2008). Le brin correspondant au miRNA mature est généralement celui possédant la plus faible stabilité de liaison au niveau des bases en 5' dans le duplex (Krol et al., 2010; Siomi and Siomi, 2010).

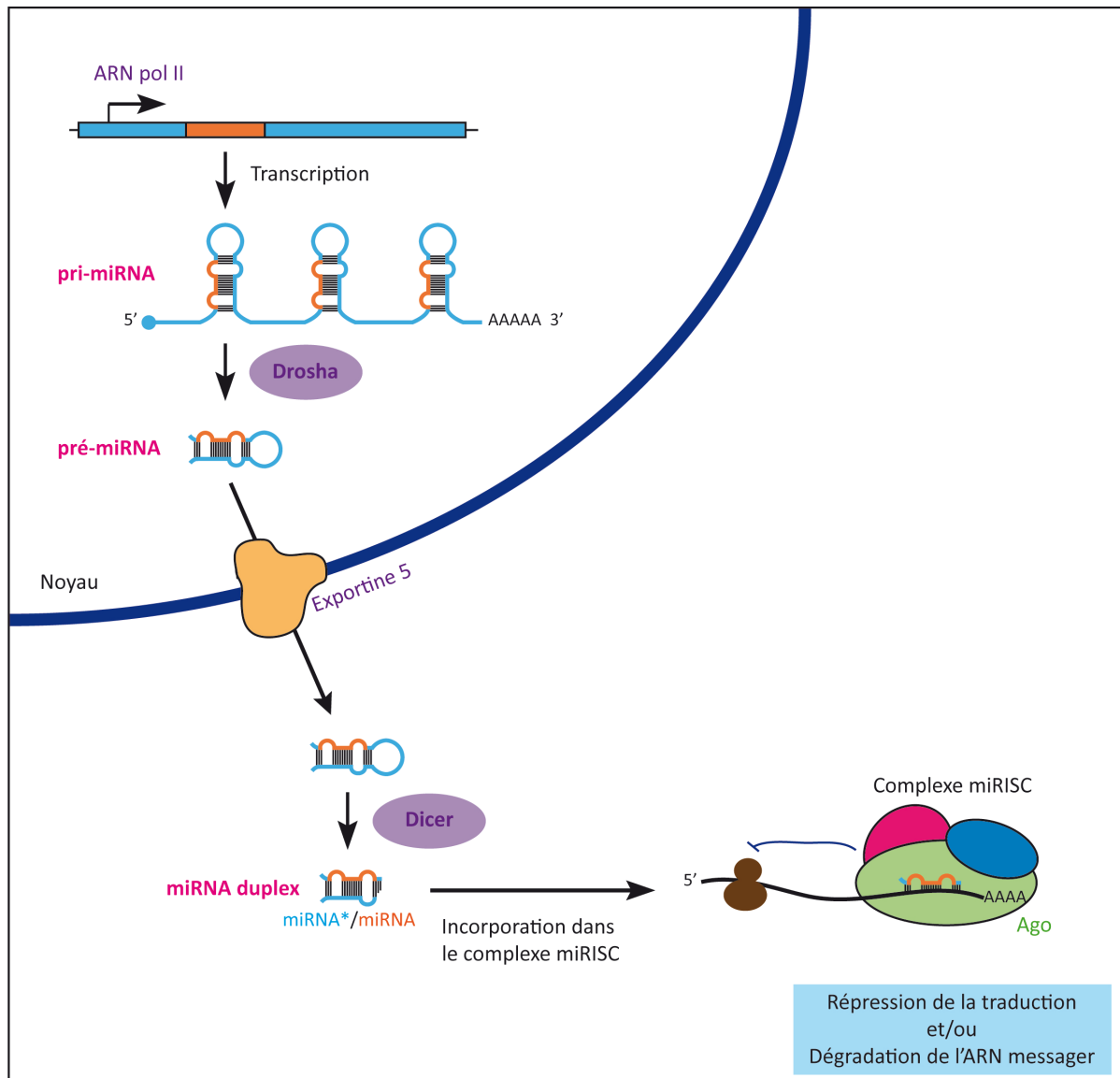


Figure 8 : La voie canonique de formation des miRNAs

Les miRNAs sont transcrits sous la forme de précurseurs appelés pri-miRNAs principalement par l'ARN polymérase II. Le pri-miRNA est alors clivé par la RNase III Drosha en pré-miRNA, une molécule exportée hors du noyau par l'exportine 5, un récepteur de transport nucléaire. Dans le cytoplasme, le pré-miRNA subit ensuite un 2ème clivage par une autre RNase III, appelée Dicer, qui libère un duplex miRNA*/miRNA. Le brin correspondant au miRNA mature est ensuite préférentiellement incorporé dans le complexe miRISC qui peut alors se fixer sur un ARNm cible dont il inhibe la traduction ou induit la dégradation. L'autre brin du duplex, le miRNA*, est alors libéré et dégradé.

Adapté de (Krol et al., 2010)

2.1.2 Les mécanismes de répression des ARNm cibles

Les miRNAs sont complémentaires de séquences situées principalement dans le 3'UTR (3' Untranslated Region ou Région 3' non traduite) des ARNm (Majoros and Ohler, 2007; Siomi and Siomi, 2010). La reconnaissance d'un ARNm cible par le complexe miRISC va induire, soit la répression de la traduction, soit la dégradation de cet ARNm (Figure 9) (Krol et al., 2010). Il était auparavant admis qu'un miRNA parfaitement complémentaire à son ARNm cible induisait un clivage de l'ARNm menant à sa dégradation alors qu'un miRNA non parfaitement complémentaire inhibait la traduction de son ARNm cible. Cependant, il a été démontré que tous les miRNAs pouvaient induire une dégradation de leurs ARNm cibles et/ou une répression de la traduction (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Enfin, un appariement parfait entre les nucléotides 2 à 8 du miRNA, aussi appelée région « seed », et le 3'UTR de l'ARNm cible serait un déterminant majeur du processus de reconnaissance de l'ARNm par le miRNA (Thomas et al., 2010; Xiao and Rajewsky, 2009). Cependant, certains miRNAs n'obéiraient pas à cette règle et pourraient se lier à une séquence cible ne possédant pas de complémentarité parfaite avec la région « seed » du miRNA (Chi et al., 2012).

Les mécanismes par lesquels les miRNAs répriment la traduction de leurs ARNm cibles sont variés et ne sont peut-être pas encore tous identifiés. Certaines études montrent que les miRNAs inhiberaient l'initiation de la traduction grâce à une compétition entre le complexe miRISC et la protéine eIF4E pour la liaison de la coiffe de l'ARNm ou via l'empêchement de l'association des deux sous-unités du ribosome (Wu and Belasco, 2008). D'autres études suggèrent que le blocage de la traduction se produirait à un stade plus tardif en favorisant une terminaison précoce de la traduction ou en induisant la dégradation des peptides naissants (Wu and Belasco, 2008).

Les miRNAs parfaitement complémentaires de leur ARNm cible vont favoriser leur dégradation en induisant un clivage dans la région qu'ils ont fixée grâce à l'endonucléase Ago présente dans le complexe miRISC (Wu and Belasco, 2008). Cette coupure va rapidement mener à la destruction de l'ARNm en créant deux extrémités d'ARN non protégées des clivages des exonucléases présentes dans les cellules. Cependant, les miRNAs non parfaitement complémentaires sont également capables de favoriser la dégradation de leur ARNm cible en induisant la perte de leur queue poly-A (Wu et al., 2006). La perte de la queue poly-A va engendrer la perte de la coiffe de l'ARNm, ce qui va également exposer l'ARNm aux exonucléases et induire sa dégradation (Wu and Belasco, 2008).

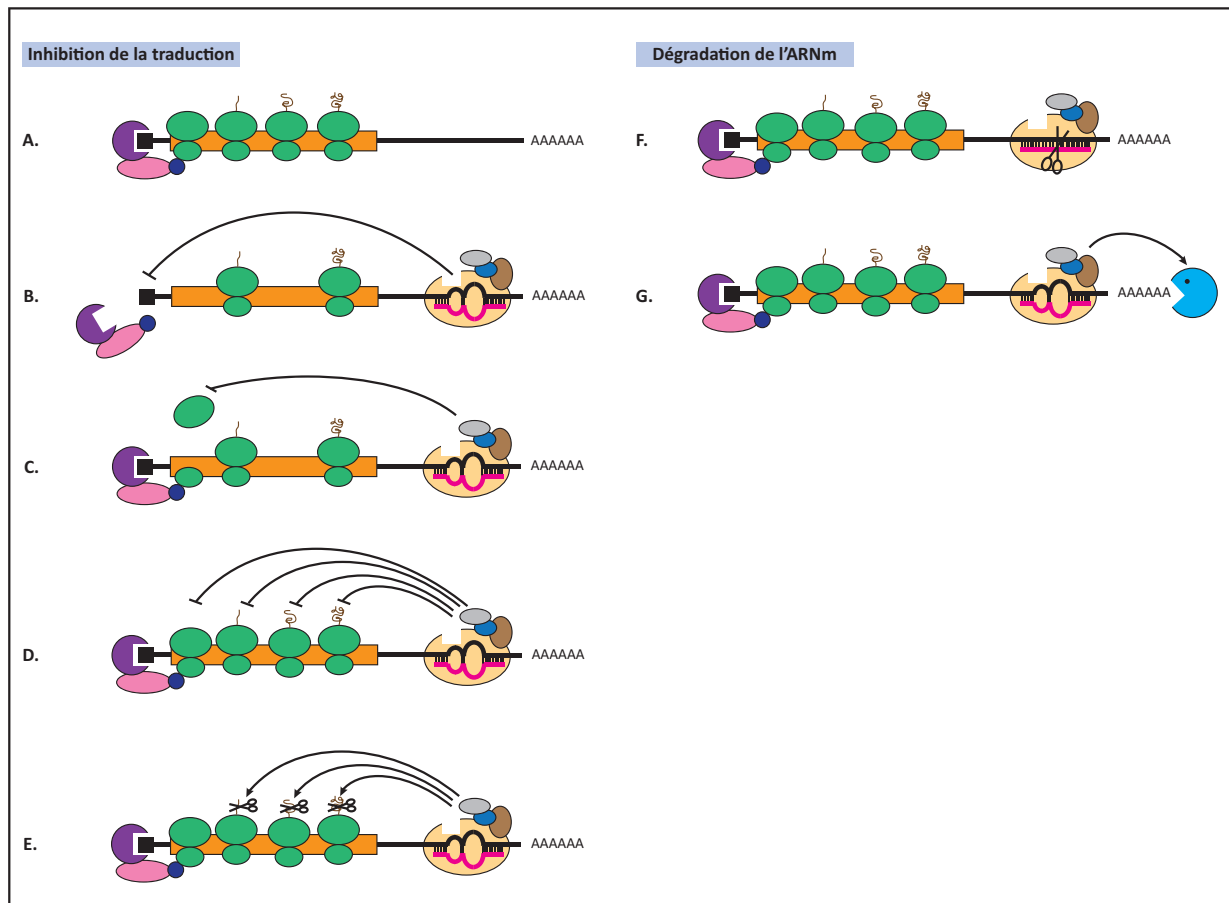


Figure 9 : Les mécanismes de répression des ARNm par les miRNAs

A. Un ARNm normalement traduit en absence de liaison d'un miRNA.

Le carré noir représente la coiffe, le rectangle orange représente la région codante de l'ARNm, les ribosomes sont colorés en vert, les polypeptides naissants sont représentés en brun et la sous-unité eIF4E du complexe de liaison à la coiffe est colorée en mauve.

B. Inhibition de l'initiation de la traduction par la compétition entre le complexe miRISC et eIF4E pour la liaison de la coiffe. miRISC est représenté comme un complexe ribonucléoprotéique comprenant un miRNA (en rose), Ago (en beige) et d'autres sous-unités protéiques.

C. Inhibition de l'initiation de la traduction par l'empêchement de l'association des deux sous-unités du ribosome.

D. Inhibition de l'élongation de la traduction due à la terminaison précoce des peptides naissants.

E. Inhibition de la traduction due à la dégradation des peptides naissants.

F. Dégradation d'un ARNm par un miRNA parfaitement complémentaire via un clivage endonucléolytique de l'ARNm par Ago.

G. Dégradation d'un ARNm par un miRNA non parfaitement complémentaire via l'induction de la perte de la queue poly-A.

Adapté de (Wu and Belasco, 2008)

2.2 Les microARNs dans les mélanocytes et mélanomes

2.2.1 Rôle des miRNAs dans les mélanocytes et mélanomes

De nombreux miRNAs sont impliqués dans la régulation de la fonction des mélanocytes et cellules de mélanome. En effet, MITF-M pourrait induire la transcription de *DICER* durant la différenciation des mélanocytes, ce qui permettrait une surexpression de certains miRNAs matures à partir d'une même quantité de pré-miRNAs (Levy et al., 2010). *DICER* est essentiel à la survie des mélanocytes, entre autres via la stimulation de la synthèse du cluster des miRNAs 17-92 qui ciblent *BIM*, un gène codant une protéine pro-apoptotique impliquée dans la survie de ces cellules (Levy et al., 2010). Des analyses de séquençage exhaustif ont également permis d'identifier une série de miRNAs exprimés uniquement dans le lignage mélanocytaire et qui pourraient donc avoir un rôle dans le développement de ces cellules (Stark et al., 2010).

Cependant, la régulation incorrecte de certains miRNAs peut être associée avec de nombreuses pathologies dont certains cancers (Bell and Levy, 2011; Krol et al., 2010). Cette régulation aberrante des miRNAs peut être due à des modifications génétiques ou épigénétiques menant à une expression trop faible ou trop forte des gènes donnant naissance aux miRNAs ou à un dysfonctionnement dans la machinerie de production des miRNAs (Bell and Levy, 2011). De nombreuses études ont été réalisées afin de comparer les profils d'expression des miRNAs dans les naevi, mélanomes primaires ou mélanomes métastatiques. Un résumé des résultats de plusieurs de ces études a été réalisé par Bell et Levy (Bell and Levy, 2011). Par exemple, miR-221 et miR-222 seraient surexprimés dans les mélanomes où ils inhiberaient l'expression de p27Kip1, un inhibiteur de CDK, ainsi que du récepteur c-Kit. Ceci induirait une augmentation de la prolifération ainsi qu'une capacité d'invasion et de migration accrue en même temps qu'un arrêt de la différenciation des cellules (Felicetti et al., 2008). Un autre exemple est miR-21, un miRNA surexprimé dans de nombreux cancers, dont les mélanomes (Yang et al., 2011). Dans ces cellules, miR-21 est capable de réprimer l'expression des gènes suppresseurs de tumeur *PTEN* et *PDCD4* ainsi que du gène codant la protéine anti-proliférative BTG2, favorisant ainsi la prolifération, la survie et l'invasion (Yang et al., 2011).

2.2.2 Les microARNs ciblant *MITF*

Plusieurs études ont identifié des miRNAs capables de cibler *MITF*. Elles ont été résumées dans le tableau n°1. MITF-M stimule également l'expression de miR-211, un miRNA présent dans l'intron de *TRPM1*, un de ses gènes cibles (Boyle et al., 2011; Margue et al., 2013). miR-211 est ensuite capable de réprimer l'expression du gène codant BRN-2, un facteur de transcription inhibiteur de l'expression de MITF-M (Boyle et al., 2011; Margue et al., 2013).

Tableau 1 : Les différents miRNAs ciblant *MITF*

miRNA	Type cellulaire dans lequel le miRNA a été identifié	Référence
miR-25	Mélanocytes d'Alpaga (<i>Lama Pacos</i>)	Zhu et al., 2010
miR-96	Rétine murine	Xu et al., 2007
miR-101	Mélanomes humains	Luo et al., 2013a
miR-137	Mélanomes humains	Bemis et al., 2008
miR-148	Mélanomes humains	Haflidadottir et al., 2010
miR-155	Cellules monocytaires murines	Mann et al., 2010
miR-182	Mélanomes humains	Segura et al., 2009
miR-218	Mélanocytes murins immortalisés Culture organotypique de peau humaine pigmentée	Guo et al., 2014
miR-340	Mélanomes humains	Goswami et al., 2010
miR-539 / miR-381	Cellules mastocytaires murines	Lee et al., 2011
miR-675	Mélanocytes humains	Kim et al., 2014

La fonction de certains de ces miRNAs a été étudiée. Il a ainsi été mis en évidence, dans des mélanocytes d'Alpaga, une corrélation inverse entre l'expression de *MITF* et de miR-25 dans des échantillons de peau provenant d'animaux blancs comparés à des animaux bruns (Zhu et al., 2010). De même, dans des mélanocytes murins immortalisés, l'expression de miR-218 inhibe l'expression de Mitf. Ceci réprime l'expression de la tyrosinase et inhibe la mélanogenèse, ce qui induit alors la dépigmentation des cellules (Guo et al., 2014). miR-675 serait, quant à lui, induit dans des fibroblastes et transféré dans les mélanocytes par des exosomes (Kim et al., 2014). Dans les mélanocytes, il réprimerait l'expression de MITF-M et des enzymes impliquées dans la mélanogenèse (Kim et al., 2014).

Le miR-137 est le premier miRNA ciblant *MITF* à avoir été identifié dans une lignée de mélanome humain (Bemis et al., 2008). Plusieurs études se sont ensuite intéressées à son rôle dans ces cellules. Une première étude suggère que l'expression de miR-137 diminuerait la prolifération des cellules de mélanome uvéal humain en réprimant l'expression de MITF et CDK6

(Chen et al., 2011). Une autre étude suggère que miR-137 inhiberait la prolifération de cellules de mélanome humain en ciblant les gènes *MITF*, *c-Met*, *YB1* et *EZH2* (Luo et al., 2013b). De plus, il réprimerait l'invasion et la migration de ces cellules en inhibant l'expression de *c-Met*, *YB1* et *EZH2* (Luo et al., 2013b). L'expression de miR-182 a également été étudiée dans des lignées de mélanome et des tissus humains dans lesquels il serait fréquemment surexprimé par rapport à des mélanocytes en culture (Segura et al., 2009). Il favoriserait la migration des cellules *in vitro* et augmenterait leur potentiel métastatique *in vivo*, chez la souris. Selon les auteurs, ces différents effets seraient liés à la répression de l'expression de MITF-M et de FOXO3 (Segura et al., 2009). L'expression de miR-101 a été analysée dans des lignées de mélanome humain. Dans ces cellules, il inhiberait la prolifération et l'invasion *in vitro* en réprimant l'expression de MITF-M et EZH2 (Luo et al., 2013a). Enfin, si miR-148 et miR-340 ont été identifiés comme ciblant le gène *MITF* dans les mélanomes, leur rôle dans ces cellules n'a pas encore été étudié (Goswami et al., 2010; Hafliadottir et al., 2010).

Certains miRNAs ciblant MITF ont été identifiés dans d'autres types cellulaires que les mélanocytes ou les cellules de mélanome. La répression de l'expression de *Mitf* par miR-96 a ainsi été identifiée dans la rétine, chez la souris (Xu et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que miR-96 participerait au développement des différents types cellulaires en inhibant *Mitf* dans les cellules ne se différenciant pas en RPE (Xu et al., 2007). Ensuite, il a été montré que miR-155 réprimait l'expression de *Mitf* dans des précurseurs monocytaires, permettant ainsi leur différenciation en macrophages plutôt qu'en ostéoclastes (Mann et al., 2010). Enfin, l'expression de miR-539 et miR-381 serait réprimée par un signal induit par Kit afin de ne pas inhiber l'expression de *Mitf* dans des cellules mastocytaires murines normales ou cancéreuses (Lee et al., 2011). Ceci pourrait favoriser la prolifération de ces cellules.

3. L'inflammation et le microenvironnement tumoral

3.1 L'inflammation

Lors d'un traumatisme ou d'une infection, un réseau complexe de signaux permet l'initiation d'une réponse de l'organisme afin de guérir les tissus (Coussens and Werb, 2002; Landskron et al., 2014). Cette réponse inflammatoire implique le recrutement de leucocytes émigrant du système sanguin vers le site endommagé grâce à l'expression de chémokines (Coussens and Werb, 2002). L'inflammation normale, par exemple associée à la guérison d'une blessure, est un phénomène limité dans le temps. Cependant, une mauvaise régulation d'un ou plusieurs facteurs contrôlant ce processus peut mener à une inflammation chronique. Celle-ci peut être responsable du développement de pathologies, comme la maladie de Crohn par exemple, et favoriser une progression vers le cancer (Coussens and Werb, 2002; Landskron et al., 2014; Schirbel and Fiocchi, 2010).

3.2 L'inflammation dans le microenvironnement tumoral

L'établissement d'un microenvironnement tumoral inflammatoire peut être initié de plusieurs manières différentes. Tout d'abord, l'infection ou l'inflammation chronique par des bactéries ou des virus peut favoriser le développement de certains cancers comme le cancer de l'estomac associé à l'infection par *Helicobacter pylori*, par exemple (Mantovani et al., 2008). D'autre part, la présence d'un environnement tumoral inflammatoire peut également être due aux modifications génétiques impliquées dans le développement tumoral. Celles-ci peuvent, en effet, stimuler la production de chémokines ou cytokines pro-inflammatoires (Mantovani et al., 2008). C'est ainsi qu'il a été démontré que l'activation de la voie Ras-Raf par la mutation ^{V600E}BRAF stimulerait la production de différentes cytokines par les cellules de mélanome. Les cytokines détectées sont l'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-10, qui joue également un rôle pro-tumoral par son effet immunosuppresseur sur les cellules dendritiques et les macrophages, et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un facteur de croissance stimulant l'angiogenèse dans les tumeurs (Sumimoto et al., 2006). L'activation de Ras permettrait également l'expression d'IL-8, favorisant ainsi la vascularisation tumorale (Sparmann and Bar-Sagi, 2004).

De plus, l'infiltration du microenvironnement tumoral par des cellules immunitaires et du stroma, sécrétant de nombreuses cytokines, joue également un rôle prépondérant dans la

stimulation de l'inflammation. Enfin, les cellules tumorales, dont les mélanomes, peuvent elles-mêmes produire certaines cytokines comme l'IL-1 α ou β , via une dérégulation des mécanismes impliqués dans le contrôle de la production de ces cytokines (Bennicelli et al., 1989; Elaraj et al., 2006; Kholmanskikh et al., 2010).

3.2.1 Les macrophages comme source principale de l'inflammation dans le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est composé de cellules du stroma (constitué principalement de fibroblastes), de cellules immunitaires infiltrées et de cellules tumorales (Landskron et al., 2014). Les cellules tumorales produisent de nombreuses cytokines et chémokines capables de recruter des leucocytes qui vont également sécréter des cytokines et médiateurs (Coussens and Werb, 2002; Komohara et al., 2014). Si les neutrophiles, et parfois les éosinophiles, sont les premières cellules recrutées, les macrophages représentent la source principale de facteurs de croissance et cytokines dans le microenvironnement tumoral (Coussens and Werb, 2002).

Les TAMs (Tumor-Associated Macrophages ou Macrophages associés aux tumeurs) ont donc un rôle prépondérant dans l'évolution des tumeurs (Figure 10). En fonction du microenvironnement dans lequel ils se trouvent, ils peuvent s'orienter vers deux phénotypes distincts : le phénotype classique M1, induit par des produits bactériens activant les TLR (Toll-Like Receptors) ou l'IFN- γ (Interféron- γ), et le phénotype alternatif M2, induit par l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 ou le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) (Chanmee et al., 2014; Heusinkveld and van der Burg, 2011; Qian and Pollard, 2010). Les macrophages M1 expriment des niveaux élevés de molécules MHC (Major Histocompatibility Complex ou Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de type II, leur permettant de présenter des antigènes aux lymphocytes T CD4. De plus, ils peuvent phagocyter et détruire des cellules infectées, entre autres par la production de ROS (Reactive Oxygen Species ou Espèces réactives de l'oxygène) et d'oxyde nitrique. Ils orientent les lymphocytes T CD4 vers une réponse Th1 en produisant de l'IL-12 et sécrètent du TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) (Heusinkveld and van der Burg, 2011; Qian and Pollard, 2010). La réponse Th1 est considérée comme plus efficace dans le cadre de l'immunité anti-tumorale que la réponse Th2. En revanche, les macrophages M2 expriment des quantités élevées d'IL-10, IL-1 β , VEGF et MMP (Métalloprotéinases Matricielles) et favorisent une réponse immunitaire Th2 (Heusinkveld and van der Burg, 2011; Qian and Pollard, 2010). Les TAMs

présents dans la majorité des tumeurs ont généralement un phénotype M2 (Mantovani et al., 2008).

En produisant de nombreuses cytokines dont l'IL-8, l'IL-1 β , le TNF- α , le TGF- β et l'IL-10, des facteurs de croissance tels que le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), le HGF (Hepatocyte Growth Factor), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), et l'EGF (Epidermal Growth Factor), ou des MMPs, ces TAMs influencent l'invasion et les métastases, l'angiogenèse ainsi que la réponse immunitaire (Coussens and Werb, 2002; Komohara et al., 2014; Stout et al., 2005).

Par exemple, les TAMs peuvent favoriser la migration des cellules tumorales dans un modèle de carcinome chez la souris en induisant l'expression d'EGF et de MMP (Komohara et al., 2014; Wyckoff et al., 2004). Les TAMs permettraient également la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en induisant l'expression de molécules impliquées dans l'angiogenèse telles que le VEGF (Torisu et al., 2000). Enfin, le potentiel pro-tumoral des TAMs peut également être associé à sa production de facteurs immunosuppresseurs comme le TGF- β ou l'IL-10 (Komohara et al., 2014). En effet, l'expression d'IL-10 par les TAMs induirait l'expression de PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) de manière autocrine, ce qui inhiberait la réponse immunitaire médiée par les CTL (Cytolytic T Lymphocyte ou Lymphocyte T cytolytique) contre des cellules d'hépatocarcinome humain (Kuang et al., 2009).

La majorité des études montre que, même si certaines variabilités sont observables en fonction des tissus, la présence de macrophages dans des tissus tumoraux humains est associée à un mauvais pronostic clinique (Heusinkveld and van der Burg, 2011; Komohara et al., 2014; Torisu et al., 2000).

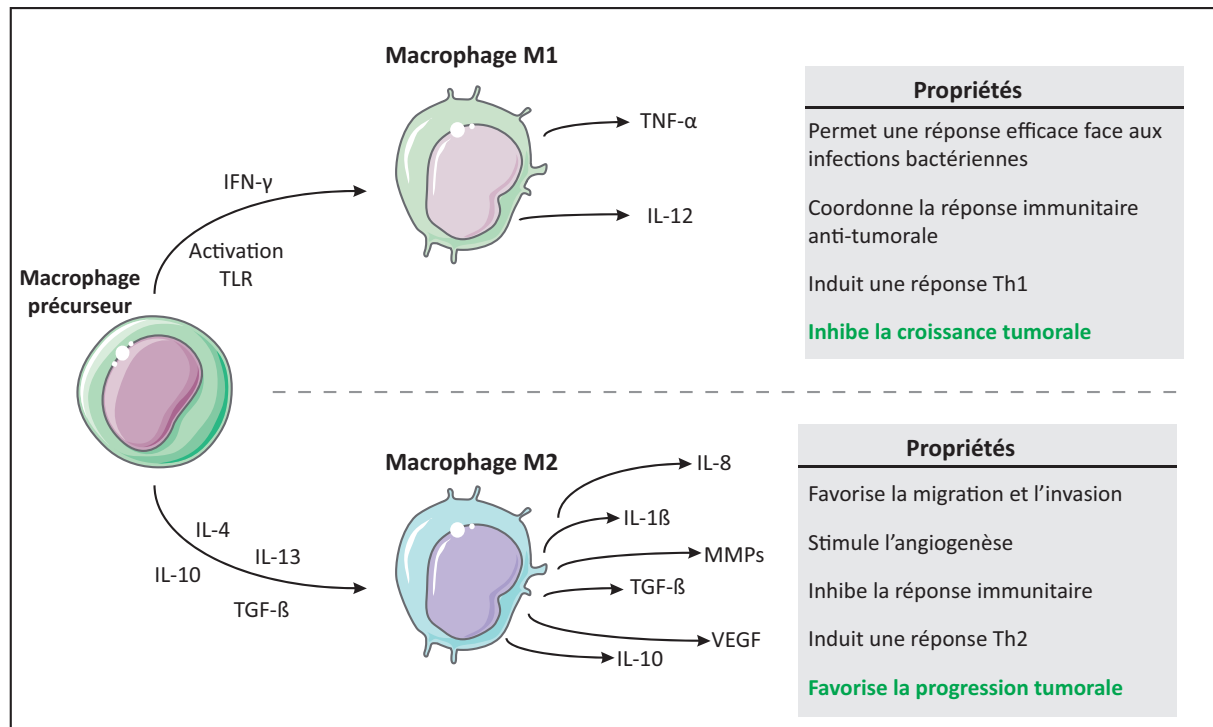


Figure 10 : Les macrophages dans le microenvironnement tumoral

Les cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral peuvent permettre le développement de macrophages présentant des phénotypes distincts : le phénotype classique M1 et le phénotype alternatif M2. Les macrophages M1 sont induits en présence d'IFN- γ et par des produits bactériens activant les TLR. Ils participent à la réponse face aux infections bactériennes et orientent les lymphocytes CD4 vers une réponse immunitaire de type Th1. Les macrophages M2 sont, quant à eux, induits en réponse à de nombreux stimuli incluant l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 et le TGF- β . Les TAMs possèdent principalement des propriétés de macrophages M2 et influencent l'invasion, la formation de métastases, l'angiogenèse ainsi que la réponse immunitaire. Ils orientent les lymphocytes CD4 vers une réponse de type Th2.

Adapté de (Schmid and Varner, 2010)

3.2.2 Les cytokines impliquées dans le développement et la progression tumorale

De nombreuses cytokines sont donc produites dans le microenvironnement tumoral, principalement par les TAMs, mais également par les cellules immunitaires infiltrées, les cellules du stroma et les cellules tumorales (Figure 11) (Coussens and Werb, 2002; Komohara et al., 2014; Mantovani et al., 2008).

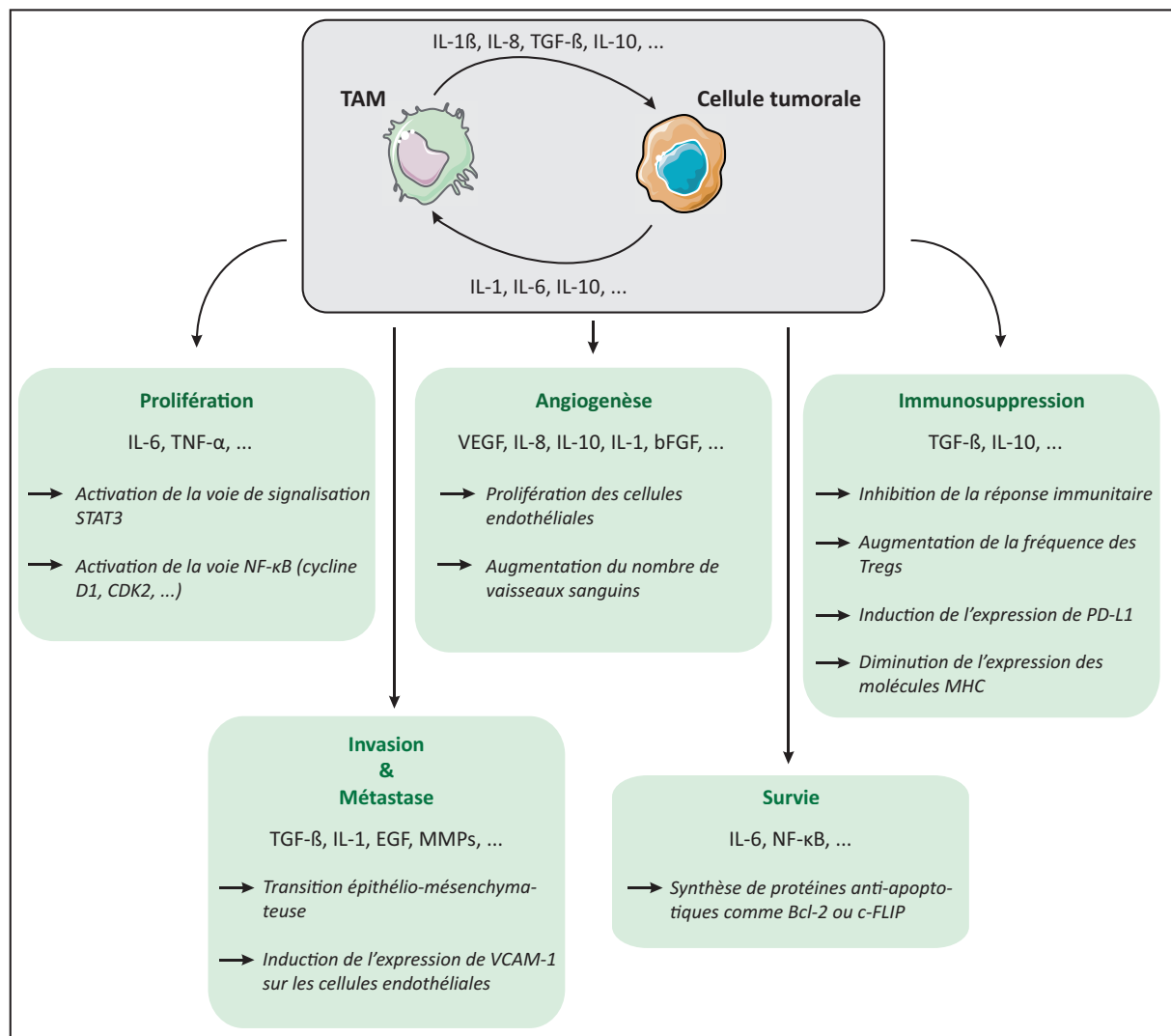


Figure 11 : Le microenvironnement tumoral

Les TAMs sont la principale source de cytokines et médiateurs dans le microenvironnement tumoral. Ces différents facteurs vont favoriser la progression tumorale en stimulant la prolifération, l'angiogenèse, l'immunosuppression, la survie, l'invasion et le développement de métastases.

Adapté de (Komohara et al., 2014)

3.2.2.1 Le Transforming Growth Factor-beta (TGF- β)

Le TGF- β peut être produit par les cellules tumorales, les cellules immunitaires comme les macrophages ou les Tregs (Lymphocytes T régulateurs) et les fibroblastes du stroma (Komohara et al., 2014; Massague, 2008). Le TGF- β a un rôle complexe dans le cancer. Celui-ci peut varier en fonction du type cellulaire ainsi que du stade de développement de la tumeur. Dans le développement tumoral précoce, le TGF- β aurait un rôle anti-tumoral en empêchant la croissance cellulaire via l'induction d'inhibiteurs de CDK et la répression du facteur de transcription c-Myc, tout en favorisant l'apoptose (Landskron et al., 2014; Massague, 2008). En revanche, à des stades plus tardifs, il stimulerait l'invasion et l'apparition de métastases en induisant l'EMT (Epithelial-to-Mesenchymal Transition ou Transition épithélio-mésenchymateuse) des cellules (Massague, 2008). Ceci a été mis en évidence dans le mélanome où il a, par exemple, été démontré dans un modèle murin que des tumeurs agressives présentaient une signature TGF- β associée à une activation des gènes impliqués dans l'EMT (Wehbe et al., 2012).

De plus, le TGF- β réprimerait la réponse immunitaire anti-tumorale en inhibant l'activité des lymphocytes Th1 et Th2, des CTL, des cellules dendritiques, des cellules NK (Natural Killer) et des macrophages, tout en induisant la différenciation de Tregs, des cellules impliquées dans la répression de la réponse immunitaire (Massague, 2008). L'influence du TGF- β sur la réponse immunitaire dans le cadre du mélanome a été étudiée dans des souris transgéniques dont les lymphocytes T CD4 et CD8 surexpriment un dominant négatif du récepteur au TGF- β , appelé dnTGF-RII (Gorelik and Flavell, 2001). Dans ces souris, les lymphocytes T CD4 et CD8 ne répondent donc pas au signal induit par le TGF- β . Les chercheurs ont alors comparé la croissance tumorale après injection de cellules de mélanome B16, produisant du TGF- β de manière endogène, dans les souris transgéniques par rapport aux souris sauvages. Alors que la tumeur progressait chez les souris sauvages, les souris transgéniques étaient en revanche capables d'éradiquer les cellules cancéreuses grâce à une réponse immunitaire anti-tumorale médiée par des CTL (Gorelik and Flavell, 2001). Ceci suggère donc un rôle majeur du TGF- β dans l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale.

Le TGF- β favoriserait également l'angiogenèse en stimulant l'expression d'IL-8 et de VEGF dans les tumeurs, dont les mélanomes (Liu et al., 2005; Perrot et al., 2013). Ceci est en accord avec les résultats obtenus chez des embryons de souris n'exprimant pas de TGF- β 1 et montrant d'importants problèmes de vascularisation (Dickson et al., 1995).

3.2.2.2 L'Interleukine-6 (IL-6)

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire possédant des effets pro-tumoraux. Elle peut être produite par de nombreuses cellules incluant les macrophages, les neutrophiles ou les cellules tumorales (Hodge et al., 2005). L'IL-6 favoriserait la prolifération cellulaire dans de nombreux types cancéreux différents en activant la voie de signalisation STAT3. De plus, elle empêcherait l'entrée des cellules en apoptose en stimulant la synthèse de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Hodge et al., 2005). Il a été montré que STAT3 était constitutivement activé dans de nombreuses lignées de mélanome et échantillons tumoraux humains (Niu et al., 2002). De plus, l'inhibition de l'expression de STAT3 dans des cellules de mélanome B16, injectées *in vivo* dans des souris, induirait une inhibition de la prolifération ainsi que l'apoptose de ces cellules tumorales (Niu et al., 1999).

3.2.2.3 L'Interleukine-10 (IL-10)

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui peut être sécrétée par de nombreuses cellules présentes dans le microenvironnement tumoral : les lymphocytes T et B, les monocytes, les macrophages, les mastocytes, les granulocytes, les cellules dendritiques ainsi que les cellules tumorales (Sabat et al., 2010). L'IL-10 aurait un effet anti-tumoral en réprimant l'inflammation via l'inhibition de l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) et de la liaison de celui-ci à ses gènes cibles (Schottelius et al., 1999). Cependant, un rôle pro-tumoral a également été démontré pour cette cytokine dans un modèle de mélanome murin. Dans ce modèle, les tumeurs présentant une surexpression d'IL-10 montraient une prolifération cellulaire accrue et une vascularisation plus développée. Les cellules montraient également une capacité élevée à échapper aux réponses immunitaires anti-tumorales via une réduction de l'expression des molécules MHC (Garcia-Hernandez et al., 2002). Enfin, comme décrit précédemment, l'IL-10 favoriserait également l'expression de PD-L1 par les TAMs, ce qui inhiberait la réponse immunitaire induite par les CTL (Kuang et al., 2009).

3.2.2.4 L'Interleukine-1 (IL-1)

La famille de l'IL-1 comprend l'IL-1 α et l'IL-1 β , deux protéines qui partagent une structure tridimensionnelle similaire leur permettant d'agir comme agonistes des mêmes récepteurs (Apte and Voronov, 2008). Si leur mécanisme d'action est identique, l'IL-1 β est uniquement active sous forme sécrétée après clivage de son précurseur inactif, tandis que l'IL-1 α est très peu sécrétée et est principalement active en étant associée aux cellules, soit sous forme de précurseur intra-cellulaire, le proIL1 α , soit associée aux membranes cellulaires (Apte and Voronov, 2008). La source principale d'IL-1 dans le microenvironnement tumoral serait les macrophages, même si elle peut également être produite par les cellules tumorales, dont les mélanomes (Bennicelli et al., 1989; Elaraj et al., 2006; Kholmanskikh et al., 2010; Torisu et al., 2000; Weber et al., 2010). La présence de cette cytokine pro-inflammatoire va induire une voie de signalisation menant à l'activation de nombreux gènes par le facteur de transcription NF- κ B ainsi que le complexe AP-1 (Activator Protein-1) (Figure 12) (Weber et al., 2010).

De manière intéressante, des niveaux faibles et limités dans le temps d'IL-1 permettent une inflammation locale stimulant l'activation de l'immunité innée et adaptative (Apte et al., 2006; Apte and Voronov, 2008). Cependant, chez les patients cancéreux, des niveaux élevés d'IL-1 sont généralement associés à une invasion tumorale ainsi qu'à un mauvais pronostic clinique (Apte et al., 2006; Lewis et al., 2006).

L'étude de souris knock-out pour l'IL-1 β a permis de démontrer que cette cytokine induisait l'invasion et l'apparition de métastases pulmonaires à partir de cellules de mélanome B16 transplantées *in vivo*, ainsi que la formation de nouveaux vaisseaux sanguins permettant l'irrigation de la tumeur (Voronov et al., 2003). Des résultats similaires ont également été observés dans des tumeurs mammaires murines (Voronov et al., 2003). Le rôle de l'IL-1 dans l'invasion tumorale peut être expliqué par sa capacité à induire l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) sur les cellules endothéliales. Ceci permettrait aux cellules de mélanome de passer dans la circulation sanguine afin d'envahir les tissus voisins pour créer des métastases (Vidal-Vanaclocha et al., 2000). Le rôle de l'IL-1 dans l'angiogenèse consiste également à stimuler l'expression de facteurs angiogéniques comme le VEGF ou l'IL-8 par les cellules du stroma et les cellules de mélanome (Elaraj et al., 2006; Torisu et al., 2000; Voronov et al., 2003).

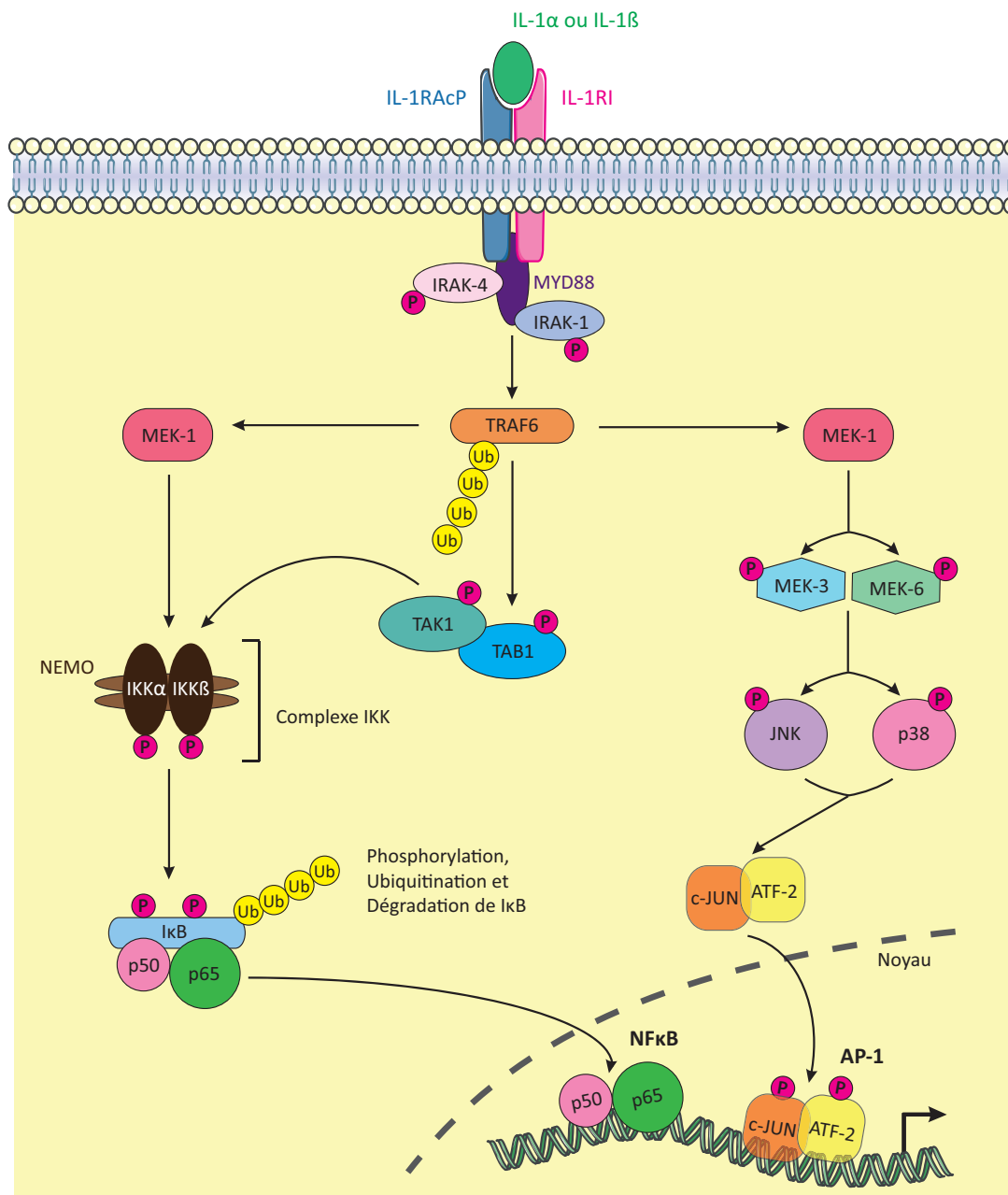


Figure 12 : La voie de signalisation de l'Interleukine-1

La liaison de l'IL-1 au récepteur IL1R1 recrute le IL-1RacP (IL-1R accessory protein), ce qui attire MYD88 (Myeloid Differentiation Factor 88) et les kinases IRAK-1 et -4 (IL-1R-associated Kinase 1 et 4) qui s'auto-phosphorylent. Ceci induit la polyubiquitination de TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6) et le recrutement de TAK1 (TGFβ-Activated Kinase) via sa sous-unité régulatrice TAB1 (TAK1 Binding subunit). TAK1 phosphoryle le complexe IKK qui à son tour phosphoryle IκB. Ceci induit son ubiquitination et sa dégradation dans le protéasome, permettant ainsi à NF-κB de migrer jusqu'au noyau et d'activer ses gènes cibles. TRAF6 est également capable d'induire l'activation de la kinase MEK-1, ce qui va, d'une part, induire la phosphorylation de IκB et la libération de NF-κB et, d'autre part, induire la phosphorylation des kinases MEK-3 et MEK-6. Ces kinases activées vont alors phosphoryler les kinases JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38 qui vont elles-mêmes phosphoryler les facteurs de transcription c-Jun et ATF-2 (Activating Transcription Factor 2) dont l'association est connue sous le nom de « complexe AP-1 ». Ceux-ci migrent alors dans le noyau pour activer leurs gènes cibles.

Adapté de (Weber et al., 2010)

3.2.2.5 Le Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α)

Le TNF- α est également une cytokine pro-inflammatoire produite principalement par les macrophages et menant à l'activation de plusieurs voies de signalisation (Figure 13). Sa liaison à son récepteur peut activer NF- κ B qui induit l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que c-FLIP (c-FLICE-Inhibitory Protein), un inhibiteur d'activation de la caspase 8 (Balkwill, 2006; Karin, 2006; Landskron et al., 2014). Cependant, si NF- κ B n'est pas activé, par exemple en cas de troubles métaboliques, une signalisation pro-apoptotique est alors déclenchée. Celle-ci est favorisée par l'accumulation de ROS qui vont induire une activation prolongée de la kinase JNK menant à l'activation de l'ubiquitine ligase Itch (Balkwill, 2006). Celle-ci va alors favoriser la dégradation de c-FLIP, ce qui va induire l'apoptose médiée par la caspase 8 (Balkwill, 2006). En effet, NF- κ B n'est alors plus capable d'induire l'expression de gènes codant les protéines SOD2 (Superoxide Dismutase 2) et FHC (Ferritin Heavy Chain), ce qui permet l'accumulation de ROS et favorise l'inhibition des phosphatases déphosphorylant JNK (Karin, 2006).

Dans le microenvironnement tumoral, le TNF- α aurait principalement un rôle pro-tumoral (Balkwill, 2006). En effet, il a entre autres été démontré dans un modèle murin d'adénocarcinome du colon que le TNF- α était capable de stimuler la prolifération des cellules tumorales via l'activation de NF- κ B. En revanche, l'inhibition de NF- κ B permettait une régression de la progression tumorale en orientant le signal induit par le TNF- α vers une réponse pro-apoptotique (Luo et al., 2004). Il en est de même dans des cellules de mélanome humain dans lesquelles l'inhibition de l'activité de NF- κ B serait nécessaire pour permettre la sensibilisation des cellules à l'apoptose induite par le TNF- α (Bakker et al., 1999).

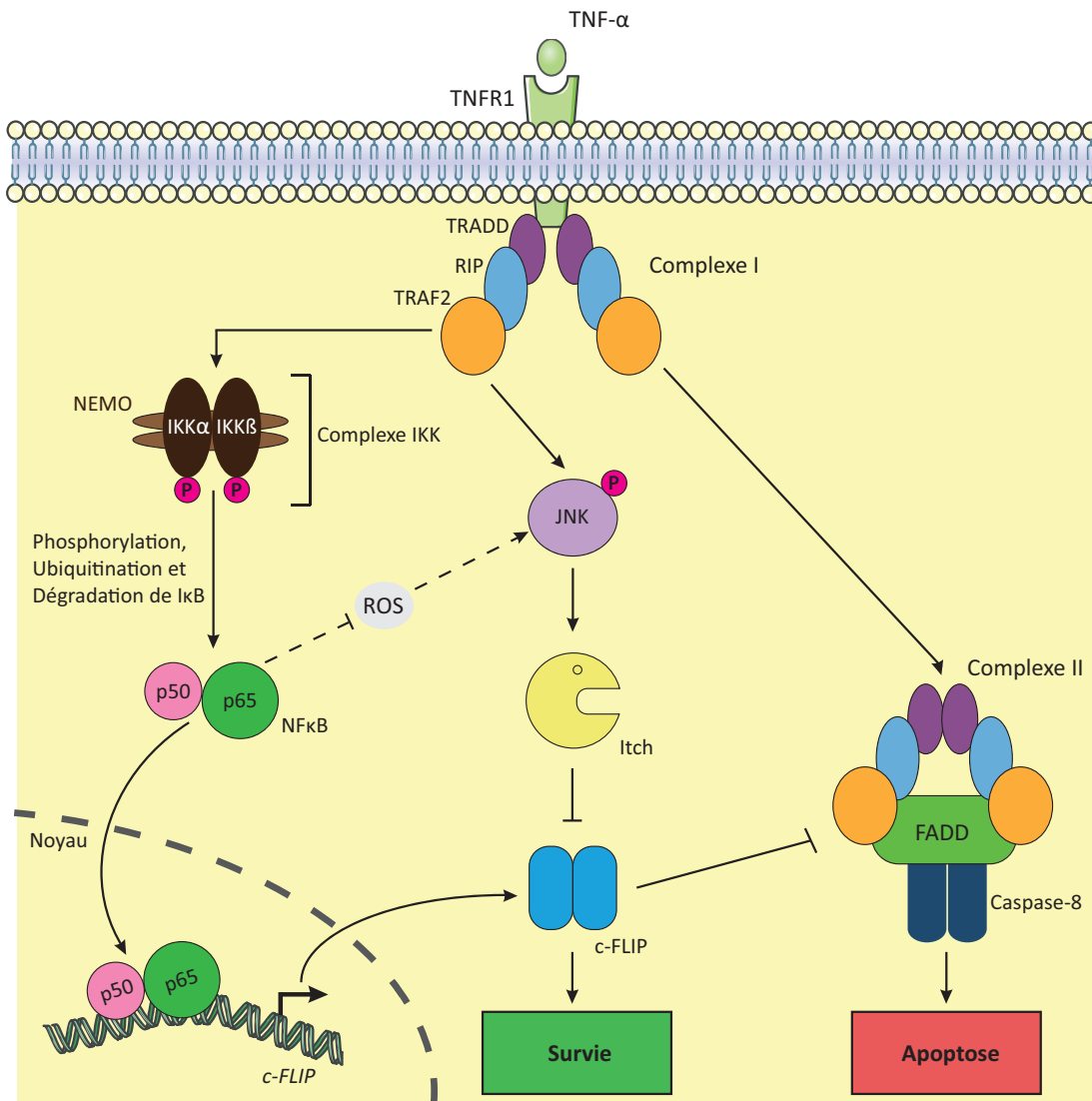


Figure 13 : Les voies activées par le TNF- α

La liaison du TNF- α sur son récepteur TNFR1 (Tumor-Necrosis Factor Receptor 1) induit rapidement l'assemblage du complexe I, composé des protéines TRADD (TNF Receptor 1-Associated Death Domain), RIP1 (Receptor-Interacting Protein 1) et TRAF2/5. Ce complexe induit l'activation du complexe IKK et de la kinase JNK. Le complexe IKK permet alors l'activation de NF- κ B qui stimule l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que c-FLIP, un inhibiteur spécifique de l'activation de la caspase-8. Par après, le complexe I se dissocie et le complexe soluble II se forme, comprenant, en plus des protéines TRADD, RIP1 et TRAF2/5, la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain protein). Ce complexe recrute et active la caspase-8, ce qui déclenche l'apoptose, à condition que les niveaux de c-FLIP ne soient pas trop élevés. Une activation insuffisante de NF- κ B empêche la synthèse de c-FLIP et permet l'accumulation de ROS, ce qui induit une activation prolongée de JNK. Ceci mène à la phosphorylation et l'activation de l'ubiquitine ligase Itch qui induit la dégradation de c-FLIP. Lorsque les niveaux de c-FLIP tombent sous un certain seuil, la caspase-8 est activée et les cellules entrent en apoptose.

Adapté de (Karin, 2006)

3.2.3 La voie de signalisation NF- κ B dans la progression tumorale

Parmi les différentes voies de signalisation induites par l'inflammation, NF- κ B semble être le facteur le plus important favorisant la progression tumorale (Karin, 2006; Madonna et al., 2012). Les facteurs de transcription NF- κ B sont composés de 5 sous-unités homologues (Rel-A/p65, c-Rel, Rel-B, p50/NF- κ B1, p52/NF- κ B2) qui s'associent sous forme de dimères, piégés dans le cytoplasme en raison de leur liaison avec des inhibiteurs I κ B (Naugler and Karin, 2008). La voie principale d'activation de NF- κ B, aussi appelée voie canonique, implique la phosphorylation de I κ B ce qui induit son ubiquitination et sa dégradation en réponse à un stimulus inflammatoire. Ceci permet la libération du dimère p50/p65 qui migre dans le noyau afin d'activer ses gènes cibles (Figure 12) (Naugler and Karin, 2008).

La présence de NF- κ B activé, habituellement démontrée par la présence de p65 dans le noyau, a été établie dans de nombreux cancers, dont les mélanomes, et procure plusieurs avantages pro-tumoraux (Figure 14) (Madonna et al., 2012; Naugler and Karin, 2008; Rayet and Gelinas, 1999).

3.2.3.1 *NF- κ B favorise la prolifération cellulaire des tumeurs*

Le facteur de transcription NF- κ B régule de nombreux gènes stimulant la prolifération cellulaire comme la *cyclin D1*, *cyclin E*, *CDK2* ou *MYC* (Pahl, 1999). Le rôle de NF- κ B dans la progression tumorale a été démontré dans le cancer du sein, des poumons, du colon et dans les mélanomes (Naugler and Karin, 2008). Par exemple, un appauvrissement des cellules en kinase IKK β endogène, normalement capable de phosphoryler et d'induire la dégradation du répresseur I κ B et donc l'activation de NF- κ B, permet de réduire la croissance des mélanomes chez la souris (Yang et al., 2007).

3.2.3.2 *NF- κ B joue un rôle anti-apoptotique dans les tumeurs*

L'inhibition de l'apoptose est peut-être la manière la plus évidente utilisée par NF- κ B pour favoriser le développement des cancers. En effet, NF- κ B stimule la survie des cellules grâce à son rôle majeur dans l'activation de gènes anti-apoptotiques appartenant à la famille *BCL2* (Karin, 2006). De même, pour que le TNF- α puisse avoir un effet pro-apoptotique, l'activation, par NF- κ B, de molécules anti-apoptotiques comme c-FLIP ou Bcl-2 doit être inhibée (Balkwill, 2006; Karin, 2006).

3.2.3.3 NF- κ B favorise l'apparition de métastases

L'activation de la voie canonique de NF- κ B serait également impliquée dans l'EMT grâce à l'induction de nombreux gènes impliqués dans ce processus (Naugler and Karin, 2008). Ceci a été décrit dans un modèle de cancer du sein chez la souris où l'inhibition de NF- κ B empêche l'EMT (Huber et al., 2004). De même, il a été montré dans des cellules de mélanome que NF- κ B stimulait l'expression de N-cadhérines lorsque le niveau d'expression des E-cadhérines était diminué. Ce changement d'expression de type de cadhérines est caractéristique de l'EMT (Kuphal and Bosserhoff, 2006).

3.2.3.4 NF- κ B induit l'angiogenèse dans les tumeurs

La majorité des signaux stimulant l'angiogenèse provient des TAMs et implique une activation de NF- κ B (Naugler and Karin, 2008). Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 vont induire l'expression de VEGF mais également d'autres cibles de NF- κ B régulant l'angiogenèse telles que CXCL1 et l'IL-8 (Huang et al., 2000; Naugler and Karin, 2008).

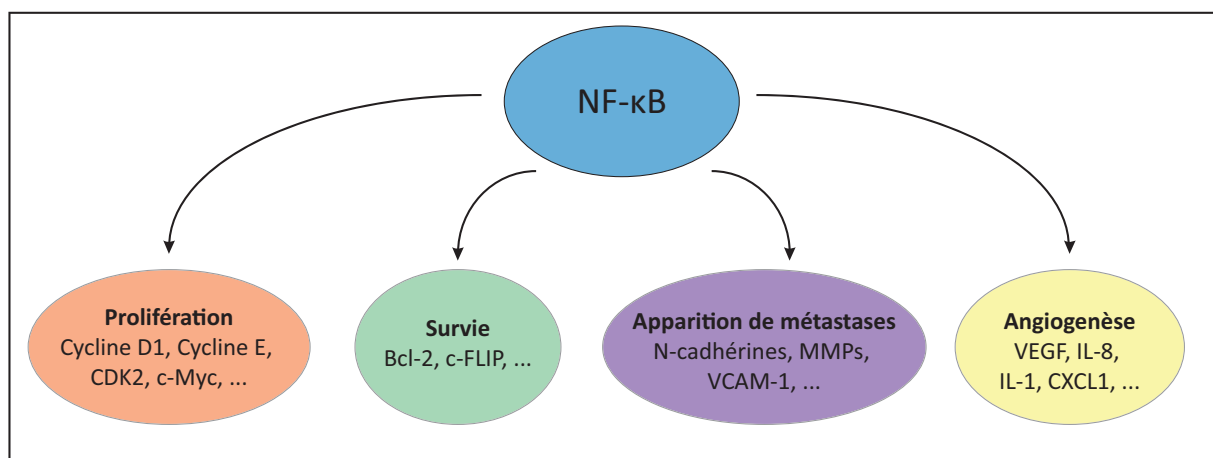


Figure 14 : La voie de signalisation NF- κ B dans la progression tumorale

L'activation de la voie NF- κ B est impliquée dans la progression tumorale via la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie, l'apparition de métastases et l'angiogenèse.

Adapté de (Baud and Karin, 2009)

3.3 Analyse compréhensive des cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral des mélanomes

Différentes études ont analysé la présence de cytokines au cours de la progression tumorale dans le mélanome.

Moretti et al. ont analysé, par immuno-histochimie, 10 naevi, 20 mélanomes primaires et 10 mélanomes métastatiques provenant de tissus humains. Leur étude a montré la présence de faibles quantités de TNF- α , TGF- β , IL-8, récepteur au TGF- β et c-Kit dans les naevi et mélanomes primaires fins (< 1mm) (Moretti et al., 1999). Ils ont également montré une surexpression d'IL-1 α , IL-1 β , IL-6 et son récepteur, IL-8, TNF- α , TGF- β , GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) et son récepteur et SCF dans les mélanomes primaires épais (> 1 mm) (Moretti et al., 1999). Les mélanomes métastatiques présentaient les mêmes niveaux d'expression que les mélanomes primaires, excepté pour SCF qui était absent (Moretti et al., 1999). Cette étude concluait que l'expression d'IL-6 et IL-8 était associée à des événements précoces du développement du mélanome alors que le TGF- β , le GM-CSF et l'IL-1 α pouvaient être considérés comme des marqueurs de métastases (Moretti et al., 1999).

Une autre équipe s'est intéressée à la production de cytokines dans 21 lignées de cellules de mélanome et 5 lignées de mélanocytes par RT-PCRq (Mattei et al., 1994). Les mélanomes produisaient de manière générale plus de cytokines que les mélanocytes. De plus, environ 60% des lignées de cellules de mélanome exprimaient de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de l'IL-8 (Mattei et al., 1994).

Enfin, des analyses de RNA-Seq comparant l'expression de gènes dans des mélanocytes normaux, des mélanomes primaires et des mélanomes métastatiques ont également montré que des gènes comme l'IL-8 et NF- κ B étaient associés à la progression cancéreuse (Zhao et al., 2014).

4. La réponse immunitaire adaptative anti-tumorale

4.1 La réponse immunitaire adaptative face aux mélanomes

De nombreuses cellules immunitaires peuvent infiltrer le microenvironnement tumoral, mais les cellules les plus représentées sont les macrophages et les lymphocytes T (Grivennikov et al., 2010; Oble et al., 2009). Le rôle des macrophages a été discuté précédemment, leur présence ayant principalement un rôle pro-tumoral malgré leur capacité à recruter et activer les lymphocytes T. Les lymphocytes T ont un rôle important dans les mélanomes cutanés dans lesquels une réponse immunitaire anti-tumorale CD8 spontanée a été mise en évidence (Germeau et al., 2005; Nagorsen et al., 2003). En effet, chez des patients présentant des mélanomes, des analyses comparant la fréquence de lymphocytes T dans le sang et dans les métastases ont permis de mettre en évidence une fréquence de lymphocytes T CD8 10 fois plus élevée dans les tumeurs (Lurquin et al., 2005; Mazzocchi et al., 1994). De même, des études *ex-vivo* ont montré que, parmi 5 patients atteints de mélanome, 4 avaient une grande quantité de lymphocytes T CD8 produisant de l'IFN- γ après stimulation avec la lignée de cellules de mélanome autologue (Letsch et al., 2000).

4.1.1 Les lymphocytes T cytolytiques (CTL)

La réponse immunitaire adaptative principale contre les cellules tumorales est médiée par des lymphocytes T CD8 appelés CTL. Les CTL reconnaissent, via leur TCR (T Cell Receptor), des antigènes présentés par les molécules MHC de classe I, exprimées par presque toutes les cellules nucléées de l'organisme (Andersen et al., 2006). La majorité des antigènes présentés par les molécules MHC de classe I suivent une voie classique d'apprêtement comprenant le clivage d'une protéine endogène en peptides dans le protéasome (Figure 15). Une fois les peptides produits, ils sont transportés dans le réticulum endoplasmique par des transporteurs TAP (Transporters associated with Antigen Presentation). Ils sont alors associés à la chaîne lourde de la molécule MHC puis à la β 2-microglobuline avant que ce complexe ne soit transporté à la surface des cellules pour être reconnu par les CTL (Andersen et al., 2006; Boon et al., 2006). Enfin, lorsqu'un CTL a reconnu son antigène présenté par une molécule MHC, il va induire l'apoptose de la cellule reconnue grâce à l'exocytose de perforine et de granzyme B ou via la liaison des récepteurs de la mort cellulaire Fas, présents sur la cellule cible, avec leurs ligands Fas-L présents sur le CTL (Andersen et al., 2006).

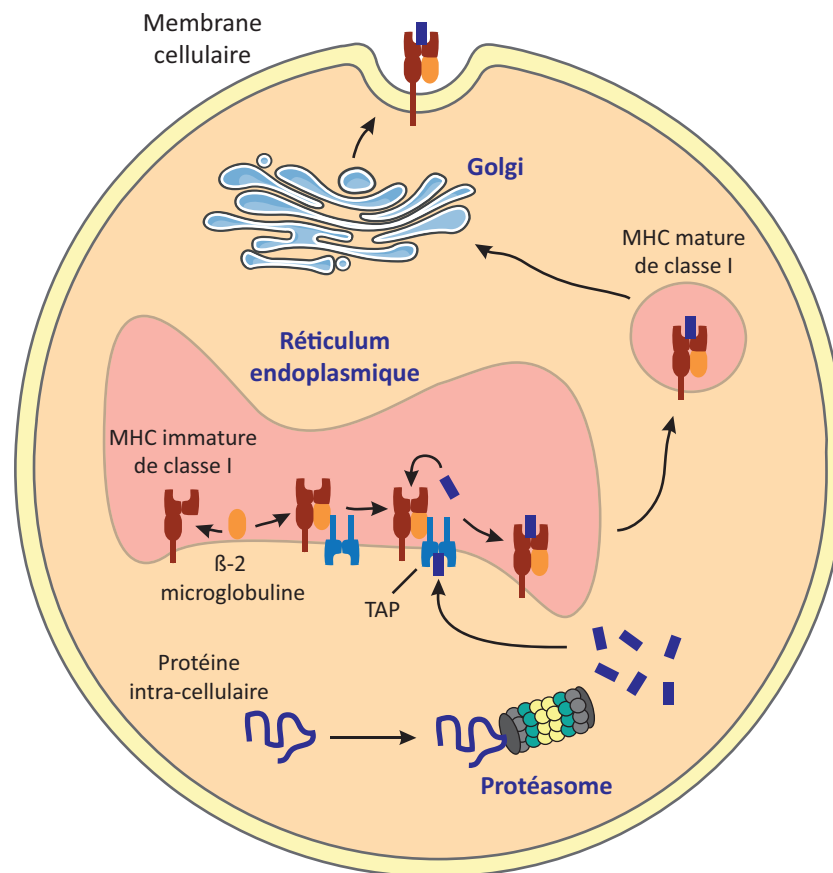


Figure 15 : L'apprêtement et la présentation des peptides antigéniques par les molécules MHC de classe I

Une protéine intra-cellulaire peut être dégradée en peptides de 8 à 10 acides aminés par le protéasome. Ces peptides sont transportés dans le réticulum endoplasmique grâce à la protéine TAP puis associés à des molécules MHC de classe I et à la β 2-microglobuline. Ces complexes sont ensuite acheminés vers la surface de la cellule pour être reconnus par des CTL.

Adapté de (Andersen et al., 2006)

4.1.2 Les antigènes présentés par les cellules cancéreuses et reconnus par des CTL anti-tumoraux

Il existe différents types d'antigènes associés aux tumeurs qui peuvent être reconnus par les CTL anti-tumoraux (Figure 16). Ces antigènes peuvent être classés en différents groupes :

4.1.2.1 *Les antigènes codés par des gènes mutés*

Une mutation ponctuelle d'un gène peut créer un nouvel épitope dans la protéine qu'il code, lui permettant ainsi de devenir immunogénique via une meilleure liaison aux molécules MHC ou une meilleure reconnaissance par les TCR (Boon et al., 2006; Coulie et al., 2014; Ramirez-Montagut et al., 2003). La présence de CTL spécifiques d'antigènes provenant de gènes mutés a été identifiée dans le mélanome (Baurain et al., 2000; Chiari et al., 1999). Par exemple, il a été montré chez un patient atteint de mélanome que des CTL spécifiques isolés à partir de TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes ou Lymphocytes infiltrant les tumeurs) étaient capables de reconnaître un peptide provenant de la β -caténine, muté au niveau d'un seul acide aminé en raison d'une mutation ponctuelle dans l'ADN (Robbins et al., 1996).

4.1.2.2 *Les antigènes codés par les gènes « cancer-lignée germinale »*

Les antigènes « cancer-lignée germinale » proviennent de protéines exprimées dans de nombreuses tumeurs humaines de types histologiques variés. Ces protéines ne sont pas exprimées dans les tissus sains, excepté dans les cellules germinales mâles, qui n'expriment pas de molécule MHC de classe I et ne peuvent donc pas présenter d'antigènes aux lymphocytes T (Boon et al., 2006; Coulie et al., 2014; Ramirez-Montagut et al., 2003). Ces antigènes sont donc spécifiques des cellules cancéreuses. Le premier gène humain « cancer-lignée germinale » ciblé par des CTL à avoir été identifié est le gène *MAGE-1* (*Melanoma Antigen encoding Gene-1*) faisant partie de la famille de gènes du même nom (van der Bruggen et al., 1991). D'autres familles de gènes présentant le même profil d'expression ont également été identifiées, telles que les membres des familles *BAGE*, *LAGE* et *GAGE* (Boel et al., 1995; Boon et al., 2006; Lethe et al., 1998; Van den Eynde et al., 1995).

4.1.2.3 Les antigènes surexprimés

Certains antigènes tumoraux proviennent de gènes codant des protéines exprimées dans les cellules normales, mais surexprimées dans les cellules cancéreuses (Boon et al., 2006). Par exemple, la surexpression du gène *HER-2/neu* dans le cancer du sein permet l'expression d'antigènes de ce type (Slamon et al., 1989). La surexpression de ces antigènes permettrait une quantité suffisante de complexes « peptides-MHC » pour déclencher une réponse immunitaire (Coulie et al., 2014). Cependant, il n'est pas exclu qu'une expression élevée de ces antigènes puisse également se produire dans des cellules saines et induire une réponse immunitaire. Ces antigènes ne sont donc pas spécifiques des tumeurs (Coulie et al., 2014).

4.1.2.4 Les antigènes viraux

Les antigènes viraux proviennent de protéines virales exprimées dans des cellules cancéreuses infectées. Par exemple, le cancer du col de l'utérus a été associé à l'infection par le papillomavirus et à l'expression des protéines virales E6 et E7 desquelles dérivent des antigènes viraux (Hung et al., 2008).

4.1.2.5 Les antigènes de différenciation

Les antigènes de différenciation proviennent de protéines également exprimées dans les cellules normales et impliquées dans la différenciation de celles-ci (Coulie et al., 2014; Ramirez-Montagut et al., 2003). Dans les mélanomes, de nombreux antigènes de différenciation provenant de protéines impliquées dans la mélanogenèse ont été identifiés. Ils s'agit d'antigènes provenant de la tyrosinase, de Melan-A/MART-1 ou de gp100 (Figure 4) (Brichard et al., 1993; Coulie et al., 1994; Romero et al., 2002; Zarour et al., 1996).

Parce qu'ils ne sont pas spécifiques des cellules tumorales, les CTL dirigés contre ces antigènes de différenciation peuvent également être détectés chez des individus sains, particulièrement pour Melan-A (Nagorsen et al., 2003). Cependant, dans ce cas, 95% des CTL anti-Melan-A présentent un phénotype naïf alors que, chez des patients atteints de mélanome, un tiers des CTL anti-Melan-A ont un phénotype de type mémoire (Nagorsen et al., 2003). Les CTL dirigés contre d'autres antigènes de différenciation comme la tyrosinase ou gp100 sont très rares chez les individus sains (Nagorsen et al., 2003). La présence de ces CTL n'est habituellement pas associée à une réponse auto-immunitaire même si environ 3% des patients

atteints de mélanome développent une hypopigmentation semblable au vitiligo (Quaglino et al., 2010).

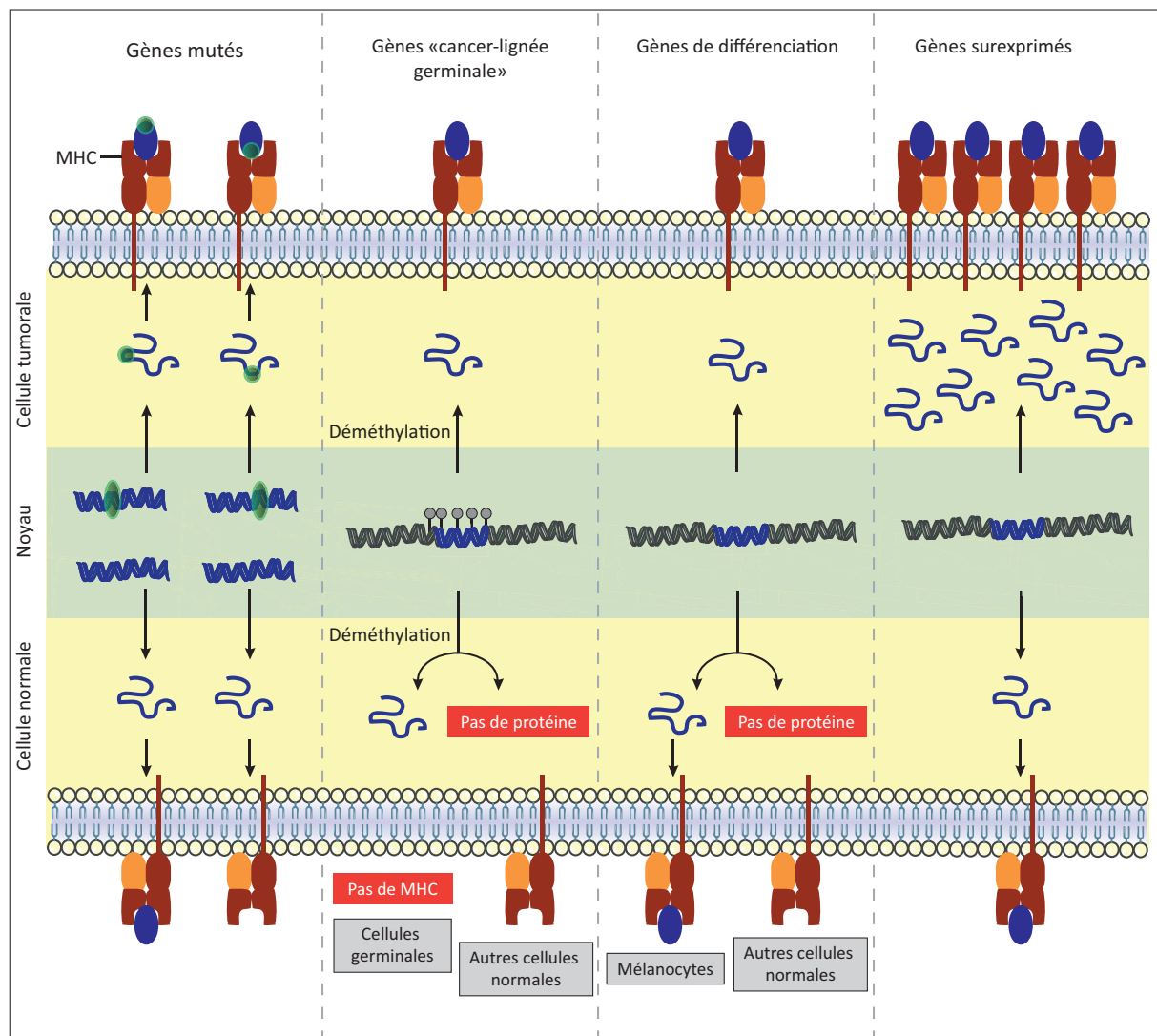


Figure 16 : Les différentes classes d'antigènes reconnus par les lymphocytes T

Les mutations ponctuelles peuvent modifier un peptide qui se lie déjà à une molécule MHC ou peuvent rendre un peptide capable de se lier à une molécule MHC. Les gènes « cancer-lignée germinale » sont exprimés sélectivement dans les cellules tumorales et les cellules germinales grâce à la déméthylation de leur promoteur. Leurs antigènes ne sont pas présents sur les cellules germinales en raison de l'absence de molécules MHC sur ces cellules. Un gène spécifique des mélanocytes est utilisé comme exemple de gène de différenciation spécifique d'un tissu. La surexpression de protéines particulières peut également déclencher une réponse anti-tumorale.

Adapté de (Coulie et al., 2014)

4.2 Les mécanismes d'échappement des cellules tumorales face à la réponse immunitaire

Les mélanomes sont considérés comme des tumeurs fortement immunogéniques. Cependant, la majorité des patients présentant des mélanomes métastatiques voient leur maladie progresser malgré la présence de CTL dans le microenvironnement tumoral (Harlin et al., 2006; Lurquin et al., 2005). Par exemple, dans les mélanomes avancés, l'infiltration de lymphocytes T spécifiques de Melan-A ou de la tyrosinase n'est malheureusement pas associée à un meilleur pronostic clinique (van Oijen et al., 2004). Dès lors, le manque d'efficacité de la réponse anti-tumorale serait plutôt dû au développement de mécanismes rendant les cellules tumorales insensibles à la réponse immunitaire ou les cellules immunitaires incapables d'exercer leur fonction (Boon et al., 2006; Harlin et al., 2006).

4.2.1 Les mécanismes d'échappement dus à un mauvais fonctionnement du système immunitaire

Plusieurs études ont montré que les TILs pouvaient présenter un phénotype anergique, devenant alors incapables d'exercer leur activité anti-tumorale (Boon et al., 2006). Les mécanismes impliqués dans cette anergie peuvent être de différentes sortes et impliquer soit l'expression, par les cellules tumorales ou le stroma, de molécules rendant les lymphocytes T anergiques, soit la présence de cellules immunosuppressives.

4.2.1.1 *L'échappement à l'immunité anti-tumorale induit par les cellules tumorales*

De nombreuses cellules tumorales expriment de l'IDO (Indoléamine 2,3 Dioxygénase) ou du TDO (Tryptophane 2,3 Dioxygénase), deux enzymes capables de dégrader le tryptophane, privant ainsi le microenvironnement tumoral de cet acide aminé essentiel pour la fonction des lymphocytes T (Pilotte et al., 2012; Uyttenhove et al., 2003). Un autre exemple de molécules inhibitrices sécrétées par les cellules de mélanome sont les galectines-1 et -3. Ces protéines répriment également l'activité des lymphocytes T en engluant leurs récepteurs dans un réseau de galectines et glycoprotéines de surface (Demotte et al., 2008; Rubinstein et al., 2004).

La surexpression, par différentes cellules tumorales, dont les mélanomes, de PD-L1 permet la liaison de celui-ci sur son récepteur PD-1, présent sur les lymphocytes T, ce qui induit leur apoptose (Dong et al., 2002). L'expression de PD-L1 est accrue en présence d'IFN- γ et a été associée à un mauvais pronostic dans les mélanomes (Dong et al., 2002; Hino et al., 2010).

4.2.1.2 L'échappement à l'immunité anti-tumorale induit par les cellules infiltrées

Les cellules du microenvironnement tumoral autres que les cellules cancéreuses peuvent également réprimer le système immunitaire anti-tumoral. Il a ainsi été démontré que les Tregs, cellules immunosuppressives présentes dans le microenvironnement tumoral, étaient capables d'inhiber la fonction des lymphocytes T (Gallimore and Godkin, 2008). La fréquence des Tregs serait augmentée dans différents cancers dont les mélanomes (McCarter et al., 2007).

Les cellules dendritiques ont également un rôle prépondérant dans l'immunité anti-tumorale grâce à leur rôle de présentation de l'antigène aux lymphocytes. Elles sont généralement classées en 2 populations : les mDCs (myeloid Dendritic Cells ou Cellules dendritiques myéloïdes) et les pDCs (plasmacytoid Dendritic Cells ou Cellules dendritiques plasmacytoïdes). Les mDCs favorisent la réponse immunitaire de type Th1 et la réponse CTL en produisant de l'IL-12 et de l'IFN- γ . En revanche, les pDCs ont plutôt un rôle immunosuppresseur en favorisant la réponse immunitaire de type Th2 et l'anergie en induisant la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β par les lymphocytes T (Kuwana, 2002; McCarter et al., 2007). La présence de ces pDCs a été démontrée dans les mélanomes où elles participeraient à l'échappement à la réponse anti-tumorale (McCarter et al., 2007).

De même, les MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells), une population immature de cellules myéloïdes, ont également été impliquées dans l'inhibition de la réponse immunitaire. Elles réprimeraient à la fois l'immunité innée et adaptative par de nombreux mécanismes comprenant la sécrétion d'arginase, de ROS et de TGF- β (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009).

Les différents facteurs décrits précédemment sont donc impliqués dans les mécanismes principaux de l'échappement à la réponse immunitaire anti-tumorale mais ne constituent bien évidemment pas une liste exhaustive.

4.2.2 Les mécanismes d'échappement rendant les cellules tumorales insensibles au système immunitaire grâce à une perte d'expression de leurs antigènes

En ne présentant plus les antigènes-cibles reconnus par les CTL anti-tumoraux, les cellules tumorales échappent à l'immunité anti-tumorale. La délétion ou mutation d'un allèle *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*) codant une molécule MHC ou du gène codant la β -2 microglobuline, permettant ce type d'échappement, a déjà été observée dans différentes sortes de tumeurs dont les mélanomes murins et humains (Garcia-Lora et al., 2003; Kageshita et al., 2005). Enfin, la mutation ou la délétion du gène codant le peptide antigénique conduit également à la perte de présentation de l'antigène aux CTL (Boon et al., 2006).

4.2.3 L'échappement à la réponse anti-tumorale grâce à la diminution d'expression des antigènes de différenciation

Les mutations ne sont pas les seules causes de la perte d'expression d'un antigène par les cellules tumorales. Le microenvironnement peut également influencer l'expression de ces antigènes dans les cellules tumorales et favoriser l'échappement à la réponse anti-tumorale. Des analyses d'échantillons de tissus tumoraux provenant de patients atteints de mélanome ont été réalisées afin d'étudier l'implication des différents mécanismes d'échappement (Tjin et al., 2014). Parmi les différents mécanismes analysés, l'expression des antigènes de différenciation Melan-A et gp100 a été étudiée par immuno-histochimie dans 46 échantillons. Cette analyse a montré que ces gènes étaient exprimés de manière fort variable, entre 0,5 et 100% des cellules d'un échantillon (Tjin et al., 2014). Au cours de notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'expression de ces antigènes de différenciation et à leur rôle dans l'échappement face à la réponse immunitaire anti-tumorale.

Des études précédentes ont mis en évidence le fait que les cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral pouvaient influencer l'expression de ces antigènes et ainsi modifier la réponse immunitaire. Tout d'abord, il a été démontré que l'IFN- γ , produit principalement par les lymphocytes T, était capable d'induire une diminution de l'expression de Melan-A, TRP-1 et gp100 dans des mélanomes. Ceci rendait ces cellules moins sensibles aux CTL spécifiques de ces antigènes de différenciation (Le Poole et al., 2002). De même, dans des mélanomes murins B16, il a été démontré que le TNF- α inhibait l'expression de la tyrosinase,

tout comme le TGF- β qui inhibait également l'expression de TRP-1 (Englaro et al., 1999; Martinez-Esparza et al., 1997).

Récemment, Landsberg et al. ont étudié l'efficacité des transferts adoptifs de CTL amplifiés *in vitro* et spécifiques de gp100 sur l'évolution du mélanome chez la souris. Dans cette étude, les auteurs ont observé, qu'après une période de régression, la plupart des mélanomes progressaient à nouveau. Ceci serait dû, entre autres, à une diminution d'expression de gp100 dans les cellules tumorales induite par la présence de TNF- α dans le microenvironnement (Landsberg et al., 2012). Les cellules de mélanome exposées au TNF- α devenaient en effet résistantes aux CTL anti-gp100 alors que leur sensibilité aux CTL spécifiques d'antigènes non mélanocytaires n'avait pas changé ou était même renforcée (Landsberg et al., 2012). En conclusion, cette étude a montré que la répression des antigènes de différenciation était réversible mais ne proposait pas de mécanisme moléculaire expliquant cette répression. Il est à noter qu'ils ont également montré que le TNF- α réprimait l'expression de gp100 et Melan-A dans des lignées de mélanome humain (Landsberg et al., 2012).

Des études cliniques chez des patients atteints de mélanome se sont également intéressées à la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par des CTL spécifiques d'antigènes de différenciation. En effet, un rapport clinique fait part du cas d'un patient dont le mélanome non métastatique avait été contrôlé pendant 5 ans grâce à une combinaison de résection chirurgicale, d'irradiation et d'immunothérapie à base de vaccins anti-Melan-A (Voelter et al., 2008). Lorsque le mélanome était devenu métastatique, la progression des métastases avait été stoppée grâce à un traitement de chimiothérapie. Cependant, le patient avait fini par succomber à une métastase cérébrale dont les cellules avaient perdu spécifiquement l'expression de Melan-A et ne répondaient pas à un traitement d'immunothérapie (Voelter et al., 2008). De même un autre cas clinique décrit une patiente atteinte de mélanome tout d'abord sensible à l'immunothérapie utilisant des peptides dérivés de Melan-A, gp100 ou de la tyrosinase avant de devenir réfractaire au traitement (Khong et al., 2004). En effet, une métastase était devenue résistante grâce à une diminution d'expression des antigènes de différenciation Melan-A, gp100, tyrosinase et DCT. Une autre métastase exprimait quant à elle toujours ces antigènes mélanocytaires mais avait perdu l'expression des molécules MHC de classe I (Khong et al., 2004). Ces cas cliniques montrent l'importance de la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique des antigènes de différenciation des mélanocytes dans le rejet de la tumeur.

C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'étudier les mécanismes responsables de la répression des antigènes de différenciation induite par un microenvironnement inflammatoire dans des cellules de mélanome.

But de l'étude

Nous nous sommes intéressés au facteur de transcription MITF-M et à son implication dans la régulation de l'expression des antigènes de différenciation Melan-A, tyrosinase ou gp100 dans un microenvironnement inflammatoire. L'expression de ces antigènes permet, en effet, la reconnaissance et la lyse des cellules de mélanome par des CTL spécifiques. Dès lors, l'étude des mécanismes impliqués dans la répression de l'expression de MITF-M et des antigènes de différenciation qu'il régule nous permettrait d'identifier un nouveau mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire anti-tumorale.

Les objectifs de notre étude étaient :

1. D'étudier l'influence d'un microenvironnement inflammatoire, comprenant de l'IL-1 α et de l'IL-1 β , sur l'expression du facteur de transcription MITF-M et des antigènes de différenciation qu'il régule.
2. D'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la répression de MITF-M en présence d'IL-1 β .

Résultats

1. Article 1 : Interleukins 1 α and 1 β secreted by some melanoma cell lines strongly reduce expression of MITF-M and melanocyte differentiation antigens

Actuellement, il n'existe aucune thérapie complètement efficace dans le traitement du mélanome métastatique. Si l'immunothérapie devait être le traitement de choix contre ce type de cancer fortement immunogénique, une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses échappent à l'immunité anti-tumorale est nécessaire pour permettre une efficacité optimale du traitement et mener à la régression des tumeurs. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'expression des antigènes de différenciation par les cellules de mélanome et au rôle du microenvironnement dans leur régulation.

Cette première partie des résultats se base sur une étude de microdamiers (microarrays) réalisée à l'Institut Ludwig de Bruxelles dans 5 lignées de mélanome (EB81-MEL, LB2117-MEL, DDHK62-MEL, LB2586-MEL et LB2259-MEL) incubées ou non avec de l'IFN- α , de l'IFN- γ ou du TNF- α pendant 72h. L'influence de ces cytokines sur la réponse immunitaire anti-tumorale a été analysée en raison de l'utilisation courante de l'IFN- α dans le traitement des mélanomes et de la présence d'IFN- γ et de TNF- α dans le microenvironnement tumoral. Cette analyse a pu mettre en évidence la répression de l'expression de certains antigènes de différenciation comme Melan-A ou MATP (Membrane-Associated Transporter Protein) en présence d'IFN- γ et de TNF- α mais pas en présence d'IFN- α . La répression de l'expression de ces antigènes s'observait donc uniquement en présence de ces deux cytokines pro-inflammatoires, ce qui est en accord avec deux études préalables (Englaro et al., 1999; Le Poole et al., 2002). L'expression de ces deux gènes est induite par un facteur de transcription commun, MITF-M. Dès lors, nous nous sommes tout d'abord posé la question de savoir si la répression de l'expression de Melan-A et MATP par l'IFN- γ et le TNF- α n'était pas consécutive à la répression de l'expression de MITF-M. De plus, nous avons investigué le rôle d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 α et l'IL-1 β afin d'étudier leur expression dans des lignées de mélanome et d'observer leurs effets sur l'expression de MITF-M et de ses gènes cibles.

Cette étude a été réalisée principalement par Olga Kholmanskikh au cours de son travail de thèse. J'ai participé aux expériences menant à la création des figures 1 et 2 ainsi qu'à d'autres expériences non publiées mais nécessaires à la compréhension du mécanisme décrit dans l'article n°1.

Interleukins 1 α and 1 β secreted by some melanoma cell lines strongly reduce expression of MITF-M and melanocyte differentiation antigens

Olga Kholmanskikh^{1,2}, Nicolas van Baren^{1,2}, Francis Brasseur^{1,2}, Sabrina Ottaviani^{1,2}, Julie Vanacker², Nathalie Arts^{1,2}, Pierre van der Bruggen^{1,2}, Pierre Coulié² and Etienne De Plaen^{1,2}

¹ Ludwig Institute for Cancer Research Ltd, Brussels branch, and Université Catholique de Louvain, 74 avenue Hippocrate, UCL7459, B1200 Brussels, Belgium

² Cellular Genetics Unit, de Duve Institute, Université Catholique de Louvain, 74 avenue Hippocrate, UCL7459, B1200 Brussels, Belgium

We report that melanoma cell lines expressing the interleukin-1 receptor exhibit 4- to 10-fold lower levels of mRNA of microphthalmia-associated transcription factor (*MITF-M*) when treated with interleukin-1 β . This effect is NF- κ B and JNK-dependent. *MITF-M* regulates the expression of melanocyte differentiation genes such as *MLANA*, *tyrosinase* and *gp100*, which encode antigens recognized on melanoma cells by autologous cytolytic T lymphocytes. Accordingly, treating some melanoma cells with IL-1 β reduced by 40–100% their ability to activate such antimelanoma cytolytic T lymphocytes. Finally, we observed large amounts of biologically active IL-1 α or IL-1 β secreted by two melanoma cell lines that did not express *MITF-M*, suggesting an autocrine *MITF-M* downregulation. We estimate that ~13% of melanoma cell lines are MITF-M-negative and secrete IL-1 cytokines. These results indicate that the repression of melanocyte-differentiation genes by IL-1 produced by stromal cells or by tumor cells themselves may represent an additional mechanism of melanoma immune escape.

Melanoma is a prime target of immunotherapy notably because spontaneous antitumoral T cell responses are frequent in melanoma patients.^{1,2} Surprisingly, it was found that many of these T lymphocytes recognized differentiation antigens shared by normal melanocytes and melanoma cells.³ These antigens are encoded by melanocyte-specific genes such as *TYR* (tyrosinase), *MLANA* (Melan-A/Mart-1), *SILV* (*pMel17/gp100*), *TYRP1* (tyrosinase-related protein), or *TYRP2*. CD8⁺ and CD4⁺ T cells recognizing differentiation antigens were found in the blood and among tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients.² The presence of these T cells is usually not associated with autoimmunity,

even though approximately 3% of melanoma patients develop vitiligo-like skin hypopigmentation.⁴ The lymphocytes infiltrating these lesions were reported to be mostly CD8⁺ T cells directed against differentiation antigens.⁵

The antitumoral immune responses, either spontaneous or stimulated by immunotherapy, do not usually lead to complete eradication of melanoma, even when the recruitment of T cells to the tumor site is successful. This may be explained by multiple mechanisms of inhibition of T cell function or of tumor antigen expression. Antitumoral T cells can be inhibited by immunosuppressive cells such as regulatory T cells, immunosuppressive dendritic cells, or myeloid-derived suppressor cells.^{6,7} Expression of the tryptophan-catabolizing enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic melanoma tumor sites deprives surrounding T lymphocytes of tryptophan, thereby suppressing their function.⁸ Melanoma cells themselves can alter the efficacy of antitumor responses. Engagement of the inhibitory programmed death receptor (PD)-1 on T cells by its ligand PD-L1 on tumor cells inhibits the proliferation of T cells and their production of interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-10.^{9,10}

Melanoma cells can express both PD-L1 and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to IFN- γ , a cytokine produced by activated T cells and natural killer cells. Another cytokine produced by activated T lymphocytes is tumor necrosis factor (TNF)- α .¹¹ TNF- α was reported to be present in primary and metastatic melanoma samples,¹² where macrophages are considered to be its main source. The number of melanoma macrophages was shown to increase with tumor stage and angiogenesis.¹³ IFN- γ and TNF- α modulate the expression of

Key words: interleukin 1, MITF, melanoma, antigen, CTL

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Abbreviations: MITF: microphthalmia-associated transcription factor; CTL: cytolytic T lymphocyte; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction; IL-1: interleukin 1

Grant sponsors: Fondation contre le Cancer (Belgium), Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (Belgium), the Fonds National de la Recherche Scientifique (Belgium) and the Fondation Salus Sanguinis (Belgium)

DOI: 10.1002/ijc.25182

History: Received 2 Oct 2009; Accepted 7 Jan 2010; Online 22 Jan 2010

Correspondence to: Etienne De Plaen, Ludwig Institute for Cancer Research Ltd, Brussels branch, 74 avenue Hippocrate-UCL7459, B1200 Brussels, Belgium, Fax: +[322 762 9405], E-mail: Etienne.DePlaen@bru.lir.org

many genes that contribute to the tumor-immune system interaction.^{14,15} Interestingly, many genes that are induced by IFN- γ are also induced by TNF- α , and in most cases, induction is synergistic and attributed to the activation of transcription factors IRF-1 and NF- κ B (reviewed in Ref. 14).

There is, therefore, growing evidence that the production of cytokines in the tumor environment may help melanoma cells to resist elimination by T lymphocytes. To find additional mechanisms of tumor escape, we used the Affymetrix microarray technology and explored the transcriptional profiles of melanoma cell lines treated with IFN- α , IFN- γ and TNF- α .

Materials and Methods

Tissue samples, cell lines, media and reagents

Tissue samples were collected at resection. They were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA isolation. Melanoma cell lines were from our laboratory, except for SK-MEL-23 obtained from Dr E. Stockert (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York). They were grown in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Invitrogen Life technologies; Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone, Perbio, Erembodegem-Aalst, Belgium); 0.55 mM L-arginine, 0.24 mM L-asparagine, 1.5 mM L-glutamine (AAG); 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere of 8% CO_2 . T cells were cultured in IMDM supplemented with 10% human serum, AAG, antibiotics, human recombinant IL-2 (50 U/mL; Chiron Healthcare SAS, Suresnes, France) and IL-7 (10 ng/mL (R&D Systems, Minneapolis, MN). Melanoma cells were treated with TNF- α (10 ng/mL; R&D Systems), IFN- α -2a (1,000 U/mL, Roferon-A; Roche, Nutley, NJ), IFN- γ (100 U/mL; PeproTech, Rocky Hill, NJ), IL-1 β (10 ng/mL; PeproTech) or IL-1 α (10 ng/mL; PeproTech). Anakinra (Kineret, rh-met-IL-1Ra; Amgen, Thousand Oaks, CA) is a recombinant, nonglycosylated form of human IL-1Ra. JNK inhibitor SP600125 and MEK inhibitor PD98059 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). MEK inhibitor U0126 was purchased from BIOMOL International (Plymouth Meeting, PA).

Retroviral transduction

Recombinant retroviruses were produced in 293T cells, as described.¹⁶ Target LB2259-MEL cells were plated in 75- cm^2 flasks; 24 and 48 h later, culture medium was removed, and viral supernatant was added, followed 3 h later by the addition of fresh cell-growing medium. Seventy-two hours after transduction with recombinant retroviruses harboring a Flag-Ik β M (S32A/S36A)-IRES-puromycin expression cassette, a stably infected puromycin-resistant population was obtained after selection in 0.8 $\mu\text{g/mL}$ puromycin (Sigma-Aldrich). A puromycin-resistant population harboring the empty retroviral vector was also generated to serve as a negative control. Retroviral expression vectors were kindly provided by Dr. K.

Marcu (Bologna, Italy and State University of New York, Stony Brook, NY).¹⁷

Quantitative RT-PCR

RNA samples were prepared from cell lines and surgical specimens using the guanidinium isothiocyanate/cesium chloride procedure¹⁸ or the InnuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena AG bio solutions, Jena, Germany). Total RNA was treated with TURBO DNase (Turbo DNA-freeTM Kit; Ambion, Austin, TX). The first-strand cDNA was produced from 2 μg of total RNA with the Superscript II reverse transcriptase and an oligo-dT primer, according to the manufacturer's protocol. The cDNA was then treated with 2 U of RNase H (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), and 1/40 of the reaction volume was used for PCR. Quantitative RT-PCR amplifications were performed with the PCR core kit (Eurogentec, Seraing, Belgium). PCR amplifications were performed in a final volume of 25 μL with 0.625 U of HotGold-Star DNA polymerase (Eurogentec), 200 nM of each primer, 100 nM of probe, 200 μM of each dNTP and 5 mM of MgCl_2 in an ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Halle, Belgium) with the following conditions: 94°C for 10 min, 45 cycles of 94°C for 15 s and 62°C for 1 min or for 1 min 30 (*ACTB*). The PCR primers and specific 5'-FAM/3'-TAMRA-labeled probes (Eurogentec) are described in Supporting Information Table 1. Samples for quantitative PCR were assayed at least in duplicate. Expression levels were normalized to 2,000 β -actin mRNA copies (we estimated previously that 2,000 is the mean amount of β -actin transcripts per cell). The statistical analyses were performed using the Student's *t*-test, and *p*-values of less than 0.05 (double sided) were considered as statistically significant.

Western blot

Cells were homogenized in lysis buffer containing 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% sodium deoxycholate, 0.5% NP-40 and 1/50 per milliliter of a protease inhibitor cocktail complete mini, EDTA-free tablet (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in phosphate-buffered saline (PBS). Protein samples were separated on a NuPAGE[®] 4–12% Bis-Tris gel (Invitrogen Life technologies) in MOPS Running Buffer, with NuPAGE antioxidant added to the inner chamber, according to the manufacturer's instructions (XCell Sure LockTM). Proteins were transferred from the gel to a Hybond-ECL nitrocellulose membrane (GE healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom) using the XCell II Blot Module. Membranes were incubated in a blocking solution containing 2.5% dry milk and 0.1% Tween-20 in PBS for 1 hour and then incubated with the following primary antibodies: anti-Ik β (C-21) rabbit polyclonal antibody sc-371 (1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti- β -actin monoclonal antibody, clone AC-15 A5441 (1:10,000 dilution; Sigma-Aldrich), anti-Melan-A mouse monoclonal antibody, clone A103 (1:1,000 dilution; Novocastra, lab., Newcastle upon Tyne, United Kingdom), anti-tyrosinase mouse monoclonal

antibody (T311) sc-20035 (1:1,000 dilution; Santa Cruz Biotechnology) or monoclonal anti-Flag M2 antibody F 1804 (1:1,000 dilution; Sigma-Aldrich). α Pep13h antibody against the C-terminus of human gp100 was kindly provided by Dr. M. Marks (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA). Membranes were then washed with PBS, 0.1% Tween-20 and incubated with the following secondary antibodies: either goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005 (1:1,000 dilution; Santa Cruz Biotechnology) or anti-rabbit IgG-HRP 7074 (1:1,000 dilution; Cell Signaling, Danvers, MA). If needed, membranes were stripped with the Restore Western blot Stripping buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) before reprobing. Immunoreactivity was revealed using the SuperSignal West Femto or West Pico chemiluminescent substrates (Thermo Fisher Scientific), followed by exposure to Hyperfilm ECL (GE healthcare).

Cytolytic T lymphocytes clones: stimulation conditions and recognition assay based on IFN- γ production

Cytolytic T lymphocytes (CTLs; 3×10^5) were cultured in 24-well plates with 1×10^6 irradiated allogeneic EBV-B feeder cells (LG2-EBV) and stimulated with EBV-B cells (3×10^5) previously incubated for 1 hr at 37°C with 1 μ g/mL of peptide and washed. All peptides were >90% pure, as indicated by analytical high-pressure liquid chromatography.

Tumor cells were tested for their ability to stimulate the production of IFN- γ by CTL clones. Approximately 10,000 cells of CTL clones Melan-A₂₆₋₃₅/HLA-A2 or gp100₂₀₉₋₂₁₇/HLA-A2, or 30,000 cells of CTL clone tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇/HLA-A2 were added in the microwells containing 20,000 tumor cells, in a total volume of 200 μ L of complete IMDM. After overnight culture, IFN- γ released in the supernatant was measured by ELISA using reagents from Medgenix Diagnostics-Biosource (Fleurus, Belgium).

Cytokine production assay

Melanoma cells (1×10^6) were seeded into 75-cm² flasks, and supernatants collected after 72 h were analyzed for IL-1 α and IL-1 β production using Bio-Plex Human Cytokine assays (Bio-Rad).

Gene expression microarrays

We examined the gene expression profile of five melanoma cell lines (DDHK62-MEL, LB2259-MEL, LB2586-MEL, LB2117-MEL and EB81-MEL) treated with IFN- α 1,000 U/mL, IFN- γ 100 U/mL or TNF- α 10 ng/mL for 72 hours. Cells were collected at rest or after stimulation with cytokines. RNA was extracted using the guanidinium isothiocyanate/cesium chloride procedure. Microarray assays were conducted according to the Affymetrix Genechip Expression Analysis Technical manual. Briefly, biotin-labeled antisense cRNA was prepared from 5 μ g of total RNA using the one-cycle target-labeling procedure and hybridized to HG-U133A2.0 gene chips (Affymetrix, Santa Clara, CA), which were then washed and stained with the Fluidics Station 450 (Affymetrix) and

scanned on the Gene Chip Scanner 3000 (Affymetrix). Data acquisition and processing were conducted with Affymetrix Genechips Operating Software, Excel and Access softwares. We compared the profiles of the five cell lines observed before and after cytokine treatment, focusing on genes that are relevant to antitumoral immune responses (Supporting Information Fig. 1). The Affymetrix data were deposited in GEO under accession number GSE19428.

Results

Exploring the effect of cytokines on melanoma cells, we compared the gene expression profiles of five human melanoma lines treated for 72 h with IFN- α , IFN- γ or TNF- α . Both IFN- γ and TNF- α downregulated genes *MLANA*, which encodes melanoma differentiation antigens recognized by CTL,¹⁹ and *MATP/AIM1*, which codes for a membrane-associated transporter protein, another melanoma antigen recognized by autologous T cells.²⁰ These results are in line with published data showing reduced expression of *MLANA*, *TRP-1*, *tyrosinase* and *gp100* in melanoma cells incubated with IFN- γ or TNF- α ^{21,22} and the absence of effect with IFN- α .²³ We sought to extend our study to another inflammatory cytokine, namely IL-1. There are three founding members of the IL-1 gene family, two of which are agonists, IL-1 α and IL-1 β , and the third is IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra; reviewed in Ref. ²⁴). IL-1 α and IL-1 β bind the same membrane-bound type 1 IL-1 receptor (IL-1R1), which then associates with the IL-1-receptor accessory protein (IL-1RAcP) to form a complex that allows intracellular signaling. There is also a type-2 IL-1 receptor (IL-1R2) that lacks an intracellular signaling domain and, therefore, functions as a decoy receptor. Along with stimulating differentiation and function of immune surveillance cells, IL-1 contributes to increased tumor invasiveness, metastasis and angiogenesis in chronic inflammatory conditions (reviewed in Ref. ²⁵).

Downregulation of MTF-M by interleukin-1 β

The expression of genes *MLANA* and *MATP/AIM1* is positively regulated by the melanocyte-specific isoform of microphthalmia-associated transcription factor (MITF-M).^{26,27} We, therefore, quantified *MITF-M* expression in two melanoma cell lines, LB2259-MEL and CP50-MEL, treated with IL-1 β (Fig. 1). An important and sustained reduction of *MITF-M* expression was observed, with a maximal effect after 4 hours of treatment. This kinetics was similar to that observed for the downregulation of *MITF-M* by TNF- α (Fig. 1), while the effect of IFN- γ took longer and was maximal only after 3 days (Fig. 1). IFN- α had no effect on *MITF-M* expression in these cells.

To extend our observations, we treated a panel of melanoma cell lines with IL-1 β . We observed a wide range of *MITF-M* inhibition, with about one third of the lines being not responsive to IL-1 β . As shown in Figure 2, the extent of *MITF-M* inhibition appeared to be correlated to the expression of gene *IL1R1* encoding the IL-1 receptor. We also observed a correlation between *MITF-M* inhibition and the

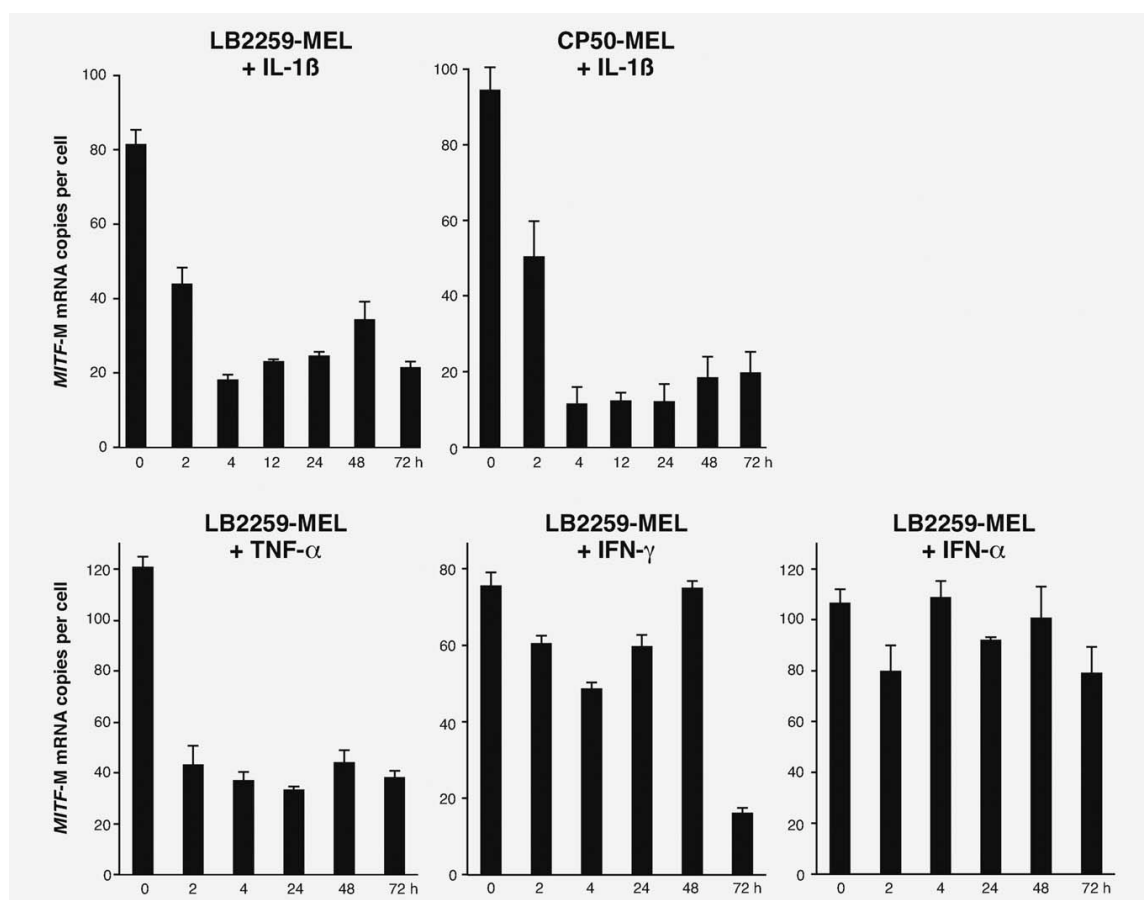


Figure 1. Time course of *MITF-M* expression in melanoma cell lines treated with cytokines. Melanoma cell lines LB2259-MEL or CP50-MEL were incubated for the indicated times with IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (10 ng/mL), IFN- γ (100 U/mL) or IFN- α (1,000 U/mL). Transcript levels of *MITF-M* and *ACTB* (used as an internal control) were evaluated by quantitative RT-PCR. Data (means $\pm$ SE) for IL-1 β , IFN- α and TNF- α were obtained from three independent experiments, whereas data for IFN- γ were obtained from one experiment, with triplicate incubations.

expression of the *IL8* gene, known to be induced after activation of the IL-1 receptor and encoding chemokine CXCL8 produced by some melanoma cell lines (Fig. 2).^{28,29}

Signaling through IL-1R1 involves the NF- κ B and JNK pathways. We inhibited NF- κ B activation in melanoma cells by expressing the super-repressor of I κ B α , I κ B α M. This mutant I κ B α exerts a permanent inhibition of NF- κ B because it cannot be phosphorylated and is, therefore, not degraded by proteasomes. LB2259-MEL cells transduced with retroviruses coding for I κ B α M were treated with IL-1 β for 4h. The levels of *MITF-M* transcripts were only 1.6-fold lower, as compared with 4.6-fold lower in control cells (Fig. 3a). This result confirmed the NF- κ B involvement in *MITF-M* regulation by IL-1 β .

We investigated the JNK pathway by treating LB2259-MEL cells with the ATP-competitive inhibitor of JNK, SP600125. We observed that the levels of *MITF-M* transcripts were 2.2-fold lower, while they were 6.7-fold lower in the ab-

sence of inhibitor, confirming the implication of the JNK pathway (Fig. 3b).

Finally, we explored whether the NF- κ B and the JNK pathways had additive effects. When I κ B α M-expressing LB2259-MEL cells, which exhibited a 2.1-fold lower expression of *MITF-M* following IL-1 β treatment, were treated with the JNK inhibitor, no effect of IL-1 β on *MITF-M* expression could be detected ($p = 0.35$, unpaired t -test; Fig. 3c). We concluded that the IL-1 β -mediated *MITF-M* downregulation in *IL1R1*-expressing melanoma cell lines is NF- κ B and JNK-dependent and that inactivation of both pathways abrogates the repressive effect of IL-1 β .

IL-1 β reduces the recognition of melanoma cells by CTL against melanocyte differentiation antigens

Because IL-1 β decreases the expression of *MITF-M* and *MITF-M* activates the expression of melanocyte

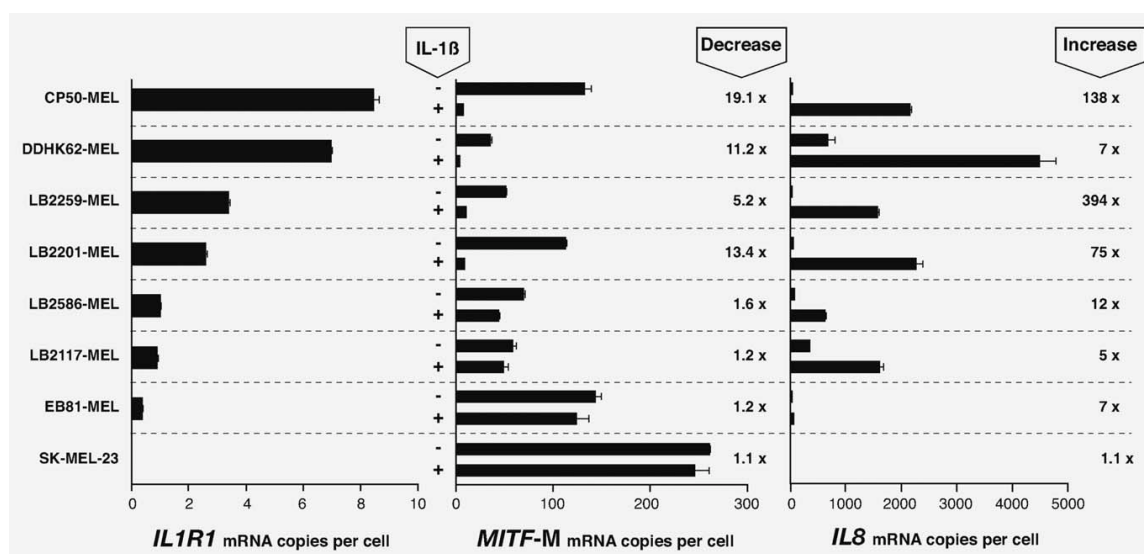


Figure 2. IL-1 β downregulates the expression of *MITF-M* in some melanoma cell lines. *MITF-M* repression after 4 h of IL-1 β treatment is observed in melanoma cell lines expressing high levels of IL-1 receptor transcripts. Transcript levels of *IL1R1*, *MITF-M*, *IL8* and *ACTB* (used as an internal control) were evaluated by quantitative RT-PCR in triplicate. Each value represents mean $\pm$ SE.

differentiation genes such as *MLANA*, *tyrosinase* and *gp100*, we tested the effect of IL-1 β on the expression of these genes. For two melanoma lines displaying *MITF-M* downregulation by IL-1 β , namely LB2259-MEL and CP50-MEL, cultured for 4 days in the presence of IL-1 β lead to a reduction of *MLANA*, *tyrosinase* and *gp100* transcripts and proteins (Fig. 4a). This resulted in a decreased recognition by CTL clones recognizing *MLANA* or *tyrosinase* antigenic peptides (Fig. 4b). Surprisingly, no effect was observed with a CTL clone recognizing a *gp100* peptide (Fig. 4b), even though the amount of protein *gp100* was clearly decreased after IL-1 β treatment (Fig. 4a).

For melanoma cells SK-MEL-23, which do not express *IL1R1* (Fig. 2), IL-1 β had no effect on the expression of melanocyte differentiation genes and proteins (Fig. 4a), and no effect on the recognition of melanocyte differentiation antigens by CTL (Fig. 4b). We conclude that IL-1 β can contribute to decreasing the sensitivity of melanoma cells to recognition by CTL targeting melanocyte differentiation antigens.

Bioactive IL-1 α and IL-1 β are produced by *MITF-M*-negative melanoma cells

We explored the possibility that some melanoma tumors might not express *MITF-M* and, therefore, resist attack by CTL-recognizing melanocyte differentiation antigens, by producing IL-1 β . Indeed, production of IL-1 cytokines by melanoma lines has been previously reported.^{30,31} In our collection of 205 melanoma cell lines, we observed that 19% did not express gene *MLANA*. Expression of *MLANA* was corre-

lated with that of *MITF-M*, as 19 of 19 *MLANA*-positive cell lines expressed *MITF-M*, whereas 20 of 22 *MLANA*-negative cell lines did not express *MITF-M* (<1 *MITF-M* mRNA copy per cell). Thus, we considered that 17% of the cell lines in our collection were *MITF-M*-negative. Screening the supernatants of 11 *MITF-M*-negative lines for the production of IL-1 α or IL-1 β by Bio-Plex immunoassay, we found nine positive supernatants with total IL-1 levels ranging from 20 to 7,240 pg/mL. These supernatants reduced by $>20\%$ *MITF-M* expression in LB2259-MEL cells. For eight supernatants, the effect was blocked by the addition of the IL-1 receptor antagonist IL-1Ra. In parallel, we tested 19 supernatants of *MITF-M*-positive lines and found that total IL-1 was either undetectable or present at levels below 12 pg/mL. We conclude that $\sim 13\%$ of human melanoma lines are *MITF-M*-negative and produce bioactive IL-1.

In this small screening, melanoma lines EB16-MEL and KUL84-MEL were the highest IL-1 producers. In Table 1, these two *MITF-M*-negative lines are compared with two *MITF-M*-positive lines. EB16-MEL cells transcribe the *IL1B* gene at a high level and secrete immunoreactive IL-1 β in the culture medium. It is, therefore, likely that EB16-MEL cells have an activated NLRP3 inflammasome pathway, which is required to activate caspase-1 and process the pro-IL-1 β gene product into mature and secreted IL-1 β . For KUL84-MEL cells, *IL1B* transcription is low, and no IL-1 β could be detected in the culture medium (Table 1). However, these cells, as well as EB16-MEL, transcribe gene *IL1A* and secrete IL-1 α (Table 1). Two genes activated by IL-1 cytokines, *IL8* and *CCL20*, were 10- to 1,000-fold more expressed in EB16-

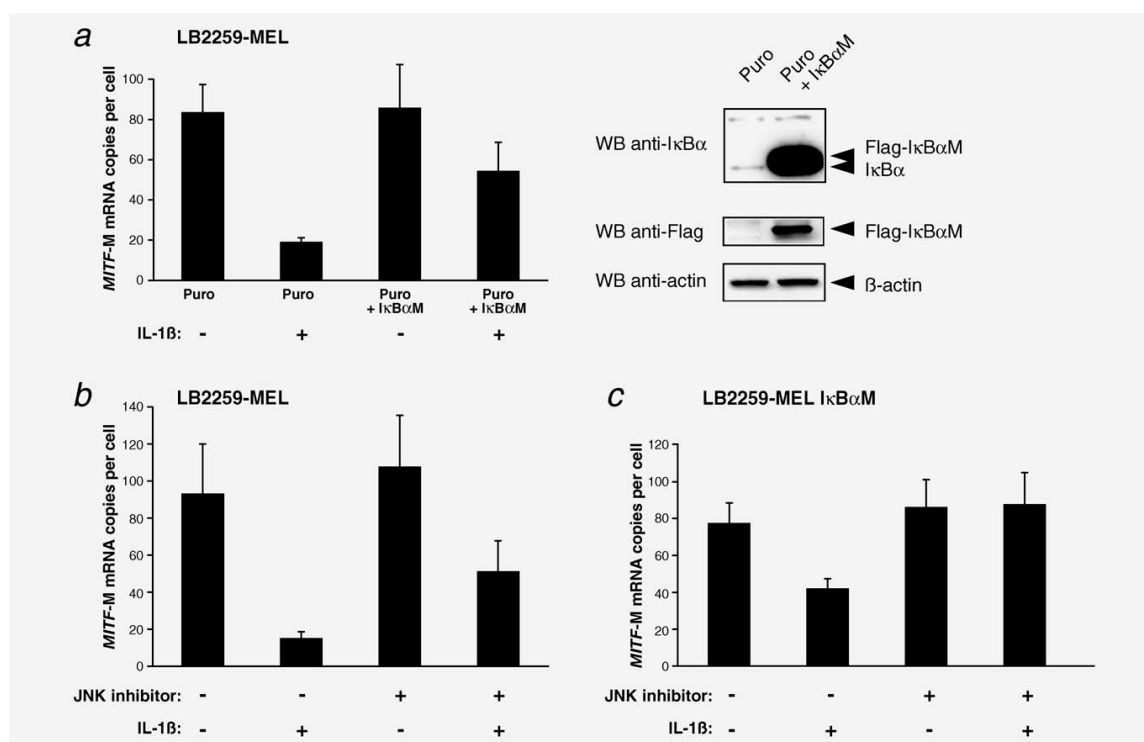


Figure 3. JNK and NF- κ B pathways involved in the downregulation of *MITF-M* by IL-1 β . (a) Stable expression of I κ B α M, a repressor of NF- κ B activation, decreases IL-1 β -induced down-regulation of *MITF-M*. LB2259-MEL cells were transduced with retroviruses encoding puromycin resistance and a flagged I κ B α M, or puromycin resistance alone. Stable puromycin-resistant cell populations were obtained and treated with IL-1 β (10 ng/mL) for 4 h. *MITF-M* expression was measured by quantitative RT-PCR and normalized to *ACTB* expression (means $\pm$ SD of five samples from two experiments). Western blot analyses were carried out on whole cell protein extracts with antibodies against I κ B α , the Flag epitope and β -actin. (b) JNK inhibition decreases IL-1 β -induced downregulation of *MITF-M*. LB2259-MEL cells were pretreated with JNK inhibitor SP600125 (25 μ M) for 1 h before the addition of IL-1 β . *MITF-M* expression was measured 4 h later and normalized to *ACTB* expression (means $\pm$ SD of six samples from four experiments). (c) Effect of inactivating both the NF- κ B and JNK pathways on *MITF-M* repression by IL-1 β . LB2259-MEL cells expressing I κ B α M were treated with SP600125 for 1 h before the addition of IL-1 β . *MITF-M* expression was measured 4 h later and normalized to *ACTB* expression (means $\pm$ SD of five samples from three experiments).

MEL and KUL84-MEL than in the control melanoma lines, suggesting an autocrine activity of the produced IL-1 (Table 1). Finally, the supernatants of the two IL-1 producing lines inhibited *MITF-M* expression and activated *IL8* expression in melanoma cells LB2259-MEL (Fig. 5). These effects were blocked in the presence of IL-1Ra (Fig. 5), and dose-response curves of recombinant IL-1 α or IL-1 β indicated specific activities matching those observed in the melanoma supernatants (Fig. 5), suggesting that IL-1 were the main soluble factors responsible for *MITF-M* downregulation.

To verify that melanoma cells could also produce IL-1 *in vivo*, we analyzed frozen tumor tissues corresponding to the four melanoma lines shown in the first part of Table 1. Expression levels of *MITF-M*, *IL1A*, *IL1B* and IL-1-induced genes *IL8* and *CCL20* correlated with those observed in the melanoma lines (Table 1). Although other cells than the melanoma cells could contribute to IL-1 production in these

tumors, the results strongly suggest that the melanoma cells were producing IL-1 *in vivo*.

Considering that IL-1 α and IL-1 β can activate their own transcription through functional NF- κ B sites present in the promoters of both genes,^{32,33} we explored the possibility of a permanent IL-1 autocrine loop in melanoma cells. Melanoma cells CP50-MEL express gene *MITF-M* and do not express genes *IL1A* and *IL1B*. In the presence of IL-1 β , genes *IL1A* and *IL1B* were induced (Fig. 6). When the cells were deprived of IL-1 β after 1 week of exposure, the transcriptional activation of *IL1B* lasted 3 days but then declined to background level (data not shown). Therefore, other factors than the IL-1R1 transduction pathway are necessary for the permanent *IL1B* gene activation that is present in some melanoma cells.

Nevertheless, in KUL84-MEL cell line with established IL-1 cytokine production, treatment with the IL-1Ra receptor

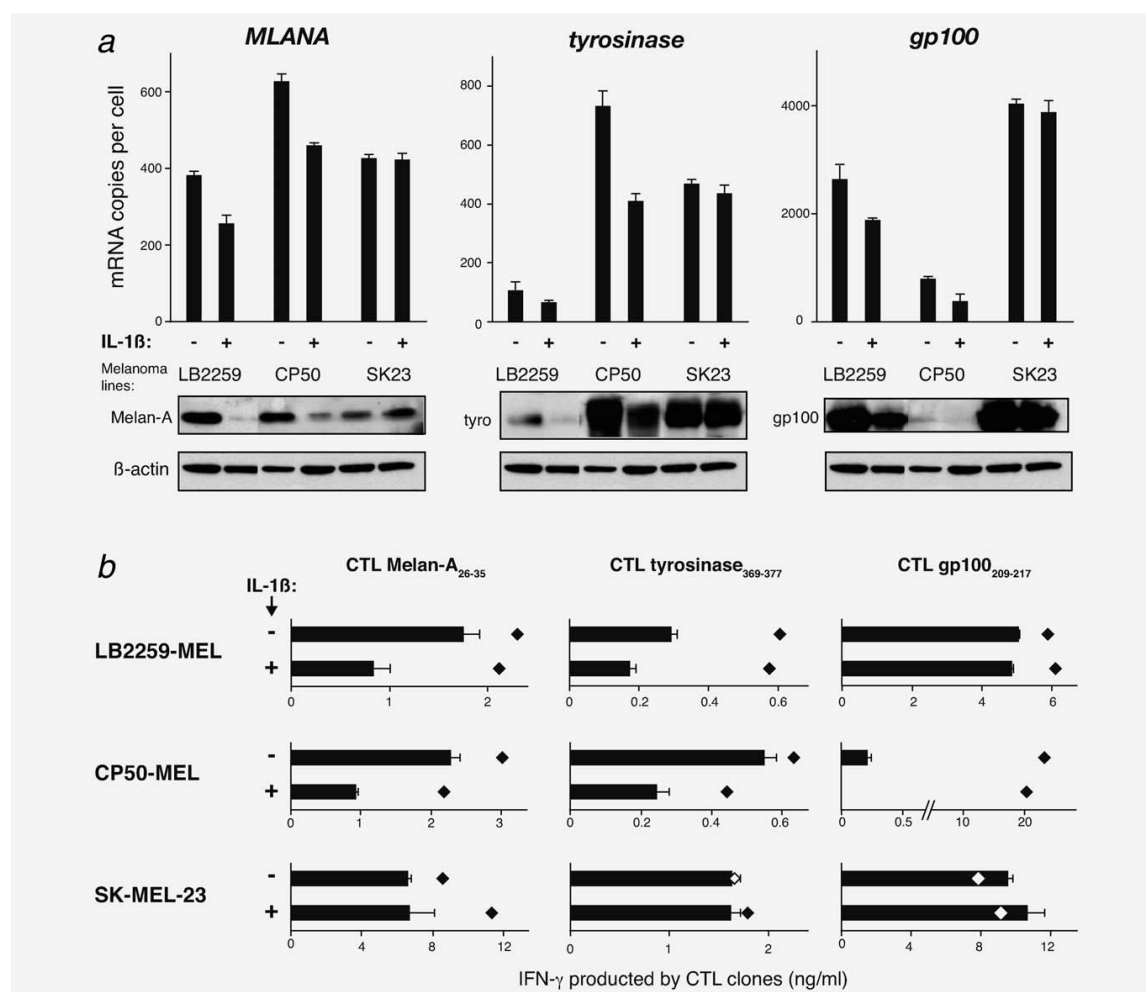


Figure 4. IL-1 β downregulates expression of melanocyte differentiation genes. (a) Effect of IL-1 β on mRNA and protein levels of melanocyte differentiation genes. The indicated melanoma cell lines were treated with IL-1 β (10 ng/mL added every day) for 4 days. *MLANA*, *tyrosinase*, *gp100* and *ACTB* (used as internal control) mRNA levels were analyzed by quantitative RT-PCR in triplicate. Each value represents mean $\pm$ SE. Protein extracts (25 μ g) were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. (b) HLA-A2-positive melanoma cell lines were treated with IL-1 β for 4 days (10 ng/mL added every day) and cocultured overnight with three HLA-A2-restricted CTL clones. IFN- γ produced by activated CTL was measured by ELISA. Results are means $\pm$ SD of triplicate measurements. Diamonds indicate IFN- γ production obtained when 5 μ g/mL of the relevant antigenic peptide was added to the melanoma cells 1h before CTL addition, as a control for a maximum CTL activation.

antagonist for 1 week lead to 2- to 20-fold lower levels of *IL1A*, *IL1B* and *IL8* transcripts, but to a weak increase in *MITF-M* expression (Supporting Information Fig 2).

Discussion

It is known that murine and human melanoma cells incubated with cytokines, such as TNF- α , IFN- γ and TGF- β , have reduced mRNA levels of *TYR*, *MLANA*, *TRP1* and *SILV*.^{21,22,34,35} According to our results, this reduction most likely originates from the downregulation of transcription

factor *MITF-M* by these cytokines. We provide the first evidence that IL-1 α and IL-1 β are additional cytokines that reduce the expression of *MITF-M*. It is noteworthy that IFN- α , which is currently used to treat melanoma patients, did not affect *MITF-M* expression. This supports further development of this cytokine as an immunological adjuvant combined with melanoma vaccines.

The activation of NF- κ B that is observed in many cancers including melanoma, regulates the expression of genes that prevent apoptosis and promote malignant proliferation,

Table 1. Transcription and production of IL-1 by melanoma cell lines and tumors

	Gene expression (mRNA copies/cell)					Cytokine production (pg/mL)	
	<i>MITF-M</i>	<i>IL1β</i>	<i>IL1α</i>	<i>IL8</i>	<i>CCL20</i>	<i>IL-1β</i>	<i>IL-1α</i>
Melanoma cell lines							
EB16-MEL	0.0 ± 0.0	1380.7 ± 240.9	112.0 ± 47.7	1683.6 ± 657.8	14.8 ± 8.5	2050 ± 310	5187 ± 113
KUL84-MEL	0.0 ± 0.0	18.4 ± 6.9	142.7 ± 11.4	631.7 ± 37.2	22.7 ± 2.8	<3	1327 ± 37
LB2259-MEL	59.1 ± 14.4	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.1 ± 1.4	0.0 ± 0.0	<3	<2
LB2439-MEL	152.3 ± 28.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.8 ± 1.7	0.2 ± 0.1	<3	<2
Tumor tissues							
EB16	0.0 ± 0.0	347.4 ± 97.1	0.3 ± 0.1	261.8 ± 66.3	4.9 ± 1.9		
KUL84	0.1 ± 0.1	15.2 ± 11.7	4.8 ± 1.6	57.9 ± 6.8	38.3 ± 11.7		
LB2259	45.7 ± 1.3	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0		
LB2439	54.2 ± 6.6	0.5 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.0		

mRNA levels of *MITF-M*, *IL1B*, *IL1A*, *IL8*, *CCL20* and *ACTB* (used as an internal control) were evaluated by quantitative RT-PCR in melanoma cell lines and corresponding melanoma tissues. For each cell line or tissue, results were obtained from three independent RNA preparations, except for tissues LB2259 and LB2439 where a single cDNA was analyzed in three independent PCR measurements. Each value represents mean ± SD. The levels of secreted IL-1α and IL-1β were measured in three independently collected supernatants with the bead-based Bio-Plex immunoassay. Each value represents mean ± SD.

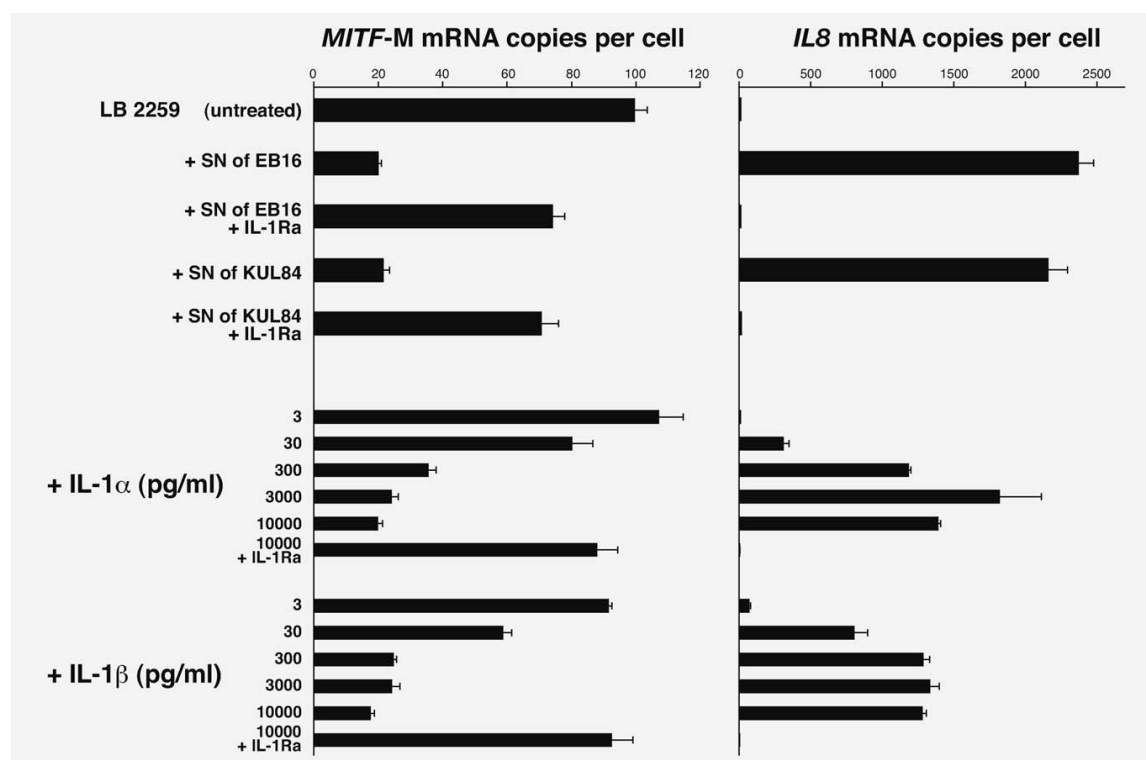


Figure 5. Bioactive IL-1 secreted by melanoma cell lines. LB2259-MEL cells were incubated 4 h with culture supernatants (SN) of the indicated melanoma cell lines, in the presence or absence of 10 µg/mL of IL-1Ra or with increasing concentrations of recombinant human IL-1α or IL-1β. The expression levels of *MITF-M* and *IL8*, as a control of the biological activity of the IL-1 cytokines, was assessed by quantitative RT-PCR and normalized to *ACTB* expression. Each value represents mean ± SE from one representative experiment with triplicate incubations with supernatants and duplicate incubations with recombinant IL-1.

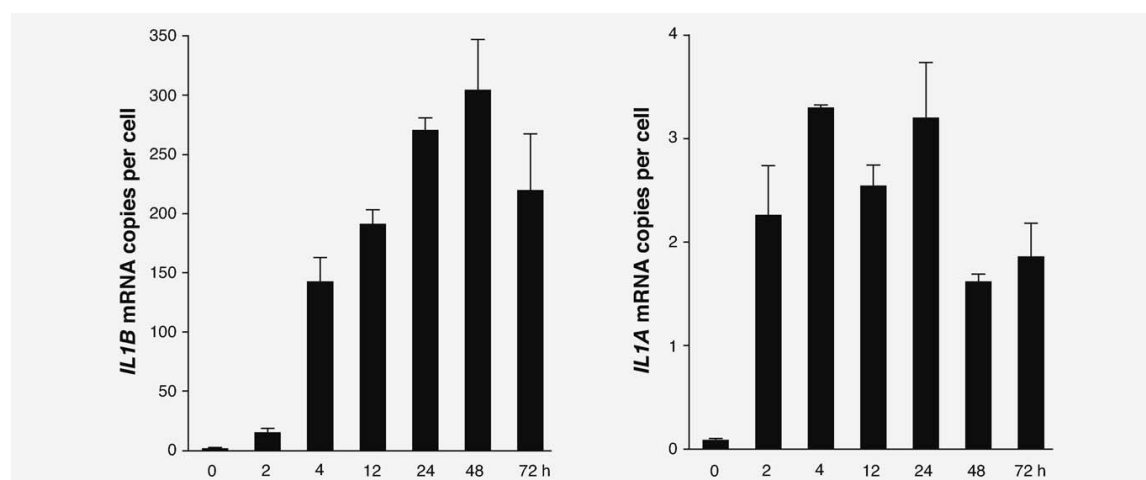


Figure 6. IL-1 β upregulates its own expression and expression of *IL1A* in CP50-MEL cells. Time course of *IL1B* and *IL1A* upregulation by IL-1 β . CP50-MEL melanoma cells were treated with IL-1 β (10 ng/mL) for the indicated time periods. Quantification of *IL1B* and *IL1A* transcripts normalized to those of *ACTB* shows means $\pm$ SE of three and two independent experiments, respectively.

metastasis or angiogenesis.³⁶ NF- κ B is usually described as a transcriptional activator. We show here that genes encoding melanocyte differentiation antigens are repressed by NF- κ B and JNK activation. The mechanism of this repression remains to be elucidated. The signal induced by IL-1 β could act on the *MITF-M* promoter. We tested this promoter in front of a reporter *luciferase* gene but failed to detect any repression after IL-1 β treatment (data not shown). Alternatively, the signal could increase the *MITF-M* transcript degradation rate. One possibility is that IL-1 β and TNF- α induce miRNAs that target the *MITF-M* mRNAs. In line with this hypothesis, a recent study describes the NF- κ B-dependent induction of miRNA-146 targeting the 3'UTRs of the mRNAs encoding TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) and IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), two proteins involved in IL-1R1 signaling.³⁷ Another miRNA, miRNA-137, was reported to reduce *MITF-M* expression in melanoma cell lines.³⁸ We could not document an induction of miRNA-137 by IL-1 β (data not shown).

We report here that the level of expression of the IL-1 receptor (*IL1R1*) is an important parameter to determine the ability of melanoma cells to respond to IL-1. However, when we expressed *IL1R1* in SK-MEL-23 cells, we observed the induction of *IL8* after IL-1 β treatment, but not the repression of *MITF-M* (data not shown). This observation suggests that there are distinct mechanisms downstream of the NF- κ B and JNK pathways that lead either to *IL8* activation or to *MITF-M* downregulation.

The critical role of an activated MAPK pathway in melanoma growth and progression has prompted attempts to develop inhibitors of this pathway.³⁹ *In vitro*, these inhibitors consistently enhance *MLANA* or *SILV* transcript levels, as reported for 70% of the melanoma cell lines treated with the

ERK inhibitors PD98059 and U0126.⁴⁰ We found that in the LB2259-MEL human melanoma cells, the repressive effect of IL-1 β on *MITF-M* expression was dependent on both NF- κ B and JNK activation. *MITF-M* downregulation induced by IL-1 β was not mediated by ERK activation, because we found that inhibitors PD98059 and U0126 did not counteract this effect (data not shown). In agreement with our findings, a study on murine melanoma cells B16 showed that the inhibition of *TYR* expression by TNF- α was mainly mediated by NF- κ B activation.²¹ Given the overlap in signaling pathways used by TNF- α and IL-1 cytokines (reviewed in Ref. ⁴¹), we suggest that NF- κ B and JNK are important mediators in the observed downregulation of differentiation genes in melanoma cells incubated with these inflammatory cytokines. Detailed signaling mechanisms should, therefore, be explored further.

The decreased expression of melanocyte differentiation genes after IL-1 β treatment should decrease the recognition of melanoma cells by T lymphocytes specific for differentiation antigens. This is what we found with two antimelanoma CTL clones, including a CTL recognizing the immunodominant peptide Melan-A/MART1_{26–35}, presented by HLA-A2. In a previous study, IFN- γ was shown to reduce by up to 78% the cytotoxicity of anti-Melan-A/MART-1_{26–35} CTL, despite the stimulatory effect of IFN- γ on MHC class I expression and antigen presentation.²² This reduction is most likely due to the induction of the immunoproteasome, which does not process the Melan-A/MART-1_{26–35} peptide.⁴² Data of a recent study suggest that IL-1 β is not able to induce the immunoproteasome.⁴³ Therefore, we conclude that the main effect of IL-1 β on CTL activation was to reduce tyrosinase, Melan-A/MART-1 and gp100 protein levels. Surprisingly, the activation of CTL directed against the gp100_{209–217} antigen

on LB2259-MEL cells was not affected by IL-1 β , although there was a clear decrease in the amount of gp100 protein. One explanation would be that saturating levels of the gp100 antigenic peptide may be available to CTL, even after IL-1 β treatment. Alternatively, IL-1 β may promote postproteasomal processing and intracellular peptide transport that may be required for recognition of the gp100 antigen, as there is some evidence that peptide gp100₂₀₉₋₂₁₇ is not directly produced by the proteasome.⁴⁴

Cytokines are produced not only by immune, stromal and inflammatory cells but also by tumor cells. We found that IL-1 α and IL-1 β are clearly secreted in large amounts by some melanoma cells that do not express *MITF-M*. This is in line with data indicating that soluble proteins secreted by antigen-negative melanoma cells, such as cytokine oncostatin M, are capable of downregulating the expression of melanocyte differentiation genes.^{45,46} It is also in line with the observation that *IL-1* is upregulated in melanoma samples and that patients with IL-1 producing tumors have generally bad prognoses.⁴⁷ At first sight, interference with the IL-1 signaling in melanoma might, therefore, appear as a meaningful strategy to overcome the immunotherapeutic problem of low antigen expression. In an attempt to increase the expression of melanocyte differentiation antigens, we incubated melanoma cells that express very low amounts of *MITF-M* and produce IL-1 with the IL-1Ra receptor antagonist. We observed that this treatment was not sufficient to reactivate significantly *MITF-M* expression. We have, therefore, preliminary evidence that the silencing of differentiation genes in IL-1-producing melanoma cells is difficult to reverse. The difficulties in restoring the expression of differentiation genes once it is lost have been previously reported, and the estab-

lishment of a nuclear context leading to their transcriptional repression has been proposed^{48,49}.

In our experience, an activated IL-1 pathway is an event that is detected in only ~13% of melanoma cell lines. By screening public microarray databases, we observed a similar frequency of 13% among large series of melanoma cell lines and an even lower frequency of 4% among melanoma metastases (data not shown). Nevertheless, these data do not exclude the possibility of local and hardly detectable IL-1 production either by melanoma cells themselves or by stromal macrophages and fibroblasts,^{13,50} resulting in downregulation of differentiation antigens in neighboring tumor cells. Therefore, additional attempts should be performed to determine spatial and temporal changes in expression of IL-1 cytokines and differentiation antigens preferably at the cellular level and at different stages of melanoma progression. This could lead to a better understanding of the relevance of IL-1 production within melanoma tissues.

Acknowledgements

J.V. is a Research Fellow with the Fonds National de la Recherche Scientifique (Belgium). O.K. was supported by a Télévie Grant from the Fonds National de la Recherche Scientifique (Belgium) and the Centre du Cancer (Cliniques Universitaires Saint-Luc, UCL, Belgium). We thank Dr. Thierry Boon and Dr. Benoît Van den Eynde for critical reading of the manuscript. We also thank Dr. S. Shibahara (Tohoku University School of Medicine, Japan) for providing reporter constructs for the *M* promoter of the human *MITF* gene, Dr. M. Martin (Justus-Liebig-University Giessen, Germany) and Dr. W. Falk (University of Regensburg, Germany) for the *IL1R1* expression vector and Dr. B. Lethé for providing the reagents for *tyrosinase* and *gp100* quantitative PCR. We thank Ms. Suzanne Depelchin for excellent editorial assistance, Mr. Jérôme Degueldre for samples and data managing, Mr. Magdalena Swinarska, Ms. Thérèse Aerts and Ms. Vinh Ha Thi for expert technical assistance.

References

- Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, Simpson C, Carter C, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 1988;319: 1676-80.
- Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 2006;24:175-208.
- Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, Herlyn M, Parmiani G. Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J Exp Med* 1993; 177:989-98.
- Quaglino P, Marengo F, Osella-Abate S, Cappello N, Ortoncelli M, Salomone B, Fierro MT, Savoia P, Bernengo MG. Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study. *Ann Oncol*, in press.
- Le Gal FA, Avril MF, Bosq J, Lefebvre P, Deschemin JC, Andrieu M, Dore MX, Guillet JG. Direct evidence to support the role of antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma-associated vitiligo. *J Invest Dermatol* 2001;117:1464-70.
- Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:295-307.
- Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, Castelli C, Mariani L, Parmiani G, Rivoltini L. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol* 2007;25:2546-53.
- Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003;9:1269-74.
- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fittz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192:1027-34.
- Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56: 739-45.
- Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Mancini M, Rosenberg SA. Specific release of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, and IFN-gamma by human tumor-infiltrating

- lymphocytes after autologous tumor stimulation. *J Immunol* 1991;146:3674–81.
12. Sander B, Boeryd B. Tumor necrosis factor- α expression in human primary malignant melanoma and its relationship to tumor infiltration by CD3+ cells. *Int J Cancer* 1996;66:42–7.
13. Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF α and IL-1 α . *Int J Cancer* 2000;85:182–8.
14. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol* 1997;15:749–95.
15. Strehl B, Seifert U, Kruger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Interferon- γ , the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 2005;207:19–30.
16. Kholmanskikh O, Lorient A, Brasseur F, De Plaen E, De Smet C. Expression of BORIS in melanoma: lack of association with MAGE-A1 activation. *Int J Cancer* 2008;122:777–84.
17. Penzo M, Massa PE, Olivetto E, Bianchi F, Borzi RM, Hanidu A, Li X, Li J, Marcu KB. Sustained NF- κ B activation produces a short-term cell proliferation block in conjunction with repressing effectors of cell cycle progression controlled by E2F or FoxM1. *J Cell Physiol* 2009;218:215–27.
18. Davis LG, Dibner MD, Battey JF. Guanidine isothiocyanate preparation of total RNA. In: Davis LG, Dibner MD, Battey JF, eds. Basic methods in molecular biology. New York: Elsevier, 1986. 130–5.
19. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora J-P, Renauld J-C, Boon T. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1994;180:35–42.
20. Harada M, Li YF, El-Gamil M, Rosenberg SA, Robbins PF. Use of an in vitro immunoselected tumor line to identify shared melanoma antigens recognized by HLA-A*0201-restricted T cells. *Cancer Res* 2001;61:1089–94.
21. Englaro W, Bahadoran P, Bertolotto C, Busca R, Derijard B, Livolsi A, Peyron JF, Ortonne JP, Ballotti R. Tumor necrosis factor α -mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor κ B activation. *Oncogene* 1999;18:1553–9.
22. Le Poole IC, Riker AI, Quevedo ME, Stennett LS, Wang E, Marincola FM, Kast WM, Robinson JK, Nickoloff BJ. Interferon- γ reduces melanosomal antigen expression and recognition of melanoma cells by cytotoxic T cells. *Am J Pathol* 2002;160:521–8.
23. Certa U, Seiler M, Padovan E, Spagnoli GC. Interferon- α sensitivity in melanoma cells: detection of potential response marker genes. *Recent Results Cancer Res* 2002;160:85–91.
24. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519–50.
25. Apte RN, Voronov E. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol Rev* 2008;222:222–41.
26. Du J, Fisher DE. Identification of Aim-1 as the underwhite mouse mutant and its transcriptional regulation by MITF. *J Biol Chem* 2002;277:402–6.
27. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol* 2003;163:333–43.
28. Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnecki BM. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* 1993;151:2667–75.
29. Singh RK, Varney ML. Regulation of interleukin 8 expression in human malignant melanoma cells. *Cancer Res* 1998;58:1532–7.
30. Bennicelli JL, Elias J, Kern J, Guerry DT. Production of interleukin 1 activity by cultured human melanoma cells. *Cancer Res* 1989;49:930–5.
31. Elaraj DM, Weinreich DM, Varghese S, Puhlmann M, Hewitt SM, Carroll NM, Feldman ED, Turner EM, Alexander HR. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2006;12:1088–96.
32. Hiscott J, Marois J, Garoufalidis J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G, et al. Characterization of a functional NF- κ B site in the human interleukin 1 β promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 1993;13:6231–40.
33. Niu J, Li Z, Peng B, Chiao PJ. Identification of an autoregulatory feedback pathway involving interleukin-1 α in induction of constitutive NF- κ B activation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279:16452–62.
34. Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor- β 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1482–91.
35. Gollob JA, Sciambi CJ, Huang Z, Dressman HK. Gene expression changes and signaling events associated with the direct antitumor effect of IFN- γ . *Cancer Res* 2005;65:8869–77.
36. Naugler WE, Karin M. NF- κ B and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:19–26.
37. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12481–6.
38. Bemis LT, Chen R, Amato CM, Classen EH, Robinson SE, Coffey DG, Erickson PF, Shellman YG, Robinson WA. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Res* 2008;68:1362–8.
39. Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Macaron N, Arbiser JL. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* 2002;8:3728–33.
40. Kono M, Dunn IS, Durda PJ, Butera D, Rose LB, Haggerty TJ, Benson EM, Kurnick JT. Role of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of human melanocytic antigen expression. *Mol Cancer Res* 2006;4:779–92.
41. Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF- κ B: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2964–78.
42. Morel S, Lévy F, Burlet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Kepper M, Peitrequin A-L, Monsarrat B, Van Velthoven R, Cerottini J-C, Boon T, Gairin JE, Van den Eynde BJ. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 2000;12:107–17.
43. Leblond J, Hubert-Buron A, Bole-Feysot C, Ducrotte P, Dechelotte P, Coeffier M. Regulation of proteolysis by cytokines in the human intestinal epithelial cell line HCT-8: role of IFN- γ . *Biochimie* 2006;88:759–65.
44. Nagorsen D, Servis C, Levy N, Provenzano M, Dudley ME, Marincola FM, Levy F. Proteasomal cleavage does not determine immunogenicity of gp100-derived peptides gp100 209–217 and gp100 209–217T210M. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:817–24.
45. Kurnick JT, Ramirez-Montagut T, Boyle LA, Andrews DM, Pandolfi F, Durda PJ, Butera D, Dunn IS, Benson EM, Gobin SJ, van den Elsen PJ. A novel autocrine

- pathway of tumor escape from immune recognition: melanoma cell lines produce a soluble protein that diminishes expression of the gene encoding the melanocyte lineage melan-A/MART-1 antigen through down-modulation of its promoter. *J Immunol* 2001;167:1204–11.
46. Durda PJ, Dunn IS, Rose LB, Butera D, Benson EM, Pandolfi F, Kurnick JT. Induction of “antigen silencing” in melanomas by oncostatin M: down-modulation of melanocyte antigen expression. *Mol Cancer Res* 2003;1:411–9.
47. Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med* 2006;4:48.
48. Vachtenheim J, Novotna H, Ghanem G. Transcriptional repression of the microphthalmia gene in melanoma cells correlates with the unresponsiveness of target genes to ectopic microphthalmia-associated transcription factor. *J Invest Dermatol* 2001;117:1505–11.
49. Fang D, Tsuji Y, Setaluri V. Selective down-regulation of tyrosinase family gene TYRP1 by inhibition of the activity of melanocyte transcription factor MITF. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3096–106.
50. Li L, Dragulev B, Zigrino P, Mauch C, Fox JW. The invasive potential of human melanoma cell lines correlates with their ability to alter fibroblast gene expression in vitro and the stromal microenvironment in vivo. *Int J Cancer* 2009;125:1796–804.

2. Résultats intermédiaires

Dans ce premier article, nous avons montré que l'IL-1 α et l'IL-1 β , produits parfois par les cellules tumorales elles-mêmes, étaient capables de réprimer l'expression de MITF-M et, par conséquent, de plusieurs antigènes de différenciation, via un mécanisme dépendant de NF- κ B et JNK. Cette répression induisait une diminution de l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique dirigée contre ces antigènes de différenciation. Cependant, les mécanismes moléculaires précis menant à cette répression n'avaient pas été identifiés. Dans les expériences suivantes, nous nous sommes donc intéressés aux facteurs en aval de NF- κ B et JNK qui pourraient être impliqués dans cette répression.

2.1 Le promoteur spécifique de *MITF-M* ne semble pas impliqué dans la répression induite par l'IL-1 β

La première hypothèse que nous avons envisagée pour expliquer la répression de l'expression de MITF-M en présence d'IL-1 β est la répression de la transcription. Nous avons donc cloné, en amont d'un gène codant une luciférase, le promoteur spécifique de *MITF-M* de 4,5 kb contenant les différentes séquences ciblées par les facteurs de transcription connus pour réguler son expression. Nous avons également réalisé une autre construction contenant un promoteur de *MITF-M* de 15 kb comprenant la séquence MDE ciblée par SOX10 (Figure 2, Introduction).

Des cellules LB2259-MEL ont été transfectées stablement avec la construction contenant le promoteur de 4,5 kb de *MITF-M* ou transitoirement avec la construction contenant le promoteur de *MITF-M* de 15 kb et ont ensuite été incubées 24h en présence d'IL-1 β . Ce timing a été utilisé étant donné la stabilité importante de la luciférase qui ne permet pas d'observer de diminution de son activité pendant des temps plus courts. Cependant, aucune diminution de l'activité luciférase n'a été observée en présence d'IL-1 β (Figure 1). Dès lors, la répression de la transcription de *MITF-M* en présence d'IL-1 β ne semble pas impliquer le promoteur classique de *MITF-M*.

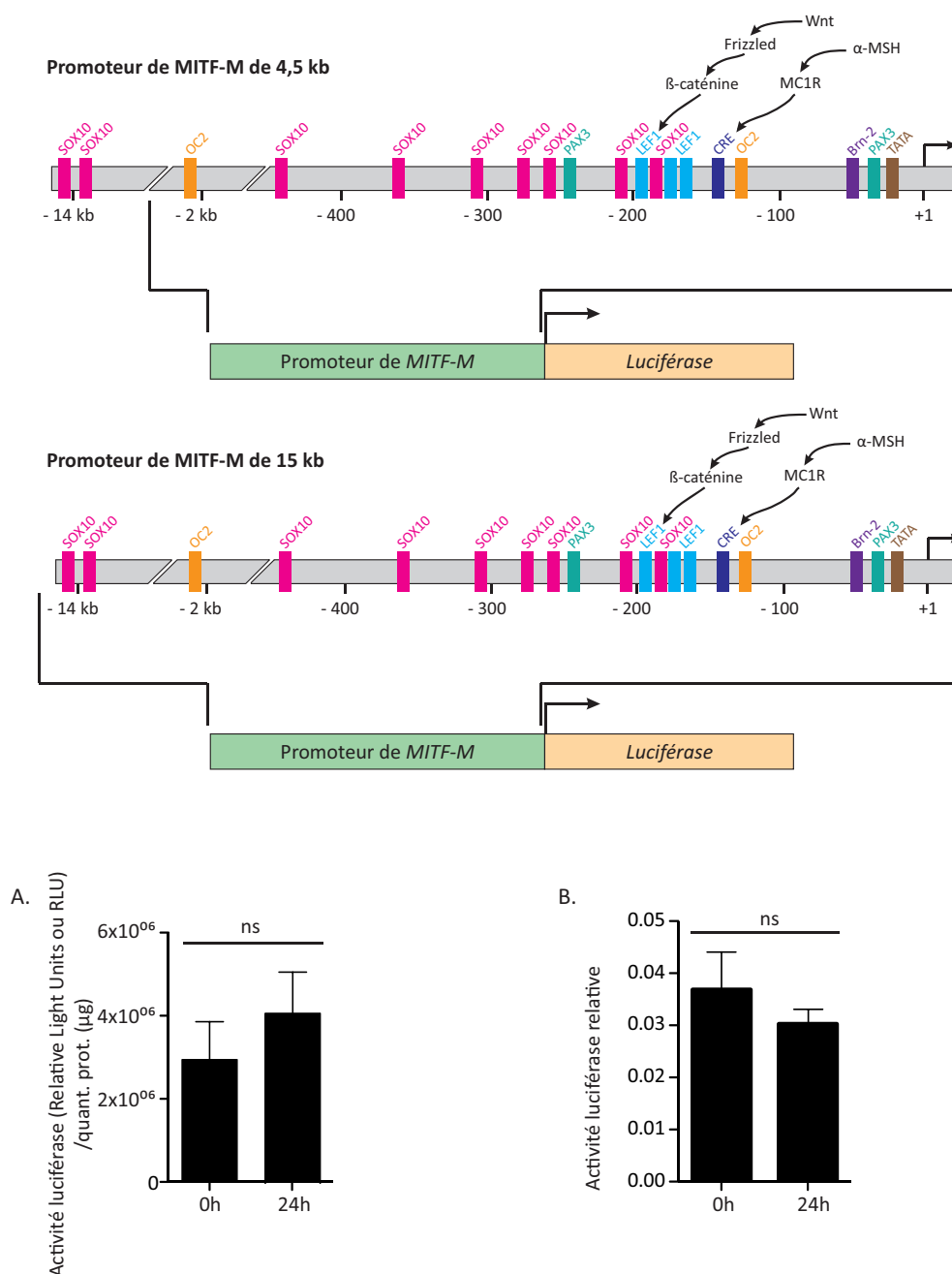


Figure 1 : Les cellules LB2259-MEL ont été transfectées stablement avec le promoteur de 4,5 kb de *MITF-M* (A) ou transitoirement avec le promoteur de *MITF-M* de 15 kb (B) et ont été incubées pendant 24h avec de l'IL-1 β (10 ng/ml).

L'activité de la luciférase de luciole, sous le contrôle du promoteur de *MITF-M*, a été normalisée par rapport à la quantité en protéines pour les transfectants stables. Dans les transfectants transitoires, un plasmide contrôle contenant un gène codant une luciférase de Renilla sous le contrôle d'un promoteur CMV a été co-transfecté. L'activité de la luciférase de luciole a été normalisée par rapport à l'activité de la luciférase de Renilla (moyenne $\pm$ SD pour 3 réplicats représentatifs de 3 expériences indépendantes).

2.2 La répression de l'expression de MITF-M n'est pas induite par BRN-2

Afin de vérifier les résultats obtenus avec le promoteur de *MITF-M*, nous avons analysé l'expression de *BRN-2*, un répresseur transcriptionnel connu de *MITF-M*, dans des cellules de mélanome traitées ou non avec de l'IL-1 β . Nous avons étudié son expression par RT-PCRq (Reverse Transcription ou Transcription inverse, suivie d'une PCR quantitative) dans les cellules LB2259-MEL et CP50-MEL, deux lignées dans lesquelles la répression de la transcription semble avoir une importance significative (Figure supplémentaire 1, Article 2). Dans les deux lignées, alors que l'IL-1 β induit une répression de *MITF-M* déjà après 4h, il faut attendre 24h pour observer une surexpression de *BRN-2* qui n'est statistiquement significative que dans la lignée LB2259-MEL (Figure 2). Ceci peut être expliqué par le fait qu'il existe une boucle de régulation négative entre BRN-2 et MITF-M. En effet, la diminution d'expression de MITF-M ne lui permettrait plus d'induire l'expression de miR-211, lui-même capable de réprimer l'expression de BRN-2. La surexpression de *BRN-2* après 24h serait donc une conséquence de la diminution d'expression de MITF-M plutôt que la cause de celle-ci.

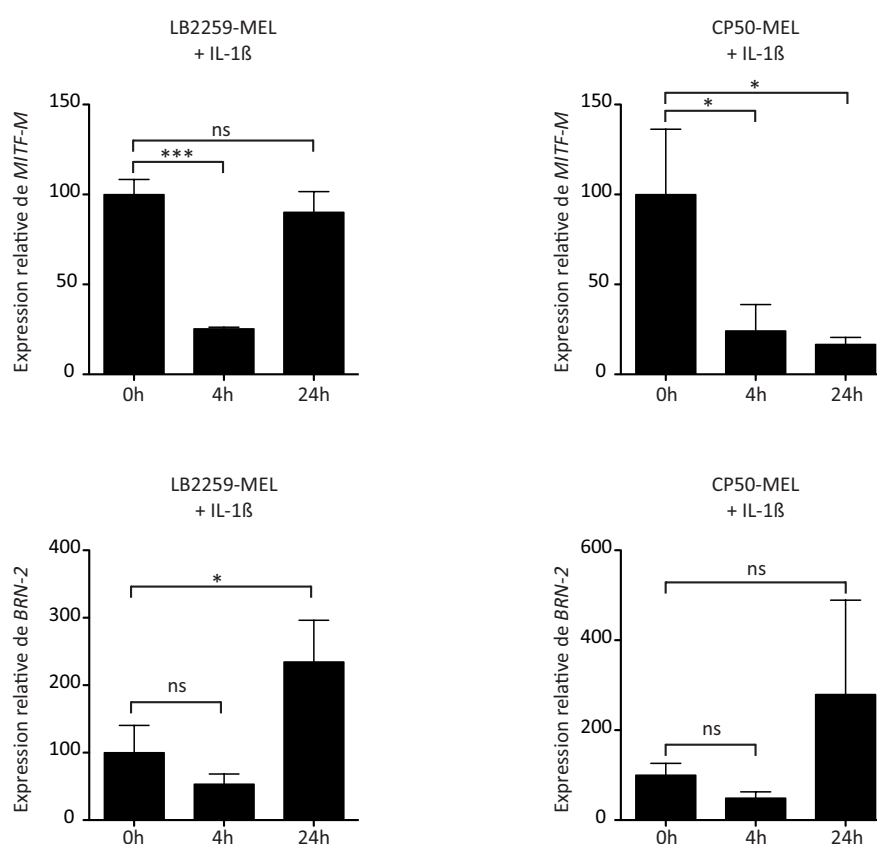


Figure 2 : L'expression de *MITF-M* et *BRN-2* a été analysée par RT-PCRq dans les lignées LB2259-MEL et CP50-MEL traitées avec de l'IL-1 β (10 ng/ml) pendant 4h ou 24h. Les résultats ont été normalisés par l'expression en β -actine (moyenne $\pm$ SD pour 3 expériences indépendantes).

2.3 La répression de l'expression de *MITF-M* par l'IL-1 β implique une séquence présente soit dans la région 5' non traduite, le cadre ouvert de lecture ou la région 3' non traduite de l'ARNm de *MITF-M*

Le promoteur classique de *MITF-M* ne semble donc pas impliqué dans la répression de l'expression de celui-ci en présence d'IL-1 β . Nous nous sommes alors intéressés à la possibilité que les séquences responsables de la répression de l'expression de *MITF-M* en présence d'IL-1 β se situent sur le 5'UTR, la région codante ou le 3'UTR de l'ARNm de celui-ci. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé une construction contenant l'ADNc (ADN complémentaire) de *MITF-M* humain, comprenant ces 3 régions, en aval du promoteur LTR du virus de Moloney. Ce promoteur a été utilisé car il est insensible à l'IL-1 β . Cette construction a ensuite été transfectée stablement dans des cellules de mélanome murin B16 F1.

Après 4h d'incubation avec de l'IL-1 β , une répression de l'expression de *MITF-M* murin et humain a pu être observée (Figure 3). Ceci confirme qu'une séquence contenue dans l'ADNc de *MITF-M* serait ciblée par un facteur inhibiteur dont l'expression est induite par l'IL-1 β .

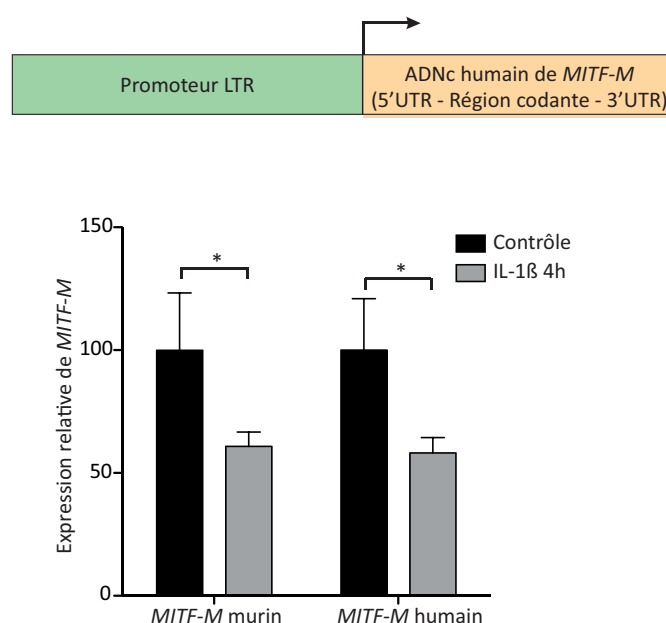


Figure 3 : Des cellules de mélanome murin B16 F1 ont été transfectées stablement avec un plasmide contenant l'ADNc de *MITF-M* humain en aval d'un promoteur LTR et incubées 4h en présence d'IL-1 β (10 ng/ml). L'expression de *MITF-M* murin et humain a été analysée par RT-PCRq et les résultats ont été normalisés par rapport à l'expression en β -actine (moyenne $\pm$ SD pour 3 expériences indépendantes).

L'étape suivante était d'identifier laquelle de ces 3 régions était impliquée dans la répression de l'expression de MITF-M. Nous nous sommes intéressés au 3'UTR étant donné que, dans le gène *MITF*, cette région possède une taille importante de 3 kb par rapport au 5'UTR dont la taille est de 0,2 kb et à la région codante qui représente 1,5 kb. De plus, il est connu que cette région non traduite des ARNm est fréquemment ciblée par des miRNAs, induisant une diminution d'expression de la protéine correspondante. Nous avons alors décidé d'étudier la possibilité que l'IL-1 β induise l'expression de miRNAs ciblant *MITF-M*. Cette hypothèse a été investiguée plus en profondeur au cours du 2^{ème} article.

J'ai réalisé toutes les expériences présentées dans cet article, exception faite des récoltes de tissus tumoraux murins qui ont été réalisées par Stefania Cané.

3. Article 2: microRNA-155, induced by Interleukin-1 β , represses the expression of Microphthalmia-associated transcription factor (MITF-M) in melanoma cells

Arts Nathalie¹, Cané Stefania¹, Bommer Guido², Van den Eynde Benoît¹, De Plaen Etienne¹

Affiliations : ¹Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels and Université Catholique de Louvain, 74 avenue Hippocrate, B-1200 Brussels, Belgium. ²de Duve Institute, Université Catholique de Louvain, 74 avenue Hippocrate, B-1200 Brussels, Belgium.

Correspondence to : Prof. Etienne De Plaen, Ludwig Institute for Cancer Research, 74 avenue Hippocrate-UCL7459, B-1200 Brussels, Belgium. Tel : +322 764 74 79. Fax : +322 762 94 05.
Email : Etienne.Deplaen@bru.licr.org

ABSTRACT

Loss of expression of surface antigens represents a significant problem for cancer immunotherapy. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF-M) regulates melanocyte fate by driving expression of many differentiation genes, whose protein products can be recognized by cytolytic T lymphocytes. We previously reported that interleukin-1 β (IL-1 β) can downregulate MITF-M levels. Here we show that downregulation of MITF-M expression by IL-1 β was paralleled by an upregulation of miR-155 expression in four melanoma lines. We confirmed that miR-155 was able to target endogenous *MITF-M* in melanoma cells and demonstrated a role for miR-155 in the IL-1 β -induced repression of MITF-M by using an antagomiR. Notably, we also observed a strong negative correlation between *MITF-M* and miR-155 levels in a mouse model of melanoma. Taken together, our results indicate that MITF-M downregulation by inflammatory stimuli might be partly due to miR-155 upregulation. This could represent a novel mechanism of melanoma immune escape in an inflammatory microenvironment.

Keywords : MITF, interleukin-1, microRNA-155, melanoma, inflammation, differentiation antigens

Running Title : miR-155 represses MITF-M in melanoma cells

INTRODUCTION

The *Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)* gene generates several transcripts and proteins through the use of different promoters and alternative splicing of the first exon (Shibahara et al., 2001). The isoform MITF-M is expressed exclusively in melanocytes and is a key transcription factor that regulates many genes involved in survival, proliferation and differentiation (Vance and Goding, 2004). In melanoma cells, MITF-M regulates the expression of differentiation genes like *TYR (tyrosinase)*, *MLANA (Melan-A/Mart-1)* or *SILV (pMel17/gp100)*. Their protein products are shared with normal melanocytes and can be recognized by specific cytolytic T lymphocytes (CTL) at the surface of the tumor cells (Brichard et al., 1993; Coulie et al., 1994; Zarour et al., 1996; Romero et al., 2002). At first sight, it might seem surprising that differentiation antigens would be considered as targets of immunotherapy. However, some data indicate that loss of the expression of Melan-A in a melanoma metastasis favors the escape of this tumor from the immune response (Voelter et al., 2008).

Unfortunately, even when anti-tumor T lymphocytes are present, the majority of metastatic melanomas are still progressing. Changes on the side of the CTLs and on the side of the tumor cells, as well as their crosstalk contribute to this observation (reviewed in (Boon et al., 2006)).

On the CTL side, immunosuppressive cells such as activated regulatory T cells (Tregs) in the tumor microenvironment can lead to anergy (Gallimore and Godkin, 2008). In addition, many tumors produce enzymes that degrade tryptophan, thereby depriving the T lymphocytes of an essential amino acid (Uyttenhove et al., 2003; Pilotte et al., 2012). On the tumor site, expression of the tumor antigen can be compromised at several levels that include mutations in the gene encoding the antigenic peptide, loss of the expression of an *HLA* allele or a mutation in the gene encoding β -2 microglobulin (Boon et al., 2006). Last but not least, melanoma cells might lose expression of the protein from which the CTL-targets are derived. From a therapeutic standpoint, it is therefore of considerable interest to understand how the expression of potential CTL-targets is regulated. Understanding these mechanisms might potentially allow a therapeutic intervention that will lead to increased expression of CTL-targets. In the present study, we will focus our attention on the regulation of *MITF-M* and its target genes by the inflammatory microenvironment.

Cytokines play a crucial role in the immune response and modulate several pathways (Landskron et al., 2014). In the tumor microenvironment, they have a significant influence on the progression of the tumor and the anti-tumor immune response (Landskron et al., 2014). It has

been shown that IFN- γ represses the expression of Melan-A, TRP-1 and gp100 in melanoma cells and that this repression reduced recognition of these cells by specific anti-Melan-A CTL (Le Poole et al., 2002). IFN- γ can be produced by activated T lymphocytes or natural killer cells in the tumor stroma (Schwartzentruber et al., 1991). In addition, other cytokines like TNF- α , secreted by activated T lymphocytes or macrophages, can be induced at the tumor site. TNF- α was reported to inhibit the expression of tyrosinase in B16 melanoma cells (Englaro et al., 1999). Moreover, the study of adoptive cell transfer therapies (ACT) with specific anti-gp100 CTLs in mice showed that some melanoma cells became resistant to the lysis induced by these CTLs thanks to a repression in the expression of gp100 (Landsberg et al., 2012). This inhibition was induced by the presence of TNF- α in an inflammatory environment (Landsberg et al., 2012). Another inflammatory cytokine, IL-1, was shown to be produced by melanoma cells themselves but its effect on melanogenesis is still not well understood (Schwartzentruber et al., 1991; Bennicelli et al., 1989; Elaraj et al., 2006).

For this reason, we had previously investigated the effect of IL-1 β on melanoma cell lines. Several melanoma cell lines showed a reduced expression of MITF-M when they were incubated with IL-1 β (Kholmanskikh et al., 2010). This repression was associated with a downregulation in the expression of differentiation antigens and led to a decreased recognition of melanoma cells by CTLs directed against those antigens, suggesting that this could represent a novel mechanism of tumor immune escape. We also discovered that this repression was NF- κ B and JNK-dependent but we were not able to identify further mechanistic links between IL-1 β and the reduction of the expression of MITF-M.

The characterization of the mechanistic link between IL-1 β and MITF-M downregulation is the topic of the present study.

RESULTS

IL-1 β concomitantly upregulates miR-155 and downregulates MITF-M in melanoma cell lines

When analyzing the expression of *MITF-M* in two melanoma cell lines, LB2201-MEL and LB2259-MEL, we observed a significant downregulation of the expression of *MITF-M* mRNA after incubation with IL-1 β for 4h and 24h, consistent with a previous study from our laboratory (Fig.1A) (Kholmanskikh et al., 2020). This could be due either to reduced production (e.g. via repression of *MITF-M* transcription) or to destabilization of the *MITF-M* mRNA.

We first investigated the possibility that IL-1 β induces the expression of miRNAs targeting and destabilizing *MITF-M* transcripts. Several miRNAs have been described to target *MITF*. miR-137, miR-148 and miR-340 were shown to repress MITF-M expression in melanoma cells (Bemis et al., 2008; Hafliadottir et al., 2010; Goswami et al., 2010). Additionally, *MITF* was identified as a target for miR-96 and miR-182 in the mouse retinal pigmented epithelium (Xu et al., 2007). Finally, upregulation of miR-155 in monocytes was shown to play a role in repressing MITF expression, thereby favoring the acquisition of a macrophage rather than osteoclast fate (Mann et al., 2010). Moreover, IL-1 β and other inflammatory signals can increase miR-155 levels via an AP-1 element in its promoter (Yin et al., 2008).

In melanoma cell lines LB2201-MEL and LB2259-MEL we observed an upregulation of miR-155 upon treatment with IL-1 β . At 4h this increase reached 2.7-fold and 3.6-fold, and at 24h it reached 8.0-fold and 4.2-fold in LB2201-MEL and LB2259-MEL, respectively (Fig.1B). In contrast, we did not observe any significant upregulation of the other five miRNAs that have been described to target *MITF* (i.e. miR-137, miR-148, miR-340, miR-96 and miR-182).

Figure 1

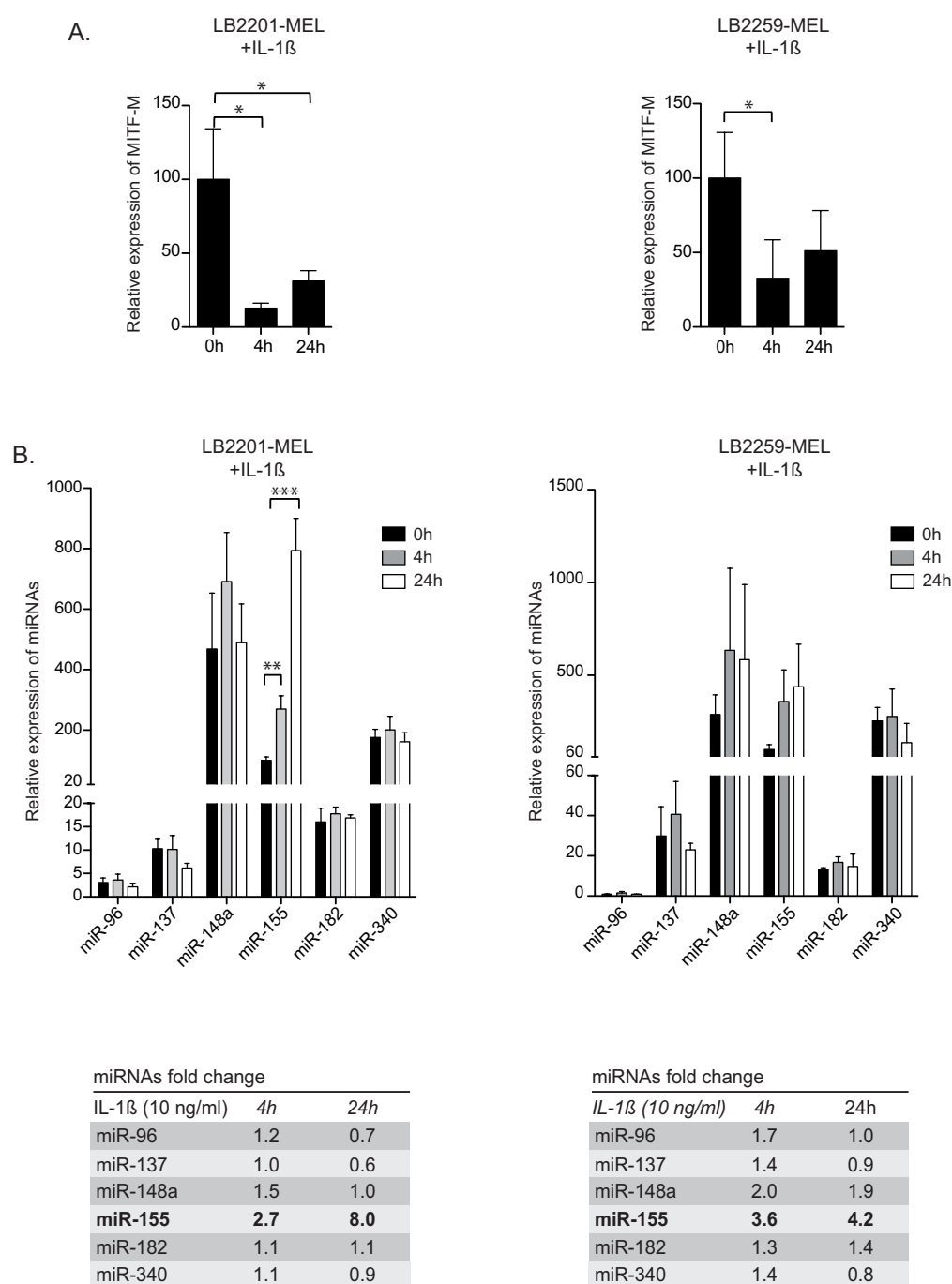


Figure 1 : IL-1 β downregulates the expression of MITF-M and upregulates the expression of miR-155 in 2 melanoma cell lines

(A) Expression of MITF-M was analysed by quantitative RT-PCR in melanoma cell lines LB2201-MEL and LB2259-MEL incubated with IL-1 β (10 ng/ml) for 4h or 24h. The result was normalized to β -actin expression (means $\pm$ SD for 3 or 4 independent experiments, respectively)

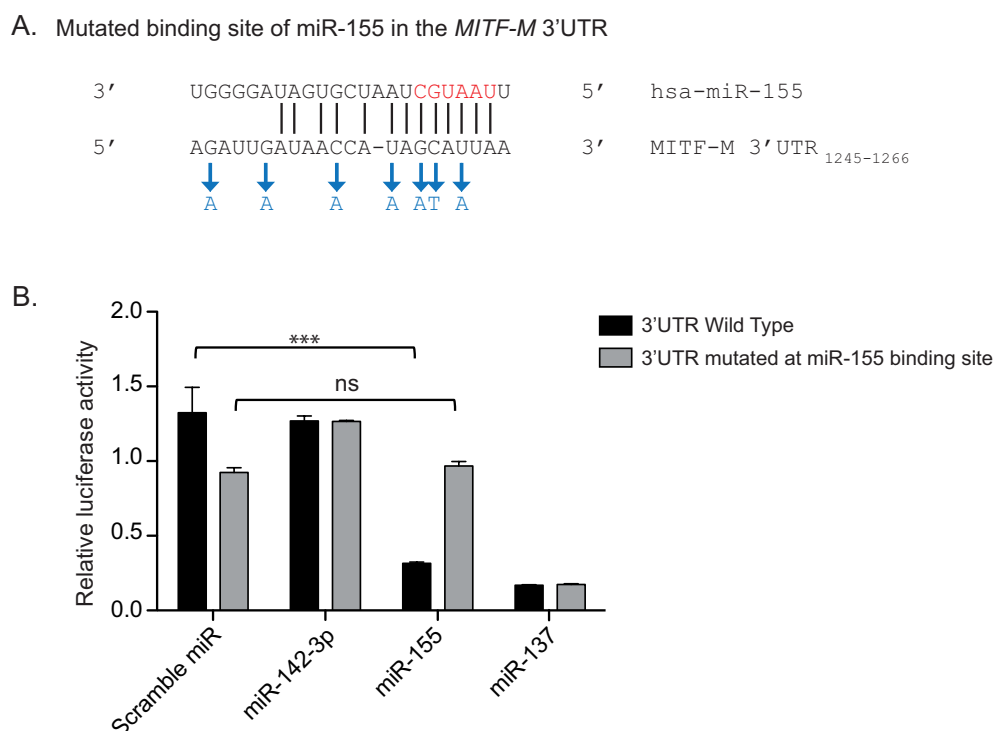
(B) Expression of miRNAs potentially targeting MITF-M (miR-96, miR-137, miR-148a, miR-155, miR-182 and miR-340) was analysed by quantitative RT-PCR in the same samples and normalized to RNU44 expression. The table indicates the miRNA fold change when cells were treated with IL-1 β for 4h or 24h.

miR-155 targets MITF-M in melanoma cells and reduces the expression of MITF-M target genes

We next wanted to verify if miR-155 was able to target the *MITF-M* isoform in melanoma cells. To this end, we cloned the 3 kb 3'UTR of *MITF-M* downstream of an open reading frame coding for Renilla luciferase. Bioinformatics predictions with the miRanda software suggested a single binding site for miR-155 in the 3'UTR of *MITF* (Fig.2A). When we co-transfected the plasmid containing the wild type 3'UTR with a miR-155 mimic in HEK-293T cells, we observed a 4-fold repression of the luciferase activity compared to a control condition with a scramble mimic or an unrelated miRNA (miR-142-3p). miR-137 was used as a positive control (Fig.2B). In order to determine if miR-155 directly targets the *MITF-M* mRNA, we mutated 7 nucleotides in the predicted miRNA binding site within the 3'UTR (Fig.2A). As expected, miR-155 was not able to decrease the Renilla luciferase activity when we transfected the mutated 3'UTR (Fig.2B). Notably, the positive control miR-137 was still able to reduce the Renilla luciferase activity produced from the mutated 3'UTR, suggesting that the introduced mutations do not interfere with the function of other miRNAs that target binding sites elsewhere in the 3'UTR.

Taken together, our results confirm that the original sequence corresponding to the mutated nucleotides is required for miR-155 binding, and that only this single site in the *MITF* 3'UTR is targeted by miR-155.

Figure 2

**Figure 2 : miR-155 targets *MITF-M* 3'UTR in HEK-293T cells**

(A) Region of the *MITF-M* 3'UTR where miR-155 is predicted to bind (subscript numbers indicate the position relative to the first nucleotide after the STOP codon). Seed region of the miRNA sequence is in red. Optimal alignment between *MITF-M* 3'UTR and miR-155 was predicted by the miRanda software. Blue letters indicate nucleotides in the *MITF-M* 3'UTR that were substituted by targeted mutagenesis.

(B) HEK-293 T cells were co-transfected with the reporter plasmid psiCHECK-2 containing the 3'UTR of *MITF-M* wild type (black) or mutated for 7 nucleotides (grey) and the indicated miRNAs mimics (10 nM). The reporter plasmid contains the 3'UTR cloned downstream of the Renilla luciferase gene and the Firefly luciferase gene to take into account the transfection efficiency. Data presented are the normalized ratios of Renilla to Firefly activities (means of triplicates $\pm$ SD) and are representative of 3 independent experiments. miR-137 is known to target *MITF-M* 3'UTR (Bemis et al., 2008) whereas miR-142-3p is an irrelevant miRNA targeting *GARP* (Gauthy et al., 2013).

Then, to test whether miR-155 was able to target endogenous *MITF-M* transcripts, we transfected a miR-155 mimic in the melanoma cell line LB2201-MEL. We then evaluated the expression of *MITF-M* and its target gene *tyrosinase* at the mRNA and protein levels. On RNA level, we observed a decrease in the abundance of *MITF-M* mRNA after 24h and 48h (Fig.3A) followed by a decrease of *tyrosinase* mRNA (Fig.3B). This repression of MITF-M and tyrosinase expression was even stronger at the protein level, in particular at 48h when both proteins were almost undetectable (Fig.3C).

Altogether, our results confirm that miR-155 is able to target a single binding site on the 3'UTR of *MITF-M*, which leads to a strong reduction of the abundance of MITF-M and tyrosinase proteins.

Figure 3

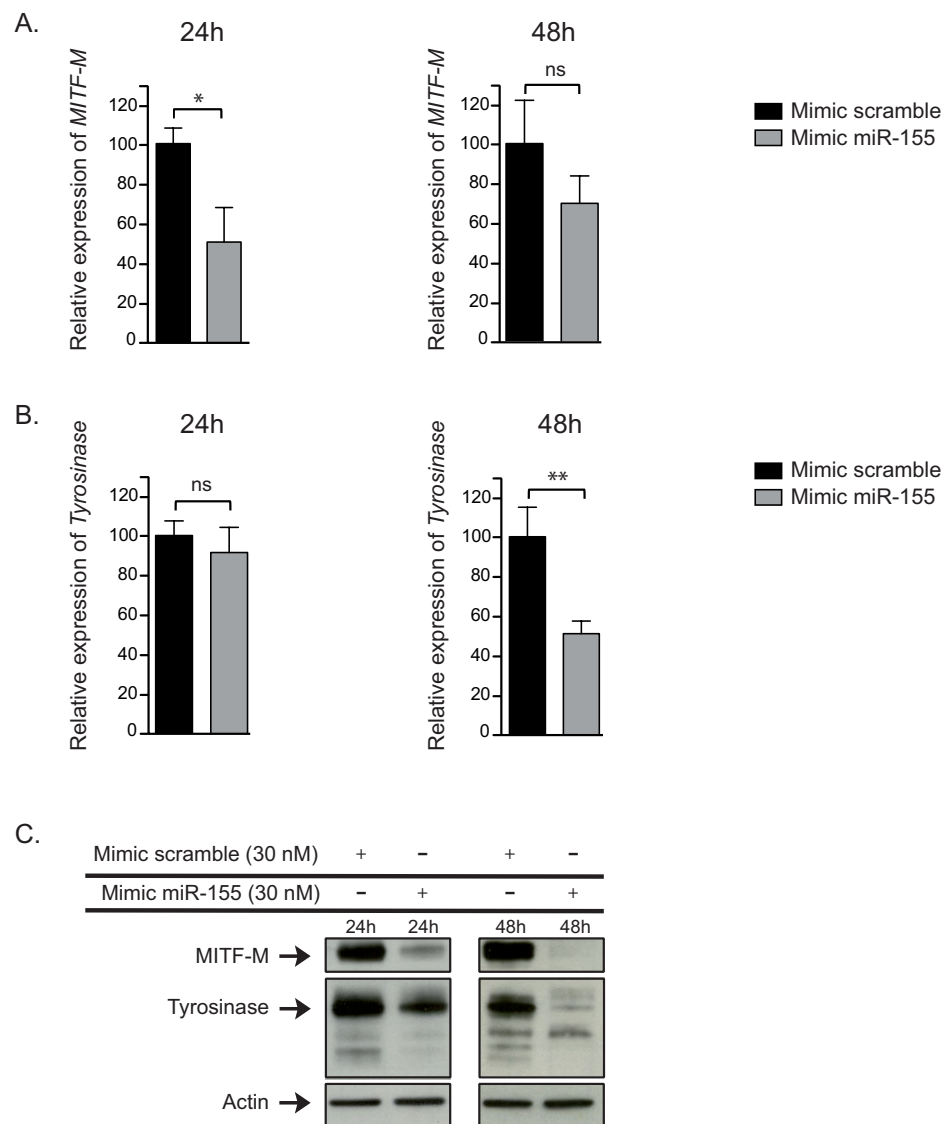


Figure 3 : miR-155 downregulates MITF-M in LB2201-MEL melanoma cell line

(A) *MITF-M* and (B) *Tyrosinase* expression was analysed by quantitative RT-PCR in melanoma cell line LB2201-MEL 24h and 48h after the transfection with a mimic of miR-155 (30 nM). β -actin expression was used to normalize *MITF-M* and *Tyrosinase* expression (means $\pm$ SD for 3 independent experiments).

(C) *MITF-M* and *Tyrosinase* protein expression was analysed by Western Blot in the same cell line 24h and 48h after the transfection with the mimic of miR-155 (30 nM) (1 of 3 independent experiments).

Endogenous miR-155 contributes to the repression of MITF-M in the presence of IL-1 β

To confirm that endogenous miR-155 contributes to the repression of MITF-M expression by IL-1 β , we used antisense inhibitors specific for miR-155. First, we transfected LB2201-MEL cells with either an inhibitor of miR-155 (AntagomiR anti-miR-155) or a control inhibitor. After 24h, we treated the cells with IL-1 β and analyzed the abundance of MITF-M protein 2h, 3h, 4h or 5h later by Western Blot. The repression of MITF-M expression induced by IL-1 β appeared to be delayed in the presence of the anti-miR-155, with the strongest effect after 2h of treatment with IL-1 β (Fig.4). This indicates that endogenous miR-155 contributes to the IL-1 β -induced downregulation of MITF-M. However, the lack of effect of anti-miR-155 at later time points suggests that the inhibitor might not be sufficiently effective at high miR-155 levels observed at later time points. Alternatively, there might be other mechanisms that are more important for IL-1 β -induced downregulation of MITF-M at later time points.

Figure 4

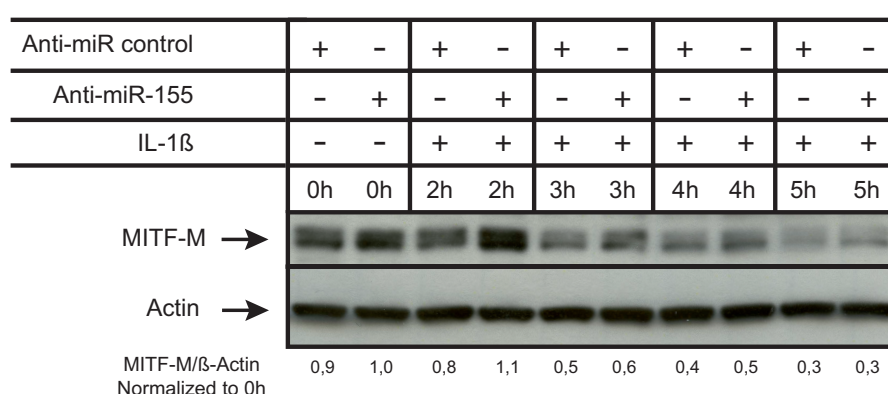


Figure 4 : *The repression of MITF-M by IL-1 β can be prevented at an early time point by the transfection of an AntagomiR specific to miR-155*

LB2201-MEL cells were transfected and incubated for 24h with an AntagomiR specific for miR-155 or a control AntagomiR (150 nM) and then treated with IL-1 β (10 ng/ml) for 2h, 3h, 4h or 5h.

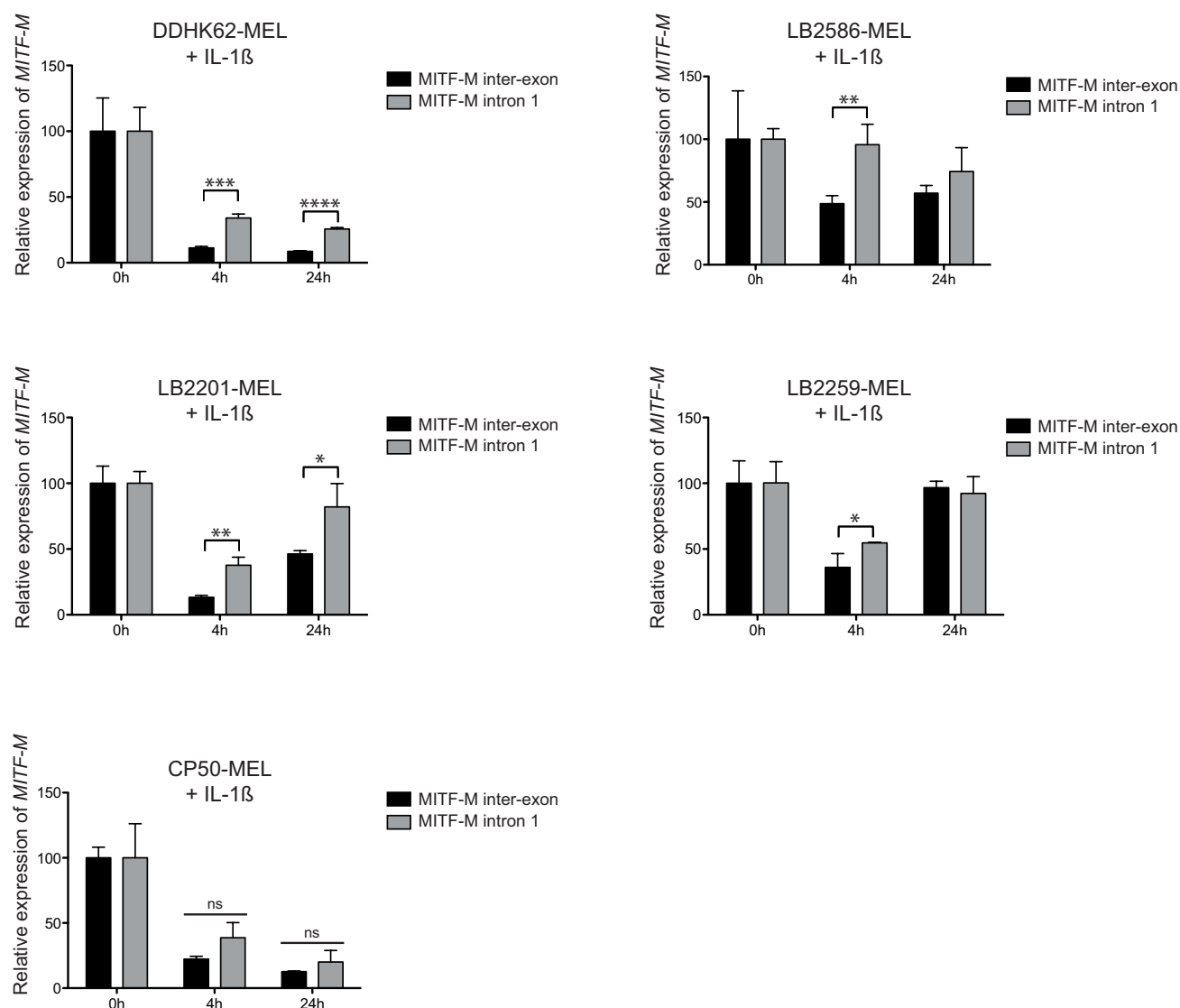
This experiment is representative of 3 independent experiments.

Downregulation of MITF-M by IL-1 β is the result of the action of miR-155 and of a reduction in MITF-M transcription.

To address the question whether other mechanisms contribute to the downregulation of MITF-M by IL-1 β , we chose a qPCR approach. To distinguish the effect of IL-1 β on mRNA transcription from an effect on mRNA stability, we performed quantitative PCR for the unspliced precursor transcript of *MITF-M* as well as for the mRNA transcript.

In the cell lines that show upregulation of miR-155 by IL-1 β , our results suggest that both reduced mRNA transcription and mRNA destabilization occur (Supplementary Fig.1). We also analyzed one cell line that shows no increase in miR-155 upon treatment, CP50-MEL (Fig.5). As expected, in this cell line only an effect on transcription was observed. Unfortunately, we were not able to delineate the cis-element that mediates IL-1 β induced-repression of *MITF-M* transcription in reporter assays (data not shown). This suggests that this effect is mediated by an element outside of the core promoter.

Supplementary Figure 1



Supplementary figure 1 : Repression of the transcription versus destabilization of MITF-M in melanoma cell lines incubated with IL-1 β

Melanoma cell lines were incubated with IL-1 β for 4h or 24h and the expression of MITF-M was analyzed by quantitative RT-PCR with 2 different pairs of primers.

The “inter-exon” primers located in the first and second exon of MITF-M allowed us to evaluate the total content of mature MITF-M mRNA that could be reduced either by the repression of the transcription or by the destabilization of the transcript. The “intron 1” primers were located in the first intron of MITF-M and detected the unspliced mRNA before destabilization by miRNAs, allowing us to evaluate only the repression of the transcription. We performed quantitative RT-PCR with those 2 pairs of primers in 5 cell lines sensitive to IL-1 β and observed that all of them except CP50-MEL showed a stronger repression of MITF-M expression with the “inter-exon” primers than with the “intron 1” primers. Because a repression of MITF-M expression was observed already with the “intron 1” primers, this suggest that the mRNA abundance is reduced both by a repression of the transcription and by a destabilization of the transcripts. Moreover, destabilization of the transcripts

by miR-155 could be detected by the “inter-exon” primers but because of the miRNA mechanism of action, it should be more effective at the protein level.

Since CP50-MEL shows the same level of repression of *MITF-M* expression with the two pairs of primers, the repression of MITF-M on this cell line seems to occur only by a repression of the transcription of *MITF-M*.

In both quantitative RT-PCR, the expression of *MITF-M* was normalized to β -actin (means $\pm$ SD for 3 independent experiments) and then to the expression of *MITF-M* in each control condition (100% at t=0).

To get an impression of the relative contribution of miR-155 and transcriptional repression, we next wanted to broaden our experiments by analyzing more melanoma cell lines after treatment with IL-1 β for 4h or 24h. As expected, the cell line SK23-MEL that lacks the receptor for IL-1 β (Kholmanskikh et al., 2010), did not show any changes in miR-155, MITF-M and tyrosinase expression (Fig.5). Similarly, cell lines EB81-MEL and LB2117-MEL did not exhibit any repression of MITF-M or tyrosinase nor any upregulation of miR-155 expression. However, in the cell lines DDHK62-MEL, LB2586-MEL, LB2201-MEL and LB2259-MEL, downregulation of MITF-M and tyrosinase (at the mRNA and protein levels) and upregulation of miR-155 were clearly observed after treatment with IL-1 β for 4h and 24h (Fig.5). The increase in miR-155 reached between 1.4- and 2.8-fold after 4h, and between 1.8 and 8.0-fold after 24h of treatment (Fig.5).

Figure 5

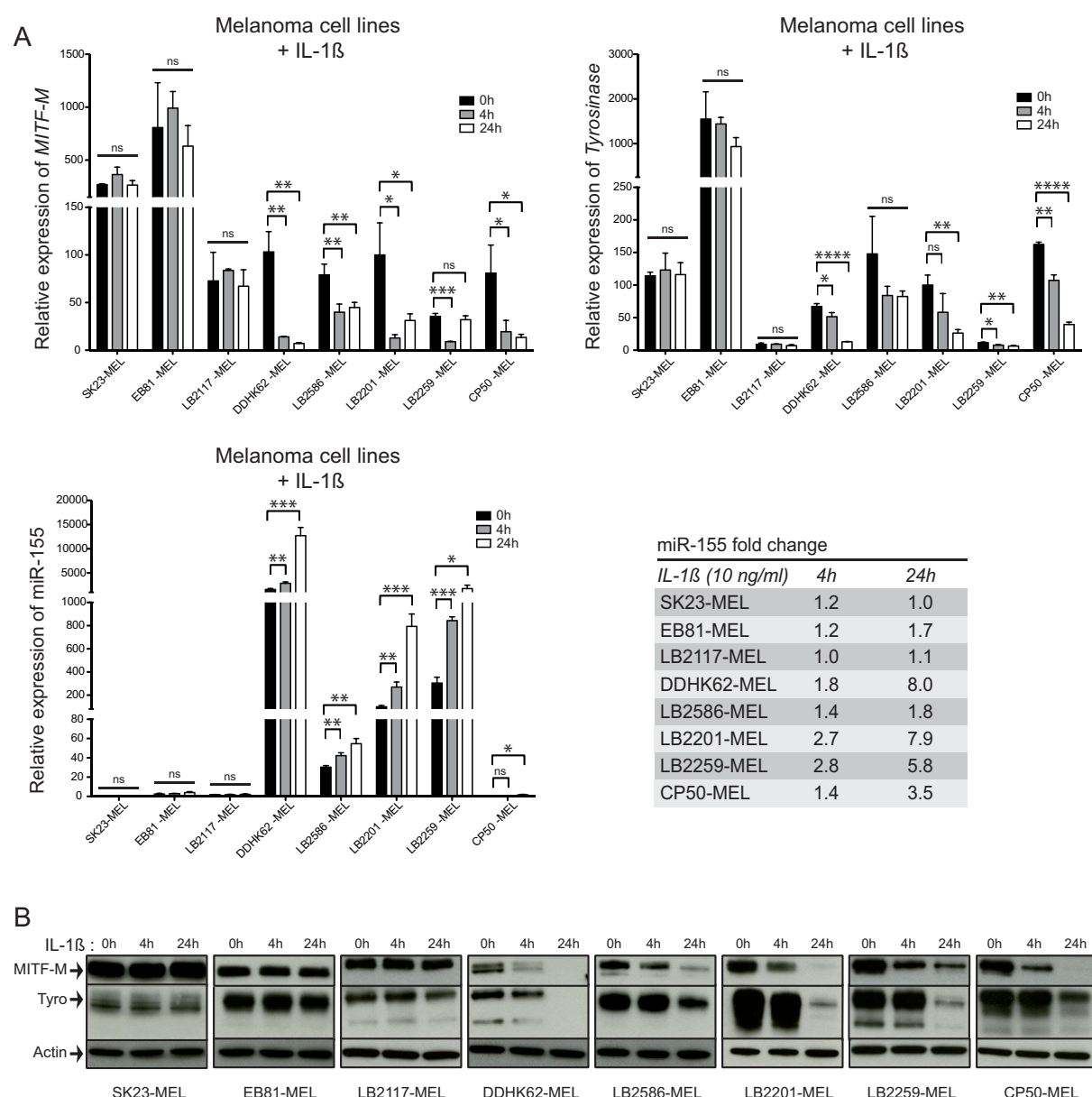


Figure 5 : Inverse correlation between the expression of *MITF-M* and that of *miR-155* in melanoma cell lines incubated with *IL-1 β*

(A) The expression of *MITF-M*, *Tyrosinase* and *miR-155* was analysed by quantitative RT-PCR in 8 melanoma cell lines incubated with *IL-1 β* (10 ng/ml) for 4h or 24h. The results were normalized to β -actin expression for *MITF-M* and *Tyrosinase* and to *RNU44* for *miR-155* (means $\pm$ SD for 3 independent experiments).

(B) The expression of *MITF-M* and *Tyrosinase* proteins was analysed by Western Blot in the same samples (1 of 3 independent experiments).

Expression levels of MITF-M and miR-155 are inversely correlated in a mouse model of inducible melanoma

Immune evasion of melanoma cells represents an obstacle to the function of CTL and to the clinical efficiency of cancer immunotherapy. To test whether miR-155 might contribute to the downregulation of MITF-M and melanocyte differentiation antigens in melanoma *in vivo*, we analyzed samples from a mouse model of malignant melanoma. We chose to utilize the Tirp transgenic mouse model, which has been previously developed in our laboratory (Huijbers et al., 2006). In this inducible model of melanoma, loss of the tumor suppressor INK4A/ARF and the concomitant expression of the H-RAS (G12V) oncogene and of the natural “cancer-germline gene” P1A, occur specifically in melanocytes (Huijbers et al., 2006).

We collected 24 tumor samples from 23 mice and analyzed the expression of *MITF-M*, *tyrosinase*, *IL-1 β* and miR-155 by quantitative RT-PCR using RNA extracted from total tumor tissue. We found that 4 out of 23 samples expressed *MITF-M* and *tyrosinase*, did not express *IL-1 β* and expressed weakly miR-155 (Fig.6). On the other hand, 19 out of 23 melanoma samples did not express *MITF-M* and *tyrosinase* or expressed low levels of *MITF-M* but had high levels of expression of miR-155. All these 19 tumor samples showed expression of *IL-1 β* to varying degree, suggesting that this cytokine could contribute to the upregulation of miR-155. We should note, however, that other inflammatory cytokines share the downstream signaling cascade with IL-1 β and might very well contribute to the expression of miR-155 in these samples (Fig.6).

Taken together, our results suggest that the inverse correlation between the expression levels of miR-155 on the one side, and *MITF-M* and *tyrosinase* on the other side is also observed *in vivo*.

Figure 6

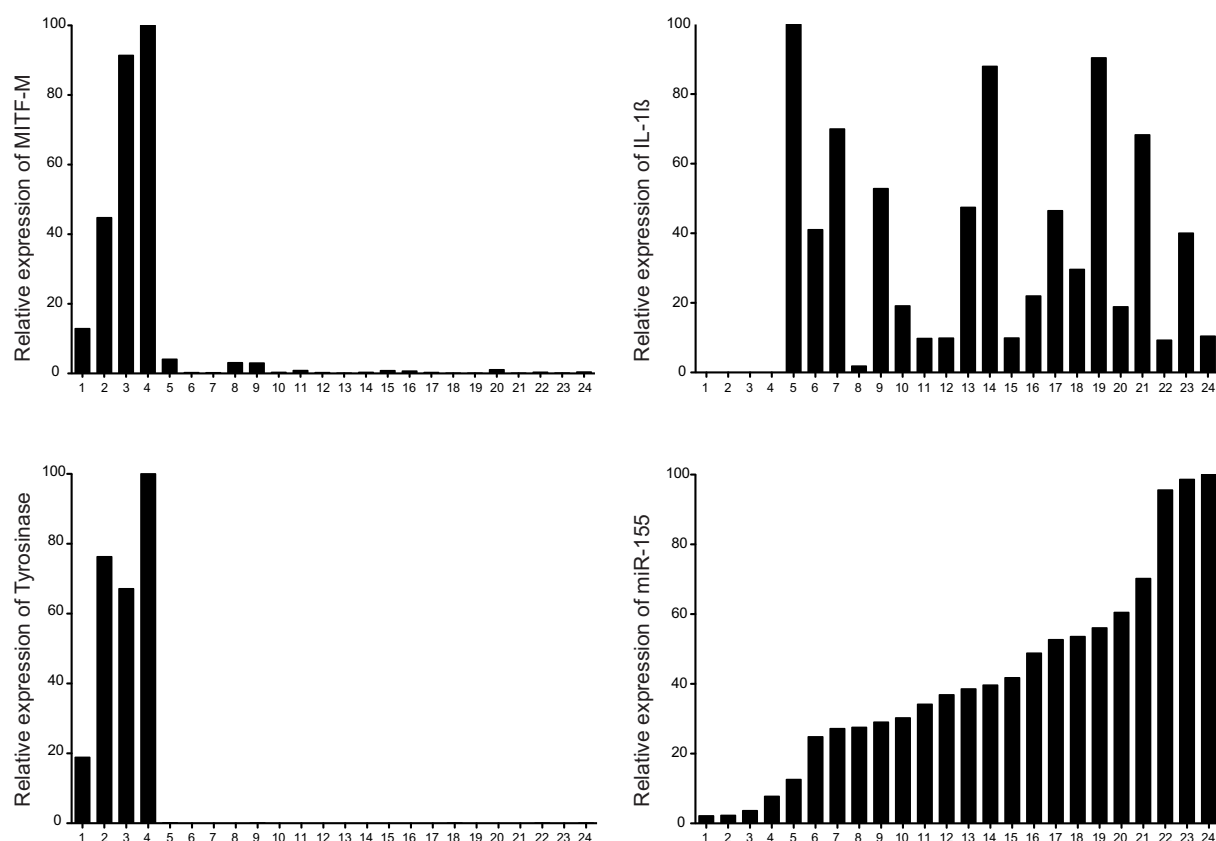


Figure 6 : In mouse melanoma samples, there is an anti-correlation between the expression of MITF-M or Tyrosinase and that of IL-1 β or miR-155

24 tumor samples were collected from 23 Tirp10B mice (Huijbers et al., 2006) and the expression of MITF-M, Tyrosinase, IL-1 β and miR-155 was analysed by quantitative RT-PCR. β -actin was used as an internal control for MITF-M, Tyrosinase and IL-1 β whereas U6 was used as an internal control for miR-155.

DISCUSSION

The objective of this study is to understand the molecular mechanisms by which IL-1 β regulates MITF-M in melanoma. We show here that miR-155 is upregulated following the treatment with IL-1 β in several melanoma cell lines and can reduce the expression of MITF-M both at the mRNA and – even more efficiently – at the protein level. This effect can be partially prevented by anti-sense miR-155 inhibitor, suggesting that endogenous miR-155 takes part in the regulation of *MITF-M*.

The majority of the cell lines were sensitive to IL-1 β . However, not all cell lines where IL-1 β leads to reduced MITF-M expression, show an increase in miR-155. Furthermore, qPCR experiments assessing unspliced precursor RNAs and mRNAs suggest that MITF-M levels are regulated by both destabilization of the mRNA, as well at the level of transcription (Supplementary Fig.1).

Surprisingly, in luciferase reporter assays using 4.5 kb and 15 kb promoter fragments encompassing the *MITF-M* transcriptional start site, we were not able to observe any effect of IL-1 β (data not shown). The larger construct comprises an upstream region that was shown to mediate a response to SOX10 (Watanabe et al., 2002). In further experiments we tested the enhancer activity of several genomic regions that show binding to several transcription factors in the chromatin immunoprecipitation datasets of the ENCODE consortium. The first region corresponding to the end of intron 3, exon 4 and the beginning of intron 4 included some sequences that could be targeted by the transcription factors c-Jun and JunD (chr3 69987713-69989931 ref:AC_000135.1). The second region, located 30 kb after the end of the *MITF-M* 3'UTR, could be targeted by 27 transcription factors, including some repressors (E2F6, ZBTB7A, HEY1, ...) (chr3 70046346-70051387 ref:AC_000135.1). However, luciferase assays with these 2 promising sequences cloned downstream of a luciferase reporter and a 2.2 kb *MITF-M* promoter did not allow us to confirm their involvement in the regulation of *MITF-M* transcription (data not shown).

It therefore seems likely that the repression of *MITF-M* transcription occurs via another unidentified regulatory region, via regulation of chromatin composition that is inadequately represented in reporter assays or with a more complex mechanism involving the cooperative binding of several transcription factors.

To understand the contribution of miR-155 to MITF-M expression and potentially to the expression of CTL target antigens, we employed a mouse model of melanoma referred as Tirp (Huijbers et al., 2006). We observed a strong negative correlation between *MITF-M* and

tyrosinase on the one side, and miR-155 and *IL-1 β* on the other side. The tumors induced in those mice are known to present 2 different phenotypes : some are nonpigmented, able to grow fast and kill the mice within one month (they were named “Amela”); others are pigmented, less aggressive and lethal for the mice within three months (designed as “Mela”) (Soudja et al., 2010). Analysis of these tumors revealed that Amela tumor progression is linked to inflammation, splenomegaly and myeloproliferative disorders. Indeed, inflammatory cytokines like IL-6 and other chemokines like IL-8 are upregulated in the supernatant of Amela compared to Mela tumor cells (Soudja et al., 2010). Moreover, it has also been shown that the expression of IL-1 β (and small quantities of TNF- α and IL-1 α) was induced in the sera of mice bearing Amela tumors. Our results are in agreement with this study. Indeed, the presence of melanin, responsible for the Mela pigmented phenotype, is mainly determined by MITF-M, which upregulates the genes responsible for the melanogenesis, including tyrosinase. This phenotype is not associated with an inflammatory environment, contrary to the Amela nonpigmented tumors. Therefore, it could be interesting to inhibit the expression of miR-155 in Amela tumors (by the use of an Antagomir for example) to evaluate if we could reduce their aggressiveness by redirecting them to a Mela phenotype. Indeed, the reexpression of MITF-M in these tumors could have an influence not only on the production of melanin but also on the proliferation rate and the invasiveness of the tumor cells. Another option to investigate the influence of this miRNA in melanoma progression could be to use the inducible Cre system present in the Tirp model to delete the gene producing miR-155.

Here, we discovered a new mechanism of MITF-M repression in the context of an immune response against melanoma cells. However, we could imagine that the repression of *MITF-M* by miR-155 also occurs in melanocytes in a context of differentiation, for example. It was already described that miR-155 is involved in a differentiation process by targeting an isoform of *MITF* (Mann et al., 2010). Indeed, inflammatory signals detected by toll-like receptors in murine monocyte progenitors induce their differentiation into active macrophages while their stimulation with the receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) favors an osteoclast fate (Mann et al., 2010). The signaling pathway induced by RANKL, an osteoblast-derived factor, leads to the upregulation of MITF and PU.1, which are essential transcription factors for the differentiation into osteoclasts while the upregulation of miR-155, induced by inflammatory signals, favors the differentiation into macrophages by targeting *MITF* and repressing its expression (Mann et al., 2010). Moreover, it is known that the expression of MITF-M is precisely regulated during melanocyte differentiation

(Thomas and Erickson, 2008). Melanocytes are derived from a population of pluripotent neural crest cells and the expression of MITF-M in some of those cells is necessary to allow them to differentiate first into melanoblasts and then into melanocytes (Thomas and Erickson, 2008). Melanoblasts that migrate to the hair follicle can produce 2 different kinds of melanocytes : differentiated, melanin-producing melanocytes that express MITF-M and a second population that has lost the expression of MITF-M and was called "stem cell-like" melanocytes (Hoek and Goding, 2010). This second population is mostly quiescent but can be activated and used for melanocyte self-renewal at each hair regeneration cycle (Nishimura et al., 2010). It was shown that the presence of TGF- β in the melanoblast microenvironment represses the expression of MITF and favors melanoblast differentiation into a "stem cell-like" phenotype (Nishimura et al., 2010). This repression of MITF-M by TGF- β was also shown in melanoma cells and occurred through several mechanisms including a repression of the protein kinase A (Pierrat et al., 2012). However, TGF- β is also able to directly upregulate miR-155 expression, which can therefore represent another mechanism of MITF-M repression induced by this cytokine (Kong et al., 2008). Moreover, we can imagine that other cytokines that regulate MITF-M expression could also be present in the microenvironment and then influence the melanocyte differentiation process. It was shown that IL-1 α , IL-6 or TNF- α produced by human keratinocytes or melanocytes themselves could reduce the proliferation and the tyrosinase activity of melanocytes (Swope et al., 1991). We also observed a reduction of MITF-M and tyrosinase expression in human normal melanocytes treated with IL-1 β (data not shown). Therefore, for a better understanding of melanocyte differentiation, the expression of miR-155 and inflammatory cytokines including IL-1 β should be investigated during the differentiation of the melanoblasts to check whether they could influence the appearance of one particular phenotype.

Finally, the traditional genetic model of melanoma metastasis proposes that some cells within the primary tumor acquire irreversible pro-metastasis mutations and then migrate to form metastases genetically different from the initiating tumor cells (Hoek and Goding, 2010). However, an alternative model suggests that the activation of some pathways by the microenvironment rather than genetic mutations could explain the changes in the cell phenotype that promote metastasis from the primary tumor site (Hoek and Goding, 2010 ; Bell and Levy, 2011). Indeed, melanoma are known to be heterogeneous tumors and changes in the microenvironment like hypoxia or inflammation could favor the switch, in some tumor cells, from a proliferative phenotype where the cells express MITF-M to an invasive phenotype where they do not express MITF-M and acquire the potential to invade and form metastasis. Moreover,

once those cells have migrated to another site, they could switch back to a proliferative phenotype if the microenvironment is suitable (Hoek et al., 2008 ; Hoek and Goding, 2010 ; Bell and Levy, 2011 ; Cheli et al., 2011). This “phenotype switching” explains why the melanoma cells are so difficult to eradicate. Because treatments like chemotherapy target proliferative cells but spare cells exhibiting an invasive and slow growth phenotype, those cells could next reconstitute a heterogeneous population by switching back to a proliferative state.

Immunotherapy also targets MITF-positive differentiated cells expressing specific antigens. Therefore, to improve anti-melanoma therapy, resistant subpopulations should be redirected to a sensitive phenotype with a treatment that is efficient independently of the presence of mutations frequently found in melanoma cells (Saez-Ayala et al., 2013). The potential of this approach has been shown in the use of 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin (TMECG) in metastatic melanoma therapy. This prodrug is activated by tyrosinase, which leads to the inhibition of the dihydrofolate reductase (DHFR) essential enzyme. The activation of this prodrug being tyrosinase dependent, only the cells expressing this enzyme will be killed. However, the combination of TMECG with methotrexate (MTX), which is able to upregulate MITF-M and therefore tyrosinase expression in melanoma cells, leads to the death of the tumor cells regardless of the mutation status of BRAF, MEK or p53 (Saez-Ayala et al., 2013). Moreover, this kind of therapy is very advantageous because all the melanoma cells treated with MTX are forced to switch into a MITF-M and tyrosinase-positive phenotype and become sensitive to TMECG.

In conclusion, here for the first time we showed that miR-155 targets *MITF-M* in an inflammatory microenvironment. Inhibition of miR-155 or inhibition of the inflammatory pathways might represent an additional therapeutic approach to the conventional chemotherapy and immunotherapy for melanoma.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, tissue samples, media and reagents

Melanoma cell lines were established in our laboratory, except for SK23-MEL received from Dr E. Stockert (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York). They were grown in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Invitrogen Life technologies) complemented with 10% fetal bovine serum (HyClone), 0.55 mM L-arginine, 0.24 mM L-asparagine, 1.5 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 8% CO₂. Melanoma cells were treated with IL-1β at 10 ng/ml (PeproTech). Murine tissue samples were collected by excision and directly frozen at -80°C in optimal cutting temperature (OCT) compound. The same day, slides of 10 µm were made from those samples and 10 slides of each sample were used to extract total RNA.

Quantitative RT-PCR for mRNAs

RNA samples from cell lines and tissues were extracted with the TriPure Isolation Reagent (Roche) and the Nucleospin® RNA kit (Macherey-Nagel), respectively. Total RNA (including small RNAs such as miRNAs) was incubated with TURBO DNase (Turbo DNA-free™ kit, Ambion). 2 µg of total RNA was then used to synthesize cDNA with the RevertAid reverse transcriptase (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. Quantitative RT-PCR amplifications were done with the PCR core kit (Eurogentec) and with the use of 1/40 of the reaction volume from the reverse transcription in an ABI Prism 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems). The PCR primers (Eurogentec) used were : *human MITF-M sense* 5'-GGAATTATAGAAAGTAGAGGGA-3' and *human MITF-M antisense* 5'-ACATGGCAAGCTCAGGAC-3' ; *human tyrosinase sense* 5'-CCAGCATCATCTCTCTCTCTTG-3' and *human tyrosinase antisense* 5'-GTGGACTAGCAAATCCTTCCAG-3' ; *human β-actin sense* 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3' and *human β-actin antisense* 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3' ; *murine MITF-M sense* 5'-AGGAGGACTAAGTGGTCTGCG-3' and *murine MITF-M antisense* 5'-CCCTGGTTGCTGTAGAGGTGCG-3' ; *murine tyrosinase sense* 5'-CTAACTTACTCAGCCCAGCATC-3' and *murine tyrosinase antisense* 5'-GGGTTTTGGCTTTGTCATGG-3' ; *murine IL-1β sense* 5'-ACAGGCTCCGAGATGAACAA-3' and *murine IL-1β antisense* 5'-TTGCTTGGGATCCCACTCTC-3' ; *murine β-actin sense* 5'-CTCTGGCTCCTAGCACCATGAAG-3' and *murine β-actin antisense* 5'-GCTGGAAGGTGGACAGTGAG-3'. The 5'-FAM/3'-TAMRA specific labeled probes (Eurogentec) used were : *human MITF-M* 5'-CCACCTCGAAAACCCACCAAGTAC-3' ; *human tyrosinase* 5'-

CTGTTGTACTCCTCCAATCGGCTACAG-3' ; human β -actin 5'-TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC-3' ; murine *MITF-M* 5'-TCCGGCCTTGCAAATGGCAAATAC-3' ; murine tyrosinase 5'-CTCCTCCTGGCAGATCATTTGTAGCAGATCAGA-3' , murine *IL-1 β* 5'-CTGTCGGACCCATATGAGCTGAAAGCTCTC-3' , murine β -actin 5'-ATCGGTGGCTCCATCCTGGC-3'. Samples for quantitative PCR were assayed in duplicate and expression levels were normalized to β -actin.

Statistical analyses were performed using Student's t-test with a p-value of less than 0.05 (double-sided) considered as statistically significant (p-value < 0.05 was annotated * ; < 0.01 ** ; < 0.001 ***).

Quantitative RT-PCR for miRNAs

Specific miRNAs were reverse transcribed from 10 ng of total RNA and analyzed by PCR on the ABI 7300 Real Time PCR System using the corresponding TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems). Results were normalized to the expression of RNU44 in human samples and of U6 in murine samples (TaqMan MicroRNA Assays, Applied Biosystems). The assay IDs used were : hsa-miR96 (#000434), hsa-miR-137 (#001129), hsa-miR-148a (#000470), hsa-miR-155 (#002623), hsa-miR-182 (#002334), hsa-miR-340 (#002258), human RNU-44 (#001094), mmu-miR-155 (#002571), murine U6 (#001973).

Luciferase reporter assays

The 3kb 3'UTR of *MITF-M* was amplified by PCR from LB 2259-MEL cDNA and cloned downstream of the *Renilla* luciferase gene into the psiCHECK-2 plasmid (Promega). A mutation of 7 nucleotides in the putative binding site of miR-155 was introduced using the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). HEK-293T cells were then cotransfected with 0.65 μ g of the reporter plasmid and 10 nM of miRNAs mimics (Applied Biosystems) with Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) in a 12 well-plate. *Renilla* and Firefly luciferase activities were assessed 24 hours after the transfection using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega).

Western Blot

Total protein lysates from cell lines were obtained by homogenization of cells in lysis buffer [0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% sodium deoxycholate, 0.5% NP-40 in PBS] with a protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche). Proteins samples were subjected to electrophoresis on

NuPage® 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen Life technologies) using MOPS/SDS running buffer, with NuPage antioxidant added to the inner chamber, according to the manufacturer's protocol (XCell Sure Lock™). Proteins were transferred from the gel to a nitrocellulose membrane using the iBlot Cell Transfer System (Invitrogen). The membranes were blocked in PBS containing 5% dried milk and 0.1% Tween-20 for 1 hour, and then incubated at 4°C overnight with the following primary antibodies diluted in PBS containing 2% BSA and 0.1% Tween-20 : anti-MITF rabbit monoclonal antibody #12590 (1:1,000 dilution ; Cell Signaling), anti-tyrosinase mouse monoclonal antibody (T311) sc-20035 (1:1,000 dilution ; Santa Cruz Biotechnology), anti-β-actin mouse monoclonal antibody clone AC-15 A5441 (1:10,000 dilution ; Sigma-Aldrich). After washing of the membranes in PBS containing 0.1% Tween-20, they were incubated with the following secondary antibodies in PBS containing 5% dried milk and 0.1% Tween-20 : anti-mouse IgG-HRP #HAF007 (1:1,000 dilution for tyrosinase and 1:15,000 dilution for β-actin ; R&D systems) or anti-rabbit IgG-HRP sc-2313 (1:5,000 dilution ; Santa Cruz Biotechnology). Membranes were incubated with the SuperSignal West Pico or West Femto Chemiluminescence Substrates (Thermo Fisher Scientific) and exposed to Hyperfilm ECL (GE healthcare).

Transfections with mimics or antagomirs

LB 2201-MEL cells were transfected with 30 nM of miR-155 mimic (Applied Biosystems) with Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) using the manufacturer's protocol. Cells were collected after 24h or 48h directly in TriPure Isolation Reagent (Roche) for mRNA analyses and in lysis buffer for protein analyses. LB 2201-MEL cells were transfected with 150 nM of a miR-155 specific Anti-miR™ miRNA Inhibitor (#AM17000, Applied Biosystem) or a control inhibitor using 1 µl per well of Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) in a final volume of 500 µl in a 12-well plate.

Tirp Mice Model

TiRP-10B;Ink4a/Arf^{flox/flox} mice that were named "Tirp mice" were previously described (Huijbers et al., 2006).

Supplementary data

Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR in the intron 1 of MITF-M was performed with the primers : *MITF-M intron 1 sense* 5'- AAGAGACGTATAGTTAATTAGCAG-3' and *MITF-M intron 1 antisense* 5'- GGCTCTTCCTTCAGGCACAAACAT-3'. The *MITF-M intron 1* probe was : 5'- ATTCTGTTGGTGGCCTGGTCAGTTTC-3'. The primers and probe for the *MITF-M inter-exon* assay are those described in material and methods.

Acknowledgments

N.A was supported by a FRIA Grant from the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) (Belgium) and the Centre du Cancer (Cliniques Universitaires Saint-Luc, UCL, Belgium). S.C was supported by a Televie Grant from the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) (Belgium). This work was supported in part by Grants from the Fondation Contre le Cancer (Belgium) and from the FNRS (FRSM, Grant 3.4.559.08.F).

REFERENCES

- BELL, R. E. & LEVY, C. 2011. The three M's: melanoma, microphthalmia-associated transcription factor and microRNA. *Pigment cell & melanoma research*, 24, 1088-106.
- BEMIS, L. T., CHEN, R., AMATO, C. M., CLASSEN, E. H., ROBINSON, S. E., COFFEY, D. G., ERICKSON, P. F., SHELLMAN, Y. G. & ROBINSON, W. A. 2008. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Res*, 68, 1362-8.
- BENNICELLI, J. L., ELIAS, J., KERN, J. & GUERRY, D. T. 1989. Production of interleukin 1 activity by cultured human melanoma cells. *Cancer research*, 49, 930-5.
- BOON, T., COULIE, P. G., VAN DEN EYNDE, B. J. & VAN DER BRUGGEN, P. 2006. Human T cell responses against melanoma. *Annual review of immunology*, 24, 175-208.
- BRICHARD, V., VAN PEL, A., WOLFEL, T., WOLFEL, C., DE PLAEN, E., LETHE, B., COULIE, P. & BOON, T. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, 178, 489-95.
- CHELI, Y., GIULIANO, S., BOTTON, T., ROCCHI, S., HOFMAN, V., HOFMAN, P., BAHADORAN, P., BERTOLOTTO, C. & BALLOTTI, R. 2011. Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene*, 30, 2307-18.
- COULIE, P. G., BRICHARD, V., VAN PEL, A., WOLFEL, T., SCHNEIDER, J., TRAVERSARI, C., MATTEI, S., DE PLAEN, E., LURQUIN, C., SZIKORA, J. P., RENAULD, J. C. & BOON, T. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of experimental medicine*, 180, 35-42.
- ELARAJ, D. M., WEINREICH, D. M., VARGHESE, S., PUHLMANN, M., HEWITT, S. M., CARROLL, N. M., FELDMAN, E. D., TURNER, E. M. & ALEXANDER, H. R. 2006. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12, 1088-96.
- ENGLARO, W., BAHADORAN, P., BERTOLOTTO, C., BUSCA, R., DERIJARD, B., LIVOLSI, A., PEYRON, J. F., ORTONNE, J. P. & BALLOTTI, R. 1999. Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor kappa B activation. *Oncogene*, 18, 1553-9.
- GALLIMORE, A. & GODKIN, A. 2008. Regulatory T cells and tumour immunity - observations in mice and men. *Immunology*, 123, 157-63.
- GAUTHY, E., CUENDE, J., STOCKIS, J., HUYGENS, C., LETHE, B., COLLET, J. F., BOMMER, G., COULIE, P. G. & LUCAS, S. 2013. GARP is regulated by miRNAs and controls latent TGF-beta1 production by human regulatory T cells. *PLoS One*, 8, e76186.
- GOSWAMI, S., TARAPORE, R. S., TESLAA, J. J., GRINBLAT, Y., SETALURI, V. & SPIEGELMAN, V. S. 2010. MicroRNA-340-mediated degradation of microphthalmia-associated transcription factor mRNA is inhibited by the coding region determinant-binding protein. *J Biol Chem*, 285, 20532-40.
- HAFLIDADOTTIR, B. S., BERGSTEINSDOTTIR, K., PRAETORIUS, C. & STEINGRIMSSON, E. 2010. miR-148 regulates Mitf in melanoma cells. *PLoS One*, 5, e11574.
- HOEK, K. S., EICHHOFF, O. M., SCHLEGEL, N. C., DOBBELING, U., KOBERT, N., SCHAEERER, L., HEMMI, S. & DUMMER, R. 2008. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer research*, 68, 650-6.
- HOEK, K. S. & GODING, C. R. 2010. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 23, 746-59.
- HUIJBERS, I. J., KRIMPENFORT, P., CHOMEZ, P., VAN DER VALK, M. A., SONG, J. Y., INDERBERG-SUSO, E. M., SCHMITT-VERHULST, A. M., BERNIS, A. & VAN DEN EYNDE, B. J. 2006. An inducible

- mouse model of melanoma expressing a defined tumor antigen. *Cancer research*, 66, 3278-86.
- KHOLMANSHIKH, O., VAN BAREN, N., BRASSEUR, F., OTTAVIANI, S., VANACKER, J., ARTS, N., VAN DER BRUGGEN, P., COULIE, P. & DE PLAEN, E. 2010. Interleukins 1alpha and 1beta secreted by some melanoma cell lines strongly reduce expression of MITF-M and melanocyte differentiation antigens. *Int J Cancer*, 127, 1625-36.
- KONG, W., YANG, H., HE, L., ZHAO, J. J., COPPOLA, D., DALTON, W. S. & CHENG, J. Q. 2008. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Molecular and cellular biology*, 28, 6773-84.
- LANDSBERG, J., KOHLMAYER, J., RENN, M., BALD, T., ROGAVA, M., CRON, M., FATHO, M., LENNERZ, V., WOLFEL, T., HOLZEL, M. & TUTING, T. 2012. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature*, 490, 412-6.
- LANDSKRON, G., DE LA FUENTE, M., THUWAJIT, P., THUWAJIT, C. & HERMOSO, M. A. 2014. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of immunology research*, 2014, 149185.
- LE POOLE, I. C., RIKER, A. I., QUEVEDO, M. E., STENNETT, L. S., WANG, E., MARINCOLA, F. M., KAST, W. M., ROBINSON, J. K. & NICKOLOFF, B. J. 2002. Interferon-gamma reduces melanosomal antigen expression and recognition of melanoma cells by cytotoxic T cells. *The American journal of pathology*, 160, 521-8.
- MANN, M., BARAD, O., AGAMI, R., GEIGER, B. & HORNSTEIN, E. 2010. miRNA-based mechanism for the commitment of multipotent progenitors to a single cellular fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 15804-9.
- NISHIMURA, E. K., SUZUKI, M., IGRAS, V., DU, J., LONNING, S., MIYACHI, Y., ROES, J., BEERMANN, F. & FISHER, D. E. 2010. Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell stem cell*, 6, 130-40.
- PIERRAT, M. J., MARSAUD, V., MAUVIEL, A. & JAVELAUD, D. 2012. Expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), which is critical for melanoma progression, is inhibited by both transcription factor GLI2 and transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry*, 287, 17996-8004.
- PILOTTE, L., LARRIEU, P., STROOBANT, V., COLAU, D., DOLUSIC, E., FREDERICK, R., DE PLAEN, E., UYTENHOVE, C., WOUTERS, J., MASEREEL, B. & VAN DEN EYNDE, B. J. 2012. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 2497-502.
- ROMERO, P., VALMORI, D., PITTET, M. J., ZIPPELIUS, A., RIMOLDI, D., LEVY, F., DUTOIT, V., AYYOUB, M., RUBIO-GODOY, V., MICHIELIN, O., GUILLAUME, P., BATARD, P., LUESCHER, I. F., LEJEUNE, F., LIENARD, D., RUFER, N., DIETRICH, P. Y., SPEISER, D. E. & CEROTTINI, J. C. 2002. Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunological reviews*, 188, 81-96.
- SAEZ-AYALA, M., MONTENEGRO, M. F., SANCHEZ-DEL-CAMPO, L., FERNANDEZ-PEREZ, M. P., CHAZARRA, S., FRETER, R., MIDDLETON, M., PINERO-MADRONA, A., CABEZAS-HERRERA, J., GODING, C. R. & RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N. 2013. Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy. *Cancer cell*, 24, 105-19.
- SCHWARTZENTRUBER, D. J., TOPALIAN, S. L., MANCINI, M. & ROSENBERG, S. A. 1991. Specific release of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, and IFN-

- gamma by human tumor-infiltrating lymphocytes after autologous tumor stimulation. *Journal of immunology*, 146, 3674-81.
- SHIBAHARA, S., TAKEDA, K., YASUMOTO, K., UDONO, T., WATANABE, K., SAITO, H. & TAKAHASHI, K. 2001. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 6, 99-104.
- SOUDJA, S. M., WEHBE, M., MAS, A., CHASSON, L., DE TENBOSSCHE, C. P., HUIJBERS, I., VAN DEN EYNDE, B. & SCHMITT-VERHULST, A. M. 2010. Tumor-initiated inflammation overrides protective adaptive immunity in an induced melanoma model in mice. *Cancer research*, 70, 3515-25.
- SWOPE, V. B., ABDEL-MALEK, Z., KASSEM, L. M. & NORDLUND, J. J. 1991. Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. *The Journal of investigative dermatology*, 96, 180-5.
- THOMAS, A. J. & ERICKSON, C. A. 2008. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment cell & melanoma research*, 21, 598-610.
- UYTTENHOVE, C., PILOTTE, L., THEATE, I., STROOBANT, V., COLAU, D., PARMENTIER, N., BOON, T. & VAN DEN EYNDE, B. J. 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature medicine*, 9, 1269-74.
- VANCE, K. W. & GODING, C. R. 2004. The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 17, 318-25.
- VOELTER, V., PICA, A., LAURENT, J., RIMOLDI, D., BOUZOURENE, H., SAJADI, A., MATTER, M., ROMERO, P., RUFER, N. & SPEISER, D. E. 2008. An unusual case of metastatic melanoma sensitive to chemotherapy and immunotherapy, with late immune escape in the brain. *Cancer immunity*, 8, 6.
- WATANABE, K., TAKEDA, K., YASUMOTO, K., UDONO, T., SAITO, H., IKEDA, K., TAKASAKA, T., TAKAHASHI, K., KOBAYASHI, T., TACHIBANA, M. & SHIBAHARA, S. 2002. Identification of a distal enhancer for the melanocyte-specific promoter of the MITF gene. *Pigment Cell Res*, 15, 201-11.
- XU, S., WITMER, P. D., LUMAYAG, S., KOVACS, B. & VALLE, D. 2007. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J Biol Chem*, 282, 25053-66.
- YIN, Q., WANG, X., MCBRIDE, J., FEWELL, C. & FLEMINGTON, E. 2008. B-cell receptor activation induces BIC/miR-155 expression through a conserved AP-1 element. *J Biol Chem*, 283, 2654-62.
- ZAROUR, H., DE SMET, C., LEHMANN, F., MARCHAND, M., LETHE, B., ROMERO, P., BOON, T. & RENAULD, J. C. 1996. The majority of autologous cytolytic T-lymphocyte clones derived from peripheral blood lymphocytes of a melanoma patient recognize an antigenic peptide derived from gene Pmel17/gp100. *J Invest Dermatol*, 107, 63-7.

4. Résultats supplémentaires

4.1 Analyse des miRNAs dont l'expression est induite par l'IL-1 β et qui cibleraient *MITF-M* dans les lignées LB2259-MEL et CP50-MEL

Nous avons tout d'abord voulu compléter l'analyse des miRNAs dont l'expression est induite par l'IL-1 β et qui pourraient cibler *MITF-M*. De plus, nous avons également voulu vérifier l'absence de régulation de *MITF-M* par des miRNAs dans la lignée CP50-MEL, considérée comme une « exception ». Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé une analyse globale par microdamier de l'expression des miRNAs surexprimés après 4h d'incubation avec de l'IL-1 β dans les lignées LB2259-MEL et CP50-MEL. Lors de cette étude, nous avons identifié 4 miRNAs, miR-29b-1*, miR-548a-5p, miR-3200 et miR-34b*, surexprimés plus de 1,3 fois dans les 2 lignées en présence d'IL-1 β et susceptibles de cibler le 3'UTR de *MITF-M* d'après des prédictions bioinformatiques (Figure 5A). Nous avons pu uniquement confirmer la surexpression de miR-29b1* par RT-PCRq (Figure 5B et C). Cependant, ce miRNA n'était pas capable de cibler le 3'UTR de *MITF-M* (Figure 5D). Les trois autres miRNAs identifiés étaient très faiblement exprimés dans les deux lignées. Comme attendu, nous avons identifié miR-155 dans la liste des miRNAs surexprimés en présence d'IL-1 β dans la lignée LB2259-MEL (Figure 5A). De même, deux autres miRNAs connus pour cibler *MITF*, miR-96 et miR-340, ont également été identifiés par microdamier mais leur surexpression n'a pas pu être confirmée par RT-PCRq (Figure 1, Article 2). Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence la présence d'un autre miRNA dont l'expression serait induite par l'IL-1 β et qui ciblerait *MITF-M* à la fois dans la lignée LB2259-MEL et CP50-MEL.

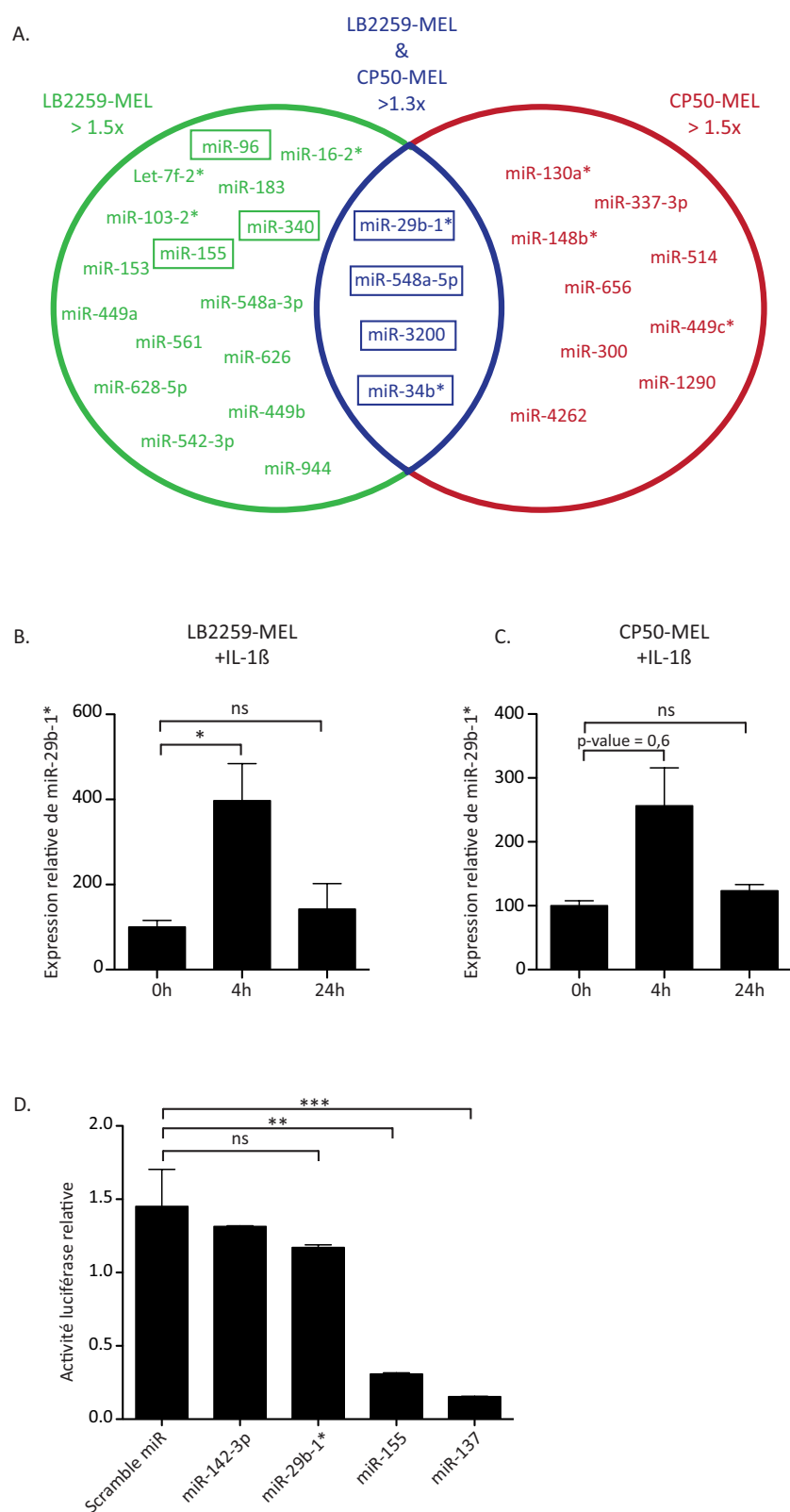


Figure 5 :

(A) Les deux lignées de mélanome ont été incubées pendant 4h avec de l'IL-1β (10 ng/ml) et l'expression des miRNAs a été analysée par microdamier (Affymetrix). L'expression des miRNAs induits plus de 1,5 fois par l'IL-1β est indiquée en vert pour la lignée LB2259-MEL et en rouge pour la lignée CP50-MEL. Les miRNAs induits plus de 1,3 fois dans les 2 lignées sont indiqués en bleu. Les

miRNAs représentés sont uniquement ceux ciblant potentiellement *MITF-M* d'après des prédictions bioinformatiques. Seule l'expression des miRNAs entourés par un rectangle a été testée en RT-PCRq. L'expression de miR-29b-1* a été mesurée par RT-PCRq dans les lignées LB2259-MEL (B) et CP50-MEL (C) après 4h ou 24h de traitement à l'IL-1 β . Les résultats ont été normalisés par l'expression en RNU44 (moyenne $\pm$ SD pour 3 expériences indépendantes).

(D) Des cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec le plasmide rapporteur psiCHECK-2 contenant le 3'UTR de *MITF-M* et les mimics de miRNAs indiqués (10 nM). Le plasmide rapporteur contient le 3'UTR cloné en aval du gène codant la luciférase de Renilla et un gène codant la luciférase de luciole afin de normaliser l'activité luciférase en fonction de l'efficacité de transfection. Les résultats représentent les rapports des activités de la luciférase de Renilla sur la luciférase de luciole (moyenne $\pm$ SD pour des triplicats représentatifs de 3 expériences indépendantes).

4.2 Influence d'autres régions non codantes dans la régulation de *MITF-M*

Les résultats obtenus avec le promoteur spécifique de *MITF-M* ne nous permettent pas d'impliquer celui-ci dans la répression observée en présence d'IL-1 β . Cependant, d'autres données montrent qu'une répression de la transcription de *MITF-M* serait induite par l'IL-1 β (Figure supplémentaire 1, Article 2). Dès lors, nous nous sommes intéressés à la possibilité qu'il existe une ou plusieurs autres régions régulatrices de *MITF-M* en dehors du promoteur classique de celui-ci. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le programme bioinformatique ENCODE qui collecte des données issues de ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation) réalisées dans différentes lignées cellulaires. Nous avons sélectionné 3 régions intéressantes qui pourraient être ciblées par différents facteurs de transcription en présence d'IL-1 β . La première région correspond à une séquence de 2,2 kb comprenant la fin de l'intron 3, l'exon 4 et le début de l'intron 4 de *MITF-M*. Elle contient un site de fixation pour c-Jun et JunD, deux facteurs de transcription de la même famille, dont l'expression est induite par l'IL-1 β . c-Jun et JunD peuvent tous les deux faire partie du complexe AP-1, principalement connu pour être un activateur de la transcription, mais pouvant également agir comme répresseur (Hernandez et al., 2008). La deuxième région correspond à l'intron 4 complet de *MITF-M*, d'une taille de 7,7 kb, et possède 3 sites de fixation pour le facteur de transcription CTCF (CCCTC-binding factor). Enfin, la troisième région est une séquence de 5 kb localisée 30 kb après la fin du 3'UTR de *MITF-M*. Elle pourrait être ciblée par 27 facteurs de transcription dont plusieurs inhibiteurs (E2F6, ZBTB7A, CHD2, HEY1, ...). Cette dernière région serait impliquée dans la régulation de l'expression d'un ARN non codant.

Nous avons cloné ces différentes régions en aval d'un gène codant la luciférase de luciole sous le contrôle d'un promoteur *MITF-M* minimal de 2,2 kb. Des transfectants stables ont été sélectionnés dans la lignée LB2201-MEL, excepté pour la construction contenant l'intron 4 complet de *MITF-M*. Ceci est peut-être dû à la taille importante de la construction. Dans les deux types de transfectants stables obtenus, nous n'avons pas pu observer de répression de l'activité luciférase après 24h d'incubation avec de l'IL-1 β (Figure 6).

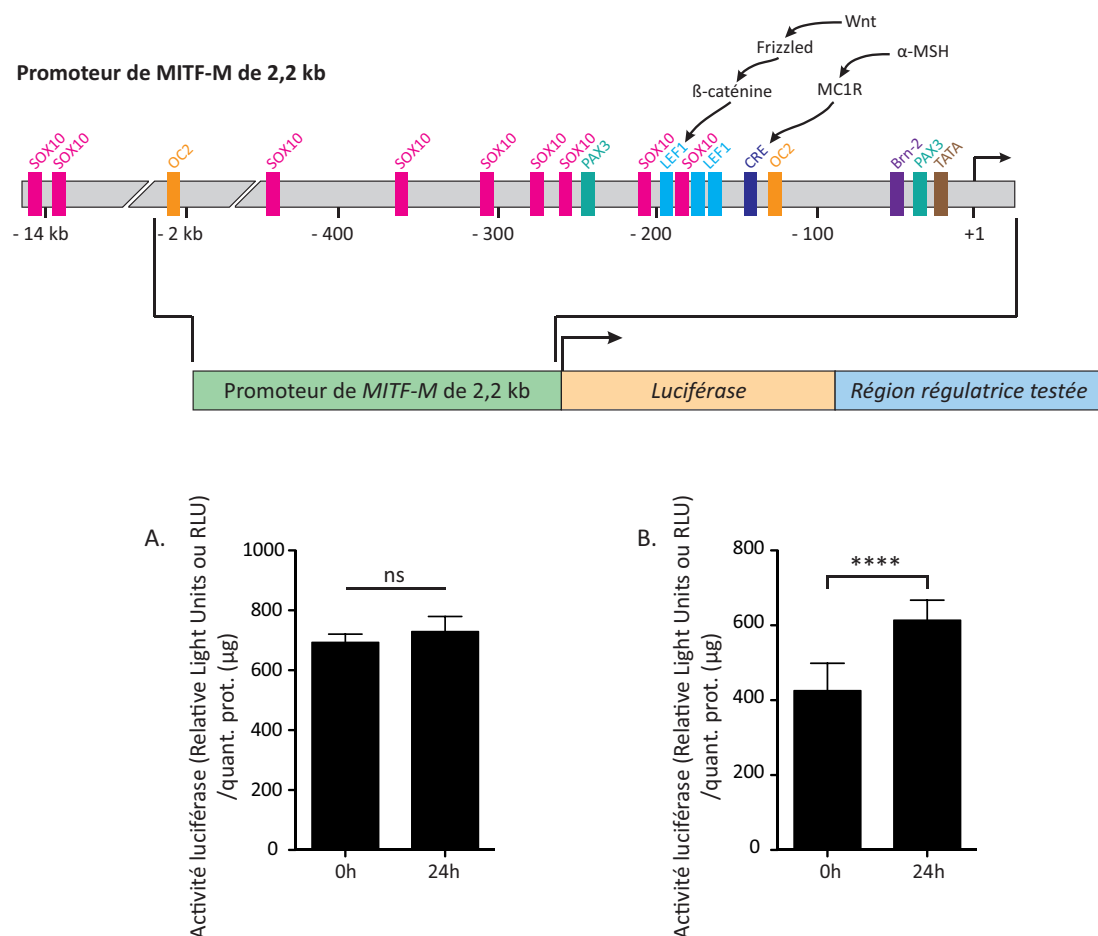


Figure 6 : La lignée LB2201-MEL a été transfectée stablement avec un plasmide contenant la région « Intron3-Exon4-Intron4 » (A) ou la région « post-3'UTR » (B) et incubée avec de l'IL-1 β (10 ng/ml) pendant 24h. L'activité luciférase de luciole a été normalisée par rapport à la concentration en protéines (moyenne $\pm$ SD pour 3 réplicats représentatifs de 3 expériences indépendantes).

Les résultats obtenus semblent donc indiquer que c-Jun et JunD ne sont pas impliqués dans la répression de l'expression de MITF-M induite par l'IL-1 β . Cependant, il se peut également qu'il y ait une coopération entre la séquence reconnue par c-Jun et JunD et d'autres séquences qui impliqueraient d'autres facteurs nécessaires à cette régulation.

En ce qui concerne l'étude des transfectants stables contenant la région en aval du 3'UTR de *MITF-M*, nous avons, de manière étonnante, observé une augmentation de l'activité luciférase en présence d'IL-1 β . Dès lors, il semblerait que l'IL-1 β induise plutôt une activation de la transcription soit en réprimant l'expression de certains répresseurs transcriptionnels soit en stimulant l'expression d'activateurs transcriptionnels se fixant sur cette séquence promotrice. Cette région ne semble donc pas impliquée dans la répression de l'expression de MITF-M en présence d'IL-1 β mais permettrait peut-être une stimulation de l'expression d'un gène encore non identifié en présence d'IL-1 β .

5. Matériel et méthodes supplémentaires

Plasmides et réactifs

Le promoteur de *MITF-M* de 4,5 kb ainsi que les régions régulatrices testées ont été clonés dans le plasmide pGL4.15 (Promega). Le promoteur de *MITF-M* de 15 kb a été cloné dans le plasmide pGL3 (Promega). Dans les transfectants transitoires, l'activité de la luciférase de luciole a été normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla dont l'expression est induite par la co-transfection du plasmide pGL4.75 (Promega). Le promoteur LTR du virus de Moloney et l'ADNc de *MITF-M* humain ont été clonés dans le plasmide pcDNA3 (Invitrogen).

Une population de cellules LB2259-MEL transfectées stablement avec le plasmide pGL4.15 contenant le promoteur de 4,5 kb a été sélectionnée avec 200 µg/ml d'Hygromycine (Roche Applied Sciences). De même, une population de cellules B16 F1 transfectées stablement avec le plasmide contenant l'ADNc de *MITF-M* humain a été sélectionnée avec 800 µg/ml de G418 (Roche Applied Sciences).

Transfection

Les lignées cellulaires utilisées ont été transfectées avec les différents plasmides en utilisant de la Lipofectamine 2000 (Life Technologies) selon le protocole du fabricant.

RT-PCRq d'ARNm

L'extraction d'ARN, la transcription inverse et la PCRq ont été réalisées comme décrit précédemment (voir Article 2).

Les amorces supplémentaires utilisées sont : *BRN-2 humain sens* 5'-ATGTGCAAGCTGAAGCCTTT-3' et *BRN-2 humain anti-sens* 5'-CTCACCACCTCCTTCTCCAG -3'. La sonde supplémentaire utilisée est : *sonde BRN-2 humain* 5'-CCAAGCCCTCGGCCAGGAGATCAC-3'.

Microdamier (microarray) de miRNAs

Le profil d'expression de 2 lignées cellulaires (LB2259-MEL et CP50-MEL) traitées ou non avec de l'IL-1β (10 ng/ml) a été analysé sur une puce « GeneChip miRNA 2.0 arrays #901753 » (Affymetrix). L'ARN total a été extrait avec du « TriPure Isolation Reagent » (Roche). L'analyse par microdamier a ensuite été réalisée suivant le protocole « Affymetrix GeneChip microRNA array protocol ».

Discussion et perspectives

1. Résumé des résultats obtenus

Nos différentes études se sont intéressées à la compréhension d'un mécanisme d'échappement des cellules de mélanome face au système immunitaire (Figure 1).

Au cours de la première étude, nous avons démontré que l'IL-1 α et l'IL-1 β réprimaient l'expression de MITF-M dans des cellules de mélanome possédant le récepteur IL-1RI. Nous avons montré que cette répression était à la fois effective au niveau de l'ARNm et des protéines et qu'elle était dépendante de NF- κ B et de JNK. De plus, nous avons pu mettre en évidence que la répression de l'expression de MITF-M induite par l'IL-1 β menait à la répression de l'expression des antigènes de différenciation *MLANA* (*Melan-A/MART-1*), *TYR* (*tyrosinase*) ou *SILV* (*pMel17/gp100*), trois gènes dont l'expression est régulée par MITF-M. Cette répression induisait à son tour une diminution de la reconnaissance des cellules tumorales par des CTL spécifiques de ces antigènes de différenciation. Finalement, nous avons déterminé qu'approximativement 13% des lignées de mélanome présentaient une diminution d'expression de MITF-M associée à une sécrétion active d'IL-1 α ou IL-1 β .

Au cours de notre deuxième étude, nous avons identifié un mécanisme en aval de NF- κ B et JNK responsable de la répression de l'expression de MITF-M et de ses gènes cibles en présence d'IL-1 β . Nous avons en effet pu démontrer que l'expression de miR-155 était induite par l'IL-1 β dans certaines lignées de mélanome. Dans ces lignées, miR-155 induisait alors une déstabilisation de l'ARNm endogène de *MITF-M* ainsi qu'une répression importante de sa traduction en protéine. Nous avons identifié le site de fixation de miR-155 sur le 3'UTR de *MITF-M*. De plus, grâce à l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de miR-155, nous avons pu confirmer l'implication de celui-ci dans la répression de l'expression de MITF-M induite par l'IL-1 β . Enfin, dans un modèle de mélanome inductible chez la souris, nous avons mis en évidence une corrélation inverse entre l'expression de *MITF-M* et de la *tyrosinase* d'une part et celle de l'IL-1 β et de miR-155 d'autre part. Ces différents résultats nous ont donc permis d'identifier un nouveau mécanisme d'échappement des cellules de mélanome face à la réponse immunitaire anti-tumorale induit par la présence de cytokines pro-inflammatoires.

Cependant, au cours de notre deuxième étude, nous avons également découvert que la répression de l'expression de MITF-M induite par l'IL-1 β impliquait aussi une répression de la transcription de *MITF-M*. Nous avons alors essayé d'identifier les régions régulatrices présentes dans le gène *MITF* qui pourraient être responsables de cette répression de la transcription. Nous n'avons pas pu impliquer le promoteur spécifique de *MITF-M* dans cette répression en testant une région promotrice de 4,5 kb ou de 15 kb. De même, nous n'avons pas pu mettre en évidence

un rôle dans la répression de la transcription de *MITF-M* pour une région comprenant la fin de l'intron 3, l'exon 4 et le début de l'intron 4 de *MITF-M*. Il en va de même pour une région située 30 kb en aval du 3'UTR de *MITF-M* et comprenant des séquences de fixation pour de nombreux facteurs de transcription. Dès lors, nous n'avons pas encore identifié la séquence responsable de la répression de la transcription de *MITF-M* en présence d'IL-1 β ni les mécanismes impliqués dans ce processus.

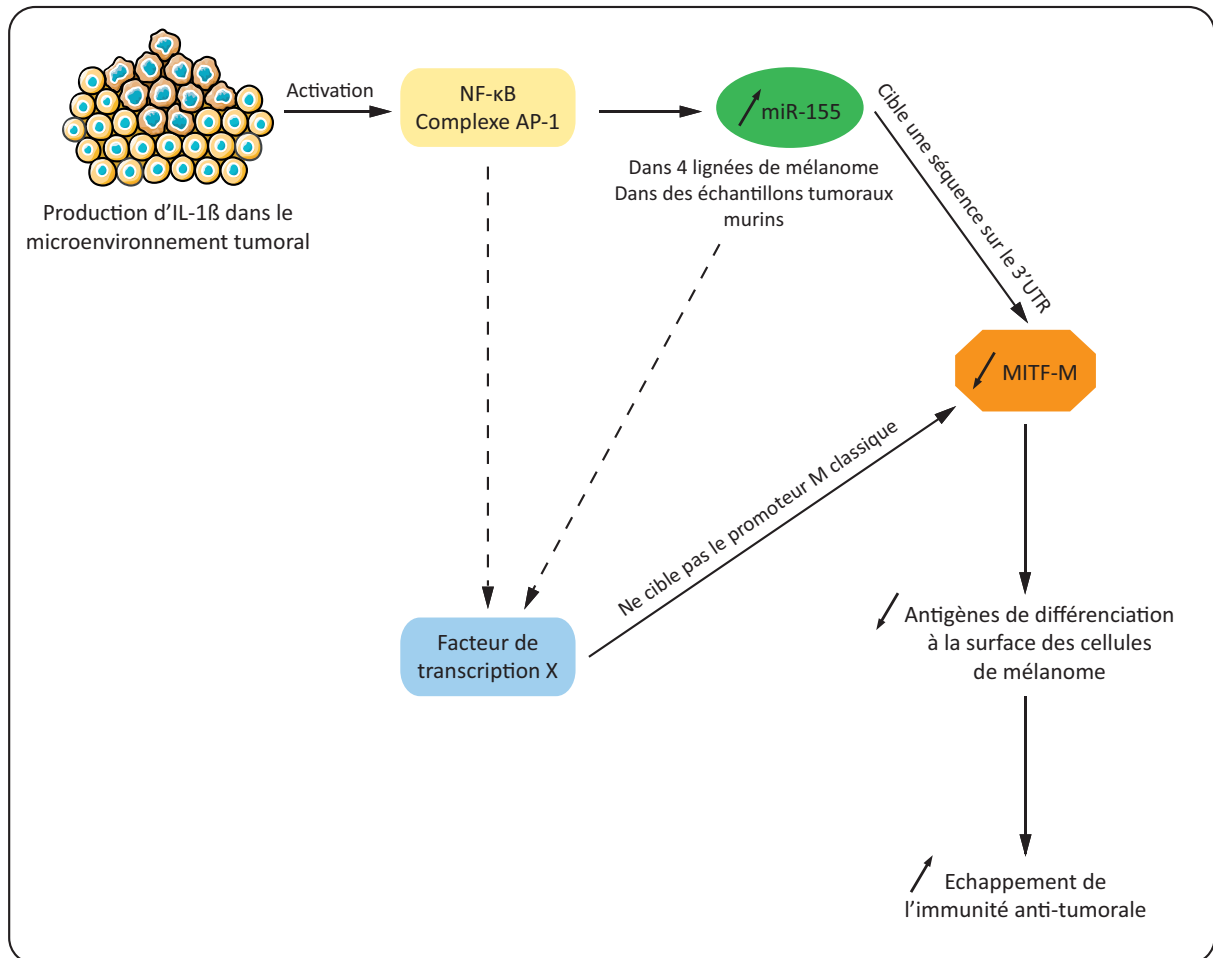


Figure 1 : Schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans la répression de l'expression de *MITF-M* en présence d'IL-1 β .

2. miR-155

2.1 Le rôle de miR-155 dans l'immunité et l'inflammation

Au cours de ce travail, nous avons démontré le rôle de miR-155 dans la répression de l'expression de MITF-M dans un microenvironnement inflammatoire. miR-155 est un miRNA qui a été particulièrement bien étudié. Il provient du gène non codant *BIC* (*B-cell Integration Cluster*) aussi nommé *MIR155HG* (*miR-155 Host Gene*) et joue un rôle très important dans l'hématopoïèse, l'immunité et l'inflammation (Elton et al., 2013; Faraoni et al., 2009). Au cours de l'hématopoïèse, miR-155 est exprimé à la fois dans les précurseurs lymphoïdes et myéloïdes mais à différents niveaux (Figure 2). Dans les précurseurs myéloïdes, son expression serait réprimée pour induire la différenciation des cellules. En effet, la diminution progressive de l'expression de ce miRNA favoriserait la différenciation des précurseurs érythroïdes en globules rouges (Masaki et al., 2007). De même, son expression empêcherait la différenciation en myéloblastes ainsi que la différenciation mégacaryocytaire (Georgantas et al., 2007). En revanche, son expression dans des monocytes murins induirait la différenciation de ces cellules en macrophages (Mann et al., 2010). De même, son expression serait requise pour le développement des lymphocytes B et T et serait également induite après activation du BCR (B-Cell Receptor) ou du TCR afin de permettre la production d'immunoglobulines ou de cytokines par ces cellules (Elton et al., 2013; Faraoni et al., 2009; Rodriguez et al., 2007). En effet, des souris déficientes en pré-miR-155 montrent des réponses immunitaires B et T fortement diminuées par rapport à des souris sauvages (Rodriguez et al., 2007). Enfin, miR-155 ne serait pas impliqué dans le développement des cellules dendritiques mais jouerait un rôle dans l'activation de ces cellules. En effet, les souris déficientes en miR-155 auraient une capacité réduite à présenter des antigènes aux lymphocytes T (Rodriguez et al., 2007). Cela contribuerait également à une diminution de l'efficacité de la réponse immunitaire.

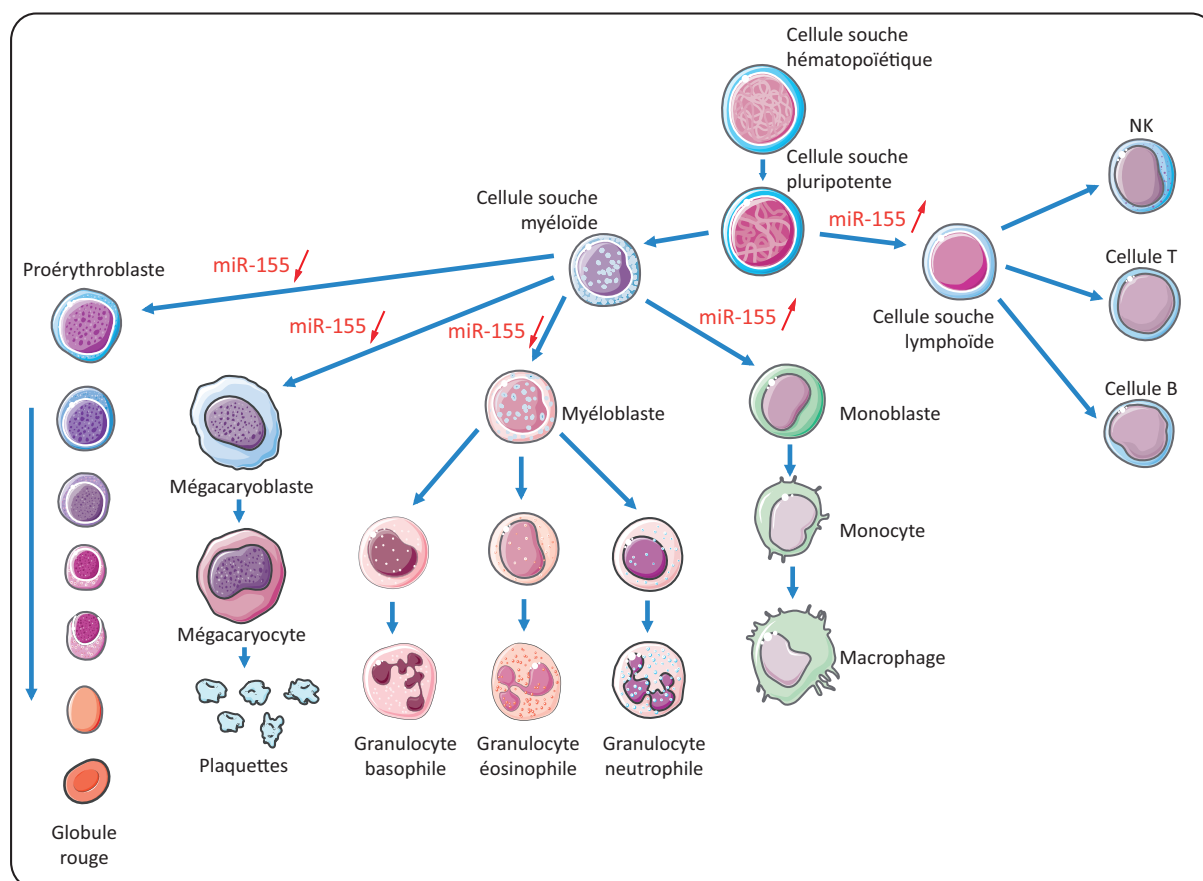


Figure 2 : L'hématopoïèse et le rôle de miR-155 dans la différenciation des différents précurseurs
Adapté de (Georgantas et al., 2007; Ratliff et al., 2014)

miR-155 est également impliqué dans l'inflammation. En effet, l'expression de miR-155 serait induite dans les macrophages ou les cellules dendritiques après activation des TLR présents à la surface de ces cellules. Dans ces cellules, miR-155 ferait partie de la boucle de rétrocontrôle négative permettant de réprimer la production de cytokines pro-inflammatoires en inhibant l'expression de TAB2, un adaptateur présent dans la voie de signalisation TLR/IL-1 (Ceppi et al., 2009). Une autre étude suggérerait que l'induction de l'expression de miR-155 après l'activation des macrophages mènerait à une production accrue de $\text{TNF-}\alpha$ via une stabilisation de son ARNm (Tili et al., 2007). Ceci est en accord avec la sécrétion de $\text{TNF-}\alpha$ observée après l'activation des macrophages.

Enfin, miR-155 serait également impliqué dans l'arthrite rhumatoïde (Rheumatoid Arthritis ou RA), une maladie auto-immune induisant des dommages irréversibles au niveau des articulations. Il a été montré que l'expression de miR-155 était induite par l'IL-1 β , le $\text{TNF-}\alpha$ ou des ligands des TLR (LPS ou poly(I-C)) dans des cultures de fibroblastes de patients souffrant de

cette maladie (Stanczyk et al., 2008). Ces cytokines et ligands ont été utilisés pour simuler le milieu inflammatoire présent au niveau des articulations dans la RA. Dans ces cellules, miR-155 agirait comme un miRNA protecteur en ciblant les *MMPs 1* et *3*, des marqueurs importants de la destruction des tissus dans la RA et en diminuant ainsi les dommages causés aux tissus par l'inflammation (Stanczyk et al., 2008).

2.2 miR-155 est un « oncomiR » dans différents cancers

Ces différentes études montrent donc que, dans des conditions normales, miR-155 joue un rôle à la fois dans la réponse immunitaire et dans la réponse aux signaux inflammatoires. Cependant, il a également été démontré que, dans des situations pathologiques, miR-155 pouvait agir comme un « oncomiR » en favorisant la progression tumorale. Plusieurs études ont mis en évidence la surexpression de miR-155 dans différents cancers, principalement dans les leucémies et les lymphomes. Dans ces cancers, miR-155 aurait un rôle pro-tumoral qui a été illustré dans une étude sur des cellules B infectées avec EBV (Epstein-Barr Virus), un virus induisant l'immortalisation des cellules et associé à certains cancers dont le lymphome de Burkitt (Linnstaedt et al., 2010). Dans ces cellules, l'infection par EBV induisait une surexpression de miR-155 permettant une prolifération cellulaire accrue ainsi qu'une diminution de l'apoptose (Linnstaedt et al., 2010). De même, il a été montré que des souris transgéniques surexprimant miR-155 dans des cellules B développaient des désordres lymphoprolifératifs capables d'évoluer en lymphomes B (Costinean et al., 2006).

La surexpression de ce miRNA a également été démontrée dans d'autres tumeurs solides incluant le cancer du sein, du col de l'utérus, du colon, des poumons, du pancréas et de la thyroïde où il cible différents gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans la croissance ou la prolifération (Chen et al., 2014; Elton et al., 2013). Par exemple, il a été démontré que miR-155 était surexprimé dans le cancer du sein et qu'il réprimait l'expression de *SOCS1* (*Suppressor Of Cytokine Signaling 1*), un gène suppresseur de tumeur (Jiang et al., 2010). Cette répression menait à une activation de la voie JNK et STAT3, favorisant l'inflammation et la prolifération des cellules (Jiang et al., 2010). De plus, la surexpression de miR-155, induite par le TGF- β , favoriserait l'EMT de cellules de cancer du sein en ciblant RhoA, une protéine impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Kong et al., 2008). Dès lors, le développement d'une stratégie permettant la répression de miR-155 serait bénéfique non seulement dans le cadre de la lutte contre le mélanome mais également dans de nombreux types cancéreux différents.

3. Etude d'un modèle inductible de mélanome chez la souris

Au cours de notre étude de l'expression de miR-155 dans des cellules de mélanome, nous avons utilisé un modèle inductible de mélanome chez la souris appelé Tirp (Huijbers et al., 2006)(Article 2). Dans les tumeurs obtenues, nous avons pu mettre en évidence une anti-corrélation entre, d'une part, l'expression de *MITF-M* et de la *tyrosinase* et, d'autre part, de miR-155 et de l'*IL-1β* (Figure 6, Article 2). Comme discuté dans l'Article 2, les tumeurs analysées au cours de cette étude présentaient 2 phénotypes : soit pigmentées et moins agressives (appelées Mela), soit non pigmentées et à la croissance rapide (appelées Amela) (Soudja et al., 2010). Les tumeurs Mela induisaient la mort de la souris dans les 3 mois tandis que les tumeurs Amela réduisaient ce délai à 1 mois (Soudja et al., 2010). Enfin, certaines tumeurs induites pouvaient également présenter d'abord un phénotype Mela évoluant ensuite vers un phénotype Amela.

Une analyse plus approfondie de ces deux types de tumeurs a été réalisée (Soudja et al., 2010). Tout d'abord, la progression des cellules tumorales Amela a été associée à l'inflammation et à une splénomégalie due à une accumulation de cellules immunosuppressives MDSC. Ensuite, l'étude des surnageants de tumeurs fraîchement explantées a pu mettre en évidence, uniquement dans les tumeurs Amela, la présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, de chémokines, d'IL-10, une cytokine aux effets pro-tumoraux, ou encore de facteurs de croissance incluant le VEGFA (Soudja et al., 2010). En plus de ces facteurs, de l'IL-1β et de faibles doses d'IL-1α et de TNF-α ont également été détectées dans le sérum des souris portant des tumeurs Amela uniquement (Soudja et al., 2010). Il est intéressant de noter que la présence de mélanine dans les tumeurs Mela est induite par MITF-M qui serait donc exprimé dans les tumeurs Mela mais pas dans les tumeurs Amela, certainement en raison du microenvironnement inflammatoire. De plus, l'absence d'expression de MITF-M dans ces tumeurs influencerait non seulement la synthèse de mélanine mais également la prolifération et l'invasion des cellules. Dès lors, la perte d'expression de MITF-M dans les cellules tumorales permettrait non seulement un échappement au système immunitaire mais également le développement de caractéristiques avantageuses pour les cellules cancéreuses.

Au niveau immunitaire, les deux types de tumeurs présentaient environ le même niveau d'envahissement par des lymphocytes T CD4 et CD8 tandis qu'il y avait légèrement moins de cellules dendritiques dans les tumeurs Amela (Soudja et al., 2010). De plus, les lymphocytes T semblaient s'infiltrer plus en profondeur dans les tumeurs Amela alors qu'ils restaient en périphérie dans les tumeurs Mela (Soudja et al., 2010). Cependant, les lymphocytes T infiltrés dans les tumeurs Amela présentaient un phénotype anergique, contrairement aux lymphocytes

T présents dans les tumeurs Mela (Soudja et al., 2010). Les tumeurs Amela auraient donc été infiltrées par des lymphocytes T stimulés chroniquement, ce qui aurait mené à leur épuisement. En revanche, les tumeurs Mela seraient entourées de lymphocytes T n'ayant pas acquis ce phénotype « épuisé ».

Pour évaluer la responsabilité du système immunitaire adaptatif dans le développement des tumeurs Mela ou Amela, des souris Tirp ont été utilisées dans un background Rag^{-/-}. Les souris Rag^{-/-} ne peuvent pas activer la recombinaison V(D)J des gènes des immunoglobulines et des récepteurs des lymphocytes T, ce qui les empêchent de posséder des cellules B et T matures. Dans ces souris, l'apparition des tumeurs Amela ainsi que leur développement était plus rapide (Soudja et al., 2010). En revanche, elles ne développaient pas de tumeurs Mela ; cependant leur présence pouvait être masquée par leur transformation rapide en tumeurs Amela. Le système immunitaire adaptatif permettrait donc de retarder l'apparition des tumeurs Amela. De plus, il est intéressant de noter que l'immunité adaptative ne serait pas responsable de l'initiation de l'inflammation dans les tumeurs Amela étant donné qu'il n'y avait pas d'infiltration de cellules lymphocytaires dans les tumeurs de ces souris qui étaient pourtant en présence d'un microenvironnement inflammatoire (Soudja et al., 2010).

Pour compléter notre étude du rôle de miR-155 dans la répression de l'expression de MITF-M dans les mélanomes, il est tout d'abord indispensable de confirmer que l'expression de miR-155 détectée dans nos échantillons tumoraux provient principalement des cellules tumorales et non d'autres cellules du stroma. Pour répondre à cette question, nous pourrions envisager de réaliser de l'hybridation *in situ* de miR-155 dans des coupes de tissus tumoraux. Ceci a déjà été réalisé auparavant (Wang et al., 2009).

Ensuite, il serait intéressant d'inhiber l'expression de miR-155 dans les tumeurs Amela. Ceci permettrait d'évaluer si la diminution d'expression de miR-155 peut réduire leur agressivité et les rediriger vers un phénotype semblable aux tumeurs Mela. Différentes techniques ont été développées afin d'inhiber les effets des miRNAs dans des cellules. Elles impliquent l'utilisation d'anti-miRs modifiés chimiquement comme les antagomiRs, des ARN simples brins anti-sens associés au cholestérol ou les oligonucléotides « bloqués » (Locked Nucleic Acid ou LNA) ainsi que les acides nucléiques peptidiques (Peptide Nucleic Acids ou PNAs), trois molécules qui ont chacune montré leur efficacité *in vivo* (Fabani et al., 2010; Krutzfeldt et al., 2005; Lennox and Behlke, 2011). Ces différentes molécules pourraient donc être injectées dans les tumeurs des souris afin d'étudier l'effet de l'inhibition de l'expression de miR-155 dans la croissance tumorale. Cependant, étant donné que miR-155 joue de nombreux rôles également dans les cellules

immunitaires, il serait intéressant d'inhiber son expression spécifiquement dans les cellules tumorales. Pour cela, nous pourrions adapter une technique impliquant la livraison de PNAs via des nanoparticules. Les PNAs sont des oligonucléotides dans lesquels le squelette sucre-phosphodiester des miRNAs a été remplacé par une structure architecturale composée d'unités N-(2-aminoethyl)-glycine liées par des liens peptidiques (Fabani et al., 2010). Ce squelette permet une meilleure stabilité des molécules, les rendant moins susceptibles à la dégradation par des nucléases ou des protéases. Les nanoparticules sont, quant à elles, composées de PLGA (Poly(lactic-co-Glycolic Acid), non toxiques et biodégradables (Babar et al., 2012). Les PNAs peuvent être chargés dans des nanoparticules afin d'être délivrés dans les cellules. L'intérêt principal de ce type de technique est le fait que les nanoparticules peuvent être modifiées afin de cibler des cellules particulières. Ceci peut être illustré par une étude utilisant des PNAs spécifiques de miR-155 encapsulés dans une nanoparticule portant à sa surface un peptide appelé pénétratine qui favorise la pénétration dans les cellules (Babar et al., 2012). Cette technique a été utilisée dans un modèle de lymphome chez la souris pour étudier l'effet de l'inhibition de miR-155 dans les cellules B cancéreuses. Dans cette étude, grâce à la présence de pénétratine, les nanoparticules pénétraient préférentiellement dans les cellules B, ce qui a permis de démontrer que miR-155 favorisait la croissance de ces cellules tumorales (Babar et al., 2012). Ce genre de stratégie pourrait donc être utilisée dans les mélanomes en modifiant les nanoparticules afin de cibler spécifiquement ces cellules tumorales. De plus, un autre intérêt majeur de cette technique est le fait qu'elle nécessite d'utiliser une dose beaucoup plus faible d'inhibiteur par rapport à une technique d'injection d'antagomiRs.

De même, il serait intéressant d'utiliser des souris floxées pour le gène *B/C* et de les croiser avec notre modèle de souris Tirp. Ceci permettrait d'inhiber spécifiquement l'expression de miR-155 dans les cellules de mélanome, l'expression de la Cre recombinase étant sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase. Cette expérience permettrait d'évaluer le rôle de miR-155 au cours du développement et de la progression du mélanome. Malheureusement, ces souris floxées pour miR-155 ne semblent pas encore disponibles dans le commerce. En revanche, il existe une souche de souris permettant la surexpression de miR-155 sous le contrôle de la Cre recombinase (souris Gt(ROSA)26Sor^{tm1(tTA,tetO-Mir155)FjSl}/J). L'utilisation de ces souris nous permettrait d'étudier l'influence de la surexpression spécifique de miR-155 dans les mélanocytes en les croisant avec des souris Tirp. De plus, étant donné que, chez ces souris, l'expression de miR-155 est sous la dépendance du système inductible Tet, il serait alors possible de réduire

l'expression de miR-155 en utilisant de la doxycycline. Ces souris nous permettraient donc d'améliorer notre compréhension du rôle de miR-155 dans les mélanomes.

4. Le rôle du microenvironnement dans le phénomène de « changement de phénotype »

4.1 L'influence du microenvironnement inflammatoire sur le changement de phénotype des mélanomes

La théorie du modèle génétique du cancer suggère que, lorsque des cellules tumorales acquièrent des mutations pro-métastatiques irréversibles, elles peuvent alors migrer et donner naissance à des métastases génétiquement distinctes des cellules présentes dans la tumeur primaire (Bell and Levy, 2011; Hoek and Goding, 2010). Cependant, le modèle alternatif du cancer propose plutôt un rôle primordial du microenvironnement dans la formation des métastases. Ces cellules ne seraient pas génétiquement différentes des cellules de la tumeur primaire mais auraient activé certains gènes spécifiques favorisant l'apparition de métastases en réponse à des signaux produits dans le microenvironnement tumoral (Bell and Levy, 2011; Hoek and Goding, 2010). Dès lors, après s'être éloignées de la tumeur primaire, les cellules métastatiques pourraient revenir à un état prolifératif ou rester dans un état peu prolifératif et invasif en fonction des signaux rencontrés dans l'environnement tumoral (Figure 3) (Bell and Levy, 2011; Hoek and Goding, 2010).

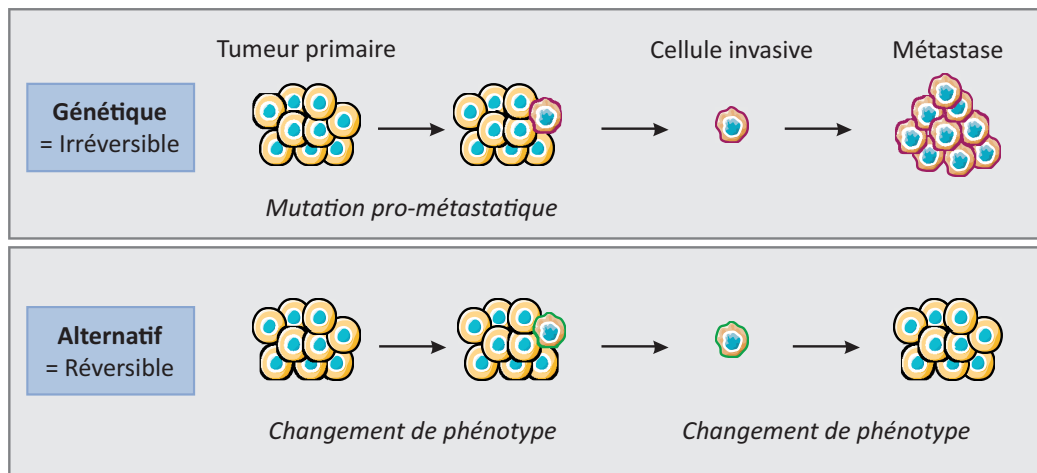


Figure 3 : La théorie du modèle génétique du cancer versus la théorie alternative

Dans le modèle génétique, une cellule acquiert des mutations qui favorisent l'invasion et induisent la migration de la cellule loin de la tumeur primaire où elle se divise pour former une métastase. Comme les lésions génétiques sont irréversibles, les métastases sont génétiquement distinctes de la lésion initiale. Au contraire, le modèle alternatif suggère que les métastases sont induites par le microenvironnement qui favorise un changement phénotypique des cellules. Ceci implique une diminution de la prolifération associée à un phénotype «stem cell-like» comprenant un potentiel invasif. En fonction des signaux reçus, ces cellules vont migrer vers une nouvelle niche où un microenvironnement distinct va permettre, soit la reprise de la prolifération et la formation d'une métastase, soit la quiescence des cellules. Les métastases ne sont alors pas génétiquement distinctes des cellules de la tumeur primaire.

Adapté de (Hoek and Goding, 2010)

Ce changement de phénotype serait facilité dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales. En effet, pour empêcher une réponse cellulaire inappropriée, une limite « threshold » devrait être dépassée pour que des cellules répondent à un signal induisant un changement de phénotype. Cette limite peut être, par exemple, la nécessité d'activer deux voies de signalisation en même temps. Dans les cellules normales, l'activation de ces deux voies a peu de chance de se produire aléatoirement. En revanche, dans des cellules tumorales, des modifications génétiques ou épigénétiques peuvent mener à l'activation constitutive d'une voie spécifique comme BRAF, par exemple, ne nécessitant plus que l'activation d'une autre voie pour induire un changement de phénotype. Les cellules deviendraient alors hypersensibles aux signaux du microenvironnement qui peuvent induire un changement de phénotype (Hoek and Goding, 2010).

Au cours de notre travail, nous avons identifié un mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire induit par une diminution d'expression des antigènes de différenciation consécutive à une diminution d'expression de MITF-M. Cependant, cette diminution d'expression de MITF-M pourrait également permettre le développement d'un phénotype

tumoral plus agressif capable d'induire l'invasion et la formation de métastases. En effet, il a été mis en évidence que l'expression de MITF-M était absente dans les cellules de mélanome montrant une signature invasive et présente dans les cellules de mélanome présentant une signature proliférative (Eichhoff et al., 2010; Hoek et al., 2008). Ces expériences ont été réalisées à la fois dans des cellules humaines *in vitro* ainsi qu'en analysant des métastases de mélanome humain (Cheli et al., 2011; Eichhoff et al., 2010; Hoek et al., 2008). Il a également été démontré que ces phénotypes étaient réversibles et principalement influencés par le microenvironnement (Hoek et al., 2008). Dès lors, grâce à l'utilisation du modèle rhéostat décrit précédemment, nous pouvons suggérer que la diminution d'expression de MITF-M, induite par le microenvironnement inflammatoire, permettrait d'abord une stimulation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération plutôt que dans la différenciation. Ensuite, la perte quasi complète de MITF-M permettrait l'acquisition, par les cellules de mélanome, de propriétés invasives associées à un arrêt de la prolifération (Figure 5 ; Introduction). Il serait donc intéressant d'analyser, par RT-PCRq et Western Blot, les niveaux d'expression des gènes cibles de MITF-M impliqués dans la prolifération, la survie et l'invasion dans des cellules de mélanomes incubées avec de l'IL-1 β . Ceci permettrait d'évaluer si un microenvironnement inflammatoire est un stimulus suffisant pour induire un changement de phénotype dans des cellules de mélanome.

4.2 L'utilisation du changement de phénotype dans les mélanomes afin d'améliorer les thérapies anti-tumorales

Cette plasticité phénotypique est une caractéristique principale des mélanomes, des tumeurs connues pour former une population hétérogène permettant une résistance accrue à la chimiothérapie. En effet, ce traitement cible les cellules en prolifération, caractéristique principale de nombreuses cellules tumorales. En revanche, dans le mélanome, la chimiothérapie n'aura aucun effet sur les cellules quiescentes exprimant de très faibles quantités de MITF-M. Ces cellules, qui possèdent un fort potentiel invasif, vont alors migrer avant de changer vers un phénotype prolifératif permettant la création d'une nouvelle métastase en présence d'un microenvironnement tumoral adapté.

Etant donné le rôle de MITF-M dans la survie cellulaire, il serait tentant d'essayer d'inhiber complètement son expression dans les mélanomes afin d'induire la mort de ces cellules. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC (Histone Déacétylase) permettrait une répression de l'expression de MITF-M dans les mélanomes, ce qui induirait une régression tumorale à court terme (Yokoyama et al., 2008). Cependant, à long terme, ce genre de stratégie

pourrait se retourner contre le patient en menant à la formation de cellules « stem cell-like » résistantes, exprimant peu de MITF-M et capables de migrer et de reformer des métastases. Dès lors, afin d'améliorer l'efficacité des traitements contre les mélanomes, il serait plus pertinent de forcer les cellules à adopter un même phénotype différencié, sensible aux traitements utilisés afin de ne pas « oublier » une partie de la population cellulaire capable de recréer des métastases. Cette « thérapie de la différenciation » peut être apparentée à celle utilisée avec succès dans le cadre des leucémies (Spira and Carducci, 2003). Cette stratégie impliquerait deux étapes : d'une part, l'utilisation d'un agent capable de forcer les cellules à prendre un phénotype différencié et, d'autre part, la présence d'un autre agent, ciblant spécifiquement ces cellules différenciées et induisant leur mort (Figure 4) (Saez-Ayala et al., 2013). Une thérapie de ce type est particulièrement pertinente car elle ne dépend pas des mutations qui peuvent être impliquées dans le développement et la progression du mélanome. Une étude intéressante à ce sujet a été publiée en 2013 et propose l'utilisation de MTX (Méthotrexate) pour induire l'expression de MITF-M et la différenciation des cellules de mélanome suivie de l'utilisation de TMECG (3-O-(3,4,5-Trimethoxylbenzoyl)-Epicatechin). Cette pro-drogue, métabolisée par la tyrosinase, induirait uniquement la mort des cellules produisant cette enzyme et donc, grâce à l'utilisation préalable de MTX, de toutes les cellules de mélanome (voir Discussion, Article 2) (Saez-Ayala et al., 2013).

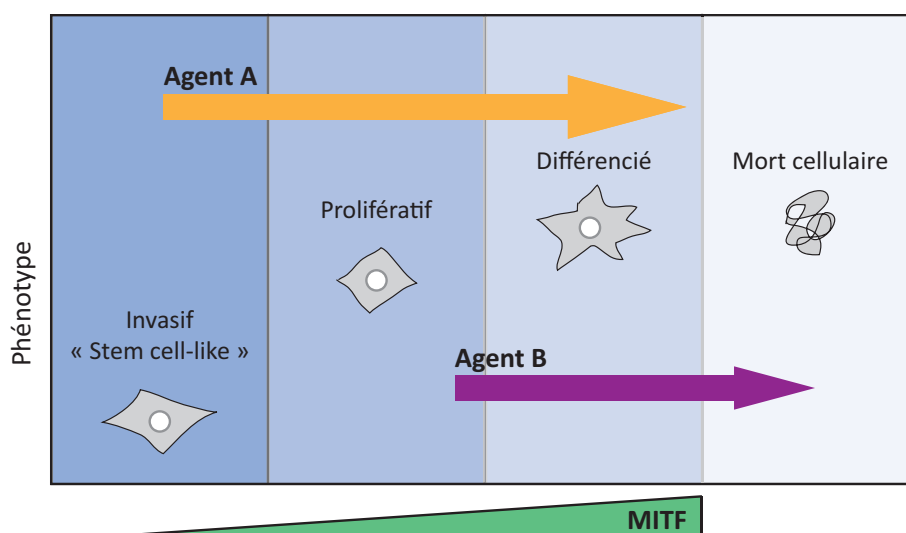


Figure 4 : La « thérapie de la différenciation »

L'utilisation d'un Agent A induit la différenciation de toutes les cellules. Ensuite, un Agent B ciblant spécifiquement les cellules différenciées induit la mort de ces dernières.

Adapté de (Saez-Ayala et al., 2013)

Dans le futur, il serait intéressant d'investiguer la possibilité d'utiliser la répression de l'expression de miR-155 comme « pré-traitement » dans des cellules de mélanome afin de rediriger celles-ci vers un phénotype différencié. Ensuite, l'efficacité d'un traitement secondaire ciblant les cellules en prolifération comme la chimiothérapie, ou les cellules différenciées comme le TMECG, pourrait être étudié. De même, la redirection des cellules vers un phénotype différencié serait bénéfique avant un traitement d'immunothérapie car il permettrait l'apparition d'antigènes de différenciation qui pourraient être reconnus par des CTL anti-tumoraux. Cette étude pourrait se faire dans un modèle murin semblable à celui discuté précédemment ou par l'utilisation d'inhibiteurs de miR-155.

5. Quelles sont les régions promotrices qui pourraient être impliquées dans la répression de la transcription de MITF-M en présence d'IL-1 β ?

Les facteurs de transcription PAX3, SOX10, CREB, BRN-2 et la β -caténine, connus pour réguler la transcription de *MITF-M* ont tous des sites de fixation présents dans les régions promotrices testées. Dès lors, la répression de la transcription induite par l'IL-1 β impliquerait soit des facteurs encore inconnus, soit des régions du gène *MITF* différentes du promoteur classique. Nous avons identifié 3 régions intéressantes du gène *MITF* susceptibles de posséder des sites de fixation qui permettraient de lier des facteurs de transcription régulant l'expression de MITF-M. Nous avons étudié deux de celles-ci en les clonant en aval d'un gène rapporteur mais nous n'avons pas pu mettre en évidence un rôle de ces séquences dans la régulation de *MITF-M*.

La troisième séquence que nous voulions analyser était l'intron 4 complet, une région contenant trois sites de fixation pour le facteur de transcription CTCF. Nous n'avons pas pu obtenir de transfectants stables contenant cette construction dans la lignée de mélanome LB2201-MEL et n'avons donc pas pu analyser l'influence de CTCF sur l'expression de MITF-M en présence d'IL-1 β . CTCF est un facteur de transcription exprimé de manière ubiquitaire qui, une fois lié à une séquence cible, peut attirer de nombreux autres facteurs de transcription favorisant l'activation ou la répression de la transcription (Holwerda and de Laat, 2013). Il pourrait également induire une pause dans la transcription et former des boucles dans la chromatine entre ses différents sites de liaison et, peut-être, avec d'autres facteurs de transcription (Holwerda and de Laat, 2013). Ces boucles pourraient alors faciliter ou empêcher la liaison entre une séquence « enhancer » d'un gène et son promoteur (Holwerda and de Laat, 2013). CTCF régule donc la transcription de plusieurs manières différentes et cette régulation peut impliquer la présence d'autres facteurs de transcription, parfois fixés sur des séquences régulatrices éloignées du site de fixation de CTCF. Dès lors, il est tout à fait possible que notre construction contenant l'intron 4 complet de *MITF-M* en aval d'un gène rapporteur ne puisse pas nous permettre d'impliquer CTCF dans la répression de l'expression de MITF-M en présence d'IL-1 β . Il serait alors plus opportun d'utiliser une méthode de ChIP pour analyser la liaison de CTCF sur ses séquences cibles en présence ou non d'IL-1 β afin de déterminer si ce facteur de transcription peut jouer un rôle dans la régulation de *MITF-M*.

L'identification de la séquence régulatrice impliquée dans la répression de la transcription de *MITF-M* en présence d'IL-1 β reste donc une question majeure à élucider.

Références

- Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J.B., Pereira, J.A., Topilko, P., Muller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., *et al.* (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* 139, 366-379.
- Aksan, I., and Goding, C.R. (1998). Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. *Molecular and cellular biology* 18, 6930-6938.
- Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T cells. *The Journal of investigative dermatology* 126, 32-41.
- Aoki, H., and Moro, O. (2002). Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R). *Life sciences* 71, 2171-2179.
- Apte, R.N., Dotan, S., Elkabets, M., White, M.R., Reich, E., Carmi, Y., Song, X., Dvozkin, T., Krelm, Y., and Voronov, E. (2006). The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer metastasis reviews* 25, 387-408.
- Apte, R.N., and Voronov, E. (2008). Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunological reviews* 222, 222-241.
- Arnheiter, H. (2010). The discovery of the microphthalmia locus and its gene, Mitf. *Pigment cell & melanoma research* 23, 729-735.
- Babar, I.A., Cheng, C.J., Booth, C.J., Liang, X., Weidhaas, J.B., Saltzman, W.M., and Slack, F.J. (2012). Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E1695-1704.
- Bakker, T.R., Reed, D., Renno, T., and Jongeneel, C.V. (1999). Efficient adenoviral transfer of NF-kappaB inhibitor sensitizes melanoma to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 80, 320-323.
- Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S.J., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., *et al.* (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 6199-6206.
- Balkwill, F. (2006). TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer metastasis reviews* 25, 409-416.
- Baud, V., and Karin, M. (2009). Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature reviews Drug discovery* 8, 33-40.
- Baurain, J.F., Colau, D., van Baren, N., Landry, C., Martelange, V., Vikkula, M., Boon, T., and Coulie, P.G. (2000). High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. *Journal of immunology* 164, 6057-6066.
- Bell, R.E., and Levy, C. (2011). The three M's: melanoma, microphthalmia-associated transcription factor and microRNA. *Pigment cell & melanoma research* 24, 1088-1106.
- Bellei, B., Pitisci, A., Catricala, C., Larue, L., and Picardo, M. (2011). Wnt/beta-catenin signaling is stimulated by alpha-melanocyte-stimulating hormone in melanoma and melanocyte cells: implication in cell differentiation. *Pigment cell & melanoma research* 24, 309-325.
- Bemis, L.T., Chen, R., Amato, C.M., Classen, E.H., Robinson, S.E., Coffey, D.G., Erickson, P.F., Shellman, Y.G., and Robinson, W.A. (2008). MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer research* 68, 1362-1368.
- Bennicelli, J.L., Elias, J., Kern, J., and Guerry, D.t. (1989). Production of interleukin 1 activity by cultured human melanoma cells. *Cancer research* 49, 930-935.
- Berlin, I., Denat, L., Steunou, A.L., Puig, I., Champeval, D., Colombo, S., Roberts, K., Bonvin, E., Bourgeois, Y., Davidson, I., *et al.* (2012). Phosphorylation of BRN2 modulates its interaction with the Pax3 promoter to control melanocyte migration and proliferation. *Molecular and cellular biology* 32, 1237-1247.
- Bertolotto, C., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998). Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter

- activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Molecular and cellular biology* 18, 694-702.
- Boel, P., Wildmann, C., Sensi, M.L., Brasseur, R., Renauld, J.C., Coulie, P., Boon, T., and van der Bruggen, P. (1995). BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 2, 167-175.
- Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D.E., Lemort, N., Sock, E., Le Caignec, C., Wegner, M., and Goossens, M. (2000). Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Human molecular genetics* 9, 1907-1917.
- Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. *Annual review of immunology* 24, 175-208.
- Boyle, G.M., Woods, S.L., Bonazzi, V.F., Stark, M.S., Hacker, E., Aoude, L.G., Dutton-Regester, K., Cook, A.L., Sturm, R.A., and Hayward, N.K. (2011). Melanoma cell invasiveness is regulated by miR-211 suppression of the BRN2 transcription factor. *Pigment cell & melanoma research* 24, 525-537.
- Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, P., and Boon, T. (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of experimental medicine* 178, 489-495.
- Busca, R., and Ballotti, R. (2000). Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 13, 60-69.
- Busca, R., Berra, E., Gaggioli, C., Khaled, M., Bille, K., Marchetti, B., Thyss, R., Fitsialos, G., Larribere, L., Bertolotto, C., *et al.* (2005). Hypoxia-inducible factor 1 α is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *The Journal of cell biology* 170, 49-59.
- Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S.A., Galibert, M.D., Denat, L., Larue, L., and Goding, C.R. (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature* 433, 764-769.
- Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K.S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C.R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes & development* 20, 3426-3439.
- Carreira, S., Liu, B., and Goding, C.R. (2000). The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *The Journal of biological chemistry* 275, 21920-21927.
- Ceppi, M., Pereira, P.M., Dunand-Sauthier, I., Barras, E., Reith, W., Santos, M.A., and Pierre, P. (2009). MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2735-2740.
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., and Itano, N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* 6, 1670-1690.
- 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.
- Chen, X., Wang, J., Shen, H., Lu, J., Li, C., Hu, D.N., Dong, X.D., Yan, D., and Tu, L. (2011). Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma. *Investigative ophthalmology & visual science* 52, 1193-1199.
- Chen, Z., Ma, T., Huang, C., Hu, T., and Li, J. (2014). The pivotal role of microRNA-155 in the control of cancer. *Journal of cellular physiology* 229, 545-550.
- Chi, S.W., Hannon, G.J., and Darnell, R.B. (2012). An alternative mode of microRNA target recognition. *Nature structural & molecular biology* 19, 321-327.
- Chiari, R., Foury, F., De Plaen, E., Baurain, J.F., Thonnard, J., and Coulie, P.G. (1999). Two antigens recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a melanoma result from a single point mutation in an essential housekeeping gene. *Cancer research* 59, 5785-5792.

- Chien, A.J., Moore, E.C., Lonsdorf, A.S., Kulikauskas, R.M., Rothberg, B.G., Berger, A.J., Major, M.B., Hwang, S.T., Rimm, D.L., and Moon, R.T. (2009). Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1193-1198.
- Chin, L. (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nature reviews Cancer* 3, 559-570.
- Conde-Perez, A., and Larue, L. (2014). Human relevance of NRAS/BRAF mouse melanoma models. *European journal of cell biology* 93, 82-86.
- Costinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., and Croce, C.M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7024-7029.
- Coulie, P.G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P., *et al.* (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of experimental medicine* 180, 35-42.
- Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* 14, 135-146.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867.
- Das, P.K., van den Wijngaard, R.M., Wankowicz-Kalinska, A., and Le Poole, I.C. (2001). A symbiotic concept of autoimmunity and tumour immunity: lessons from vitiligo. *Trends in immunology* 22, 130-136.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.
- Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., *et al.* (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes & development* 21, 2923-2935.
- Demotte, N., Stroobant, V., Courtoy, P.J., Van Der Smissen, P., Colau, D., Luescher, I.F., Hivroz, C., Nicaise, J., Squifflet, J.L., Mourad, M., *et al.* (2008). Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity* 28, 414-424.
- Denat, L., and Larue, L. (2007). [Malignant melanoma and the role of the paradoxal protein Microphthalmia transcription factor]. *Bulletin du cancer* 94, 81-92.
- Dickson, M.C., Martin, J.S., Cousins, F.M., Kulkarni, A.B., Karlsson, S., and Akhurst, R.J. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121, 1845-1854.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* 8, 793-800.
- Du, J., Miller, A.J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., and Fisher, D.E. (2003). MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *The American journal of pathology* 163, 333-343.
- Du, J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W.E., Nishimura, E.K., Golub, T.R., and Fisher, D.E. (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer cell* 6, 565-576.
- Eggermont, A.M., Spatz, A., and Robert, C. (2014). Cutaneous melanoma. *Lancet* 383, 816-827.

- Eichhoff, O.M., Zipser, M.C., Xu, M., Weeraratna, A.T., Mihic, D., Dummer, R., and Hoek, K.S. (2010). The immunohistochemistry of invasive and proliferative phenotype switching in melanoma: a case report. *Melanoma research* 20, 349-355.
- Elaraj, D.M., Weinreich, D.M., Varghese, S., Puhlmann, M., Hewitt, S.M., Carroll, N.M., Feldman, E.D., Turner, E.M., and Alexander, H.R. (2006). The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 1088-1096.
- Elton, T.S., Selemón, H., Elton, S.M., and Parinandi, N.L. (2013). Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene* 532, 1-12.
- Englaro, W., Bahadoran, P., Bertolotto, C., Busca, R., Derijard, B., Livolsi, A., Peyron, J.F., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1999). Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor kappa B activation. *Oncogene* 18, 1553-1559.
- Fabani, M.M., Abreu-Goodger, C., Williams, D., Lyons, P.A., Torres, A.G., Smith, K.G., Enright, A.J., Gait, M.J., and Vigorito, E. (2010). Efficient inhibition of miR-155 function in vivo by peptide nucleic acids. *Nucleic acids research* 38, 4466-4475.
- Faraoni, I., Antonetti, F.R., Cardone, J., and Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et biophysica acta* 1792, 497-505.
- Felicetti, F., Errico, M.C., Bottero, L., Segnalini, P., Stoppacciaro, A., Biffoni, M., Felli, N., Mattia, G., Petrini, M., Colombo, M.P., *et al.* (2008). The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer research* 68, 2745-2754.
- Gaggioli, C., Busca, R., Abbe, P., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (2003). Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 16, 374-382.
- Gallimore, A., and Godkin, A. (2008). Regulatory T cells and tumour immunity - observations in mice and men. *Immunology* 123, 157-163.
- Garcia-Hernandez, M.L., Hernandez-Pando, R., Gariglio, P., and Berumen, J. (2002). Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology* 105, 231-243.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., and Garrido, F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of cellular physiology* 195, 346-355.
- Garraway, L.A., Widlund, H.R., Rubin, M.A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., Milner, D.A., Granter, S.R., Du, J., *et al.* (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436, 117-122.
- Gembarska, A., Luciani, F., Fedele, C., Russell, E.A., Dewaele, M., Villar, S., Zwolinska, A., Haupt, S., de Lange, J., Yip, D., *et al.* (2012). MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nature medicine* 18, 1239-1247.
- Georgantas, R.W., 3rd, Hildreth, R., Morisot, S., Alder, J., Liu, C.G., Heimfeld, S., Calin, G.A., Croce, C.M., and Civin, C.I. (2007). CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2750-2755.
- Germeau, C., Ma, W., Schiavetti, F., Lurquin, C., Henry, E., Vigneron, N., Brasseur, F., Lethe, B., De Plaen, E., Velu, T., *et al.* (2005). High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *The Journal of experimental medicine* 201, 241-248.
- Giebel, L.B., and Spritz, R.A. (1991). Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 8696-8699.
- Gleason, B.C., Crum, C.P., and Murphy, G.F. (2008). Expression patterns of MITF during human cutaneous embryogenesis: evidence for bulge epithelial expression and persistence of dermal melanoblasts. *Journal of cutaneous pathology* 35, 615-622.

- Goel, V.K., Lazar, A.J., Warneke, C.L., Redston, M.S., and Haluska, F.G. (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 126, 154-160.
- Goodall, J., Carreira, S., Denat, L., Kobi, D., Davidson, I., Nuciforo, P., Sturm, R.A., Larue, L., and Goding, C.R. (2008). Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer research* 68, 7788-7794.
- Gordon, M.D., and Nusse, R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 281, 22429-22433.
- Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nature medicine* 7, 1118-1122.
- Goswami, S., Tarapore, R.S., Teslaa, J.J., Grinblat, Y., Setaluri, V., and Spiegelman, V.S. (2010). MicroRNA-340-mediated degradation of microphthalmia-associated transcription factor mRNA is inhibited by the coding region determinant-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 285, 20532-20540.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.
- Guo, J., Zhang, J.F., Wang, W.M., Cheung, F.W., Lu, Y.F., Ng, C.F., Kung, H.F., and Liu, W.K. (2014). MicroRNA-218 inhibits melanogenesis by directly suppressing microphthalmia-associated transcription factor expression. *RNA biology* 11, 732-741.
- Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 509-524.
- Haflidadottir, B.S., Bergsteinsdottir, K., Praetorius, C., and Steingrimsen, E. (2010). miR-148 regulates Mitf in melanoma cells. *PloS one* 5, e11574.
- Harlin, H., Kuna, T.V., Peterson, A.C., Meng, Y., and Gajewski, T.F. (2006). Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 55, 1185-1197.
- Hemesath, T.J., Steingrimsen, E., McGill, G., Hansen, M.J., Vaught, J., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Fisher, D.E. (1994). microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes & development* 8, 2770-2780.
- Hernandez, J.M., Floyd, D.H., Weilbaecher, K.N., Green, P.L., and Boris-Lawrie, K. (2008). Multiple facets of junD gene expression are atypical among AP-1 family members. *Oncogene* 27, 4757-4767.
- Heusinkveld, M., and van der Burg, S.H. (2011). Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *Journal of translational medicine* 9, 216.
- Hino, R., Kabashima, K., Kato, Y., Yagi, H., Nakamura, M., Honjo, T., Okazaki, T., and Tokura, Y. (2010). Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 116, 1757-1766.
- Hoashi, T., Watabe, H., Muller, J., Yamaguchi, Y., Vieira, W.D., and Hearing, V.J. (2005). MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *The Journal of biological chemistry* 280, 14006-14016.
- Hodge, D.R., Hurt, E.M., and Farrar, W.L. (2005). The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European journal of cancer* 41, 2502-2512.
- Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., Steingrimsen, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74, 395-404.
- Hoek, K.S., Eichhoff, O.M., Schlegel, N.C., Dobbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., and Dummer, R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer research* 68, 650-656.
- Hoek, K.S., and Goding, C.R. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 23, 746-759.

- Hoek, K.S., Schlegel, N.C., Brafford, P., Sucker, A., Ugurel, S., Kumar, R., Weber, B.L., Nathanson, K.L., Phillips, D.J., Herlyn, M., *et al.* (2006). Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 19, 290-302.
- Holwerda, S.J., and de Laat, W. (2013). CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 368, 20120369.
- Hou, L., and Pavan, W.J. (2008). Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? *Cell research* 18, 1163-1176.
- Hsiao, J.J., and Fisher, D.E. (2014). The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. *Archives of biochemistry and biophysics* 563C, 28-34.
- Huang, S., Robinson, J.B., Deguzman, A., Bucana, C.D., and Fidler, I.J. (2000). Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer research* 60, 5334-5339.
- Huber, M.A., Azoitei, N., Baumann, B., Grunert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *The Journal of clinical investigation* 114, 569-581.
- Huber, W.E., Price, E.R., Widlund, H.R., Du, J., Davis, I.J., Wegner, M., and Fisher, D.E. (2003). A tissue-restricted cAMP transcriptional response: SOX10 modulates alpha-melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *The Journal of biological chemistry* 278, 45224-45230.
- Huijbers, I.J., Krimpenfort, P., Chomez, P., van der Valk, M.A., Song, J.Y., Inderberg-Suso, E.M., Schmitt-Verhulst, A.M., Berns, A., and Van den Eynde, B.J. (2006). An inducible mouse model of melanoma expressing a defined tumor antigen. *Cancer research* 66, 3278-3286.
- Hung, C.F., Wu, T.C., Monie, A., and Roden, R. (2008). Antigen-specific immunotherapy of cervical and ovarian cancer. *Immunological reviews* 222, 43-69.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews Genetics* 12, 99-110.
- Jacquemin, P., Lannoy, V.J., O'Sullivan, J., Read, A., Lemaigre, F.P., and Rousseau, G.G. (2001). The transcription factor onecut-2 controls the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochemical and biophysical research communications* 285, 1200-1205.
- Jiang, S., Zhang, H.W., Lu, M.H., He, X.H., Li, Y., Gu, H., Liu, M.F., and Wang, E.D. (2010). MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer research* 70, 3119-3127.
- Jin, E.J., Erickson, C.A., Takada, S., and Burrus, L.W. (2001). Wnt and BMP signaling govern lineage segregation of melanocytes in the avian embryo. *Developmental biology* 233, 22-37.
- Johnson, S.L., Nguyen, A.N., and Lister, J.A. (2011). mitfa is required at multiple stages of melanocyte differentiation but not to establish the melanocyte stem cell. *Developmental biology* 350, 405-413.
- Kageshita, T., Ishihara, T., Campoli, M., and Ferrone, S. (2005). Selective monomorphic and polymorphic HLA class I antigenic determinant loss in surgically removed melanoma lesions. *Tissue antigens* 65, 419-428.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.
- Khaled, M., Larribere, L., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J.P., Ballotti, R., and Bertolotto, C. (2002). Glycogen synthase kinase 3beta is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *The Journal of biological chemistry* 277, 33690-33697.
- Kholmanskikh, O., van Baren, N., Brasseur, F., Ottaviani, S., Vanacker, J., Arts, N., van der Bruggen, P., Coulie, P., and De Plaen, E. (2010). Interleukins 1alpha and 1beta secreted by some melanoma

- cell lines strongly reduce expression of MITF-M and melanocyte differentiation antigens. *International journal of cancer Journal international du cancer* **127**, 1625-1636.
- Khong, H.T., Wang, Q.J., and Rosenberg, S.A. (2004). Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *Journal of immunotherapy* **27**, 184-190.
- Kim, N.H., Choi, S.H., Kim, C.H., Lee, C.H., Lee, T.R., and Lee, A.Y. (2014). Reduced MiR-675 in exosome in H19 RNA-related melanogenesis via MITF as a direct target. *The Journal of investigative dermatology* **134**, 1075-1082.
- Komohara, Y., Jinushi, M., and Takeya, M. (2014). Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer science* **105**, 1-8.
- Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J.J., Coppola, D., Dalton, W.S., and Cheng, J.Q. (2008). MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Molecular and cellular biology* **28**, 6773-6784.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews Genetics* **11**, 597-610.
- Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* **438**, 685-689.
- Kuang, D.M., Zhao, Q., Peng, C., Xu, J., Zhang, J.P., Wu, C., and Zheng, L. (2009). Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *The Journal of experimental medicine* **206**, 1327-1337.
- Kumasaka, M., Sato, S., Yajima, I., Goding, C.R., and Yamamoto, H. (2005). Regulation of melanoblast and retinal pigment epithelium development by *Xenopus laevis* Mitf. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **234**, 523-534.
- Kuphal, S., and Bosserhoff, A.K. (2006). Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene* **25**, 248-259.
- Kuwana, M. (2002). Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Human immunology* **63**, 1156-1163.
- Lahav, R., Lecoin, L., Ziller, C., Nataf, V., Carnahan, J.F., Martin, F.H., and Le Douarin, N.M. (1994). Effect of the Steel gene product on melanogenesis in avian neural crest cell cultures. *Differentiation; research in biological diversity* **58**, 133-139.
- Landsberg, J., Kohlmeyer, J., Renn, M., Bald, T., Rogava, M., Cron, M., Fatho, M., Lennerz, V., Wolfel, T., Holzel, M., *et al.* (2012). Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* **490**, 412-416.
- Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., and Hermoso, M.A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of immunology research* **2014**, 149185.
- Le Poole, I.C., Riker, A.I., Quevedo, M.E., Stennett, L.S., Wang, E., Marincola, F.M., Kast, W.M., Robinson, J.K., and Nickoloff, B.J. (2002). Interferon-gamma reduces melanosomal antigen expression and recognition of melanoma cells by cytotoxic T cells. *The American journal of pathology* **160**, 521-528.
- Lee, Y.N., Brandal, S., Noel, P., Wentzel, E., Mendell, J.T., McDevitt, M.A., Kapur, R., Carter, M., Metcalfe, D.D., and Takemoto, C.M. (2011). KIT signaling regulates MITF expression through miRNAs in normal and malignant mast cell proliferation. *Blood* **117**, 3629-3640.
- Lennox, K.A., and Behlke, M.A. (2011). Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene therapy* **18**, 1111-1120.
- Lethe, B., Lucas, S., Michaux, L., De Smet, C., Godelaine, D., Serrano, A., De Plaen, E., and Boon, T. (1998). LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *International journal of cancer Journal international du cancer* **76**, 903-908.
- Letsch, A., Keilholz, U., Schadendorf, D., Nagorsen, D., Schmittel, A., Thiel, E., and Scheibenbogen, C. (2000). High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* **87**, 659-664.

- Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in molecular medicine* 12, 406-414.
- Levy, C., Khaled, M., Robinson, K.C., Veguilla, R.A., Chen, P.H., Yokoyama, S., Makino, E., Lu, J., Larue, L., Beermann, F., *et al.* (2010). Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes. *Cell* 141, 994-1005.
- Levy, C., Sonnenblick, A., and Razin, E. (2003). Role played by microphthalmia transcription factor phosphorylation and its Zip domain in its transcriptional inhibition by PIAS3. *Molecular and cellular biology* 23, 9073-9080.
- Lewis, A.M., Varghese, S., Xu, H., and Alexander, H.R. (2006). Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of translational medicine* 4, 48.
- Linnstaedt, S.D., Gottwein, E., Skalsky, R.L., Luftig, M.A., and Cullen, B.R. (2010). Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus. *Journal of virology* 84, 11670-11678.
- Lister, J.A., Capper, A., Zeng, Z., Mathers, M.E., Richardson, J., Paranthaman, K., Jackson, I.J., and Patton, E.E. (2014). A conditional zebrafish MITF mutation reveals MITF levels are critical for melanoma promotion vs. regression in vivo. *The Journal of investigative dermatology* 134, 133-140.
- Liu, G., Zhang, F., Lee, J., and Dong, Z. (2005). Selective induction of interleukin-8 expression in metastatic melanoma cells by transforming growth factor-beta 1. *Cytokine* 31, 241-249.
- Loercher, A.E., Tank, E.M., Delston, R.B., and Harbour, J.W. (2005). MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *The Journal of cell biology* 168, 35-40.
- Ludwig, A., Rehberg, S., and Wegner, M. (2004). Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the Sox10 and Mitf transcription factors. *FEBS letters* 556, 236-244.
- Luo, C., Merz, P.R., Chen, Y., Dickes, E., Pscherer, A., Schadendorf, D., and Eichmüller, S.B. (2013a). MiR-101 inhibits melanoma cell invasion and proliferation by targeting MITF and EZH2. *Cancer letters* 341, 240-247.
- Luo, C., Tetteh, P.W., Merz, P.R., Dickes, E., Abukiwan, A., Hotz-Wagenblatt, A., Holland-Cunz, S., Sinnberg, T., Schitteck, B., Schadendorf, D., *et al.* (2013b). miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes. *The Journal of investigative dermatology* 133, 768-775.
- Luo, J.L., Maeda, S., Hsu, L.C., Yagita, H., and Karin, M. (2004). Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer cell* 6, 297-305.
- Lurquin, C., Lethe, B., De Plaen, E., Corbiere, V., Theate, I., van Baren, N., Coulie, P.G., and Boon, T. (2005). Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. *The Journal of experimental medicine* 201, 249-257.
- Madonna, G., Ullman, C.D., Gentilcore, G., Palmieri, G., and Ascierto, P.A. (2012). NF-kappaB as potential target in the treatment of melanoma. *Journal of translational medicine* 10, 53.
- Majoros, W.H., and Ohler, U. (2007). Spatial preferences of microRNA targets in 3' untranslated regions. *BMC genomics* 8, 152.
- Mann, M., Barad, O., Agami, R., Geiger, B., and Hornstein, E. (2010). miRNA-based mechanism for the commitment of multipotent progenitors to a single cellular fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15804-15809.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.
- Margue, C., Philippidou, D., Reinsbach, S.E., Schmitt, M., Behrmann, I., and Kreis, S. (2013). New target genes of MITF-induced microRNA-211 contribute to melanoma cell invasion. *PLoS one* 8, e73473.

- Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Beermann, F., Aparicio, P., Lozano, J.A., and Garcia-Borron, J.C. (1997). Transforming growth factor-beta1 inhibits basal melanogenesis in B16/F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1. *The Journal of biological chemistry* 272, 3967-3972.
- Masaki, S., Ohtsuka, R., Abe, Y., Muta, K., and Umemura, T. (2007). Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochemical and biophysical research communications* 364, 509-514.
- Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-230.
- Mattei, S., Colombo, M.P., Melani, C., Silvani, A., Parmiani, G., and Herlyn, M. (1994). Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *International journal of cancer Journal international du cancer* 56, 853-857.
- Mazzocchi, A., Belli, F., Mascheroni, L., Vegetti, C., Parmiani, G., and Anichini, A. (1994). Frequency of cytotoxic T lymphocyte precursors (CTLp) interacting with autologous tumor via the T-cell receptor: limiting dilution analysis of specific CTLp in peripheral blood and tumor-invaded lymph nodes of melanoma patients. *International journal of cancer Journal international du cancer* 58, 330-339.
- McCarter, M.D., Baumgartner, J., Escobar, G.A., Richter, D., Lewis, K., Robinson, W., Wilson, C., Palmer, B.E., and Gonzalez, R. (2007). Immunosuppressive dendritic and regulatory T cells are upregulated in melanoma patients. *Annals of surgical oncology* 14, 2854-2860.
- McGill, G.G., Haq, R., Nishimura, E.K., and Fisher, D.E. (2006). c-Met expression is regulated by Mitf in the melanocyte lineage. *The Journal of biological chemistry* 281, 10365-10373.
- McGill, G.G., Horstmann, M., Widlund, H.R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E.K., Lin, Y.L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H.F., *et al.* (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 109, 707-718.
- Miller, A.J., Levy, C., Davis, I.J., Razin, E., and Fisher, D.E. (2005). Sumoylation of MITF and its related family members TFE3 and TFEB. *The Journal of biological chemistry* 280, 146-155.
- Moretti, S., Pinzi, C., Spallanzani, A., Berti, E., Chiarugi, A., Mazzoli, S., Fabiani, M., Vallecchi, C., and Herlyn, M. (1999). Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *International journal of cancer Journal international du cancer* 84, 160-168.
- Murakami, H., and Arnheiter, H. (2005). Sumoylation modulates transcriptional activity of MITF in a promoter-specific manner. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 18, 265-277.
- Murakami, M., Iwata, Y., and Funaba, M. (2007). Expression and transcriptional activity of alternative splice variants of Mitf exon 6. *Molecular and cellular biochemistry* 303, 251-257.
- Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Marincola, F.M., Letsch, A., and Keilholz, U. (2003). Natural T cell immunity against cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 4296-4303.
- Naugler, W.E., and Karin, M. (2008). NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Current opinion in genetics & development* 18, 19-26.
- Nishimura, E.K., Granter, S.R., and Fisher, D.E. (2005). Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307, 720-724.
- Nishimura, E.K., Jordan, S.A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I.J., Barrandon, Y., Miyachi, Y., and Nishikawa, S. (2002). Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416, 854-860.
- Niu, G., Bowman, T., Huang, M., Shivers, S., Reintgen, D., Daud, A., Chang, A., Kraker, A., Jove, R., and Yu, H. (2002). Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 21, 7001-7010.
- Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R., and Yu, H. (1999). Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer research* 59, 5059-5063.

- Oble, D.A., Loewe, R., Yu, P., and Mihm, M.C., Jr. (2009). Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer immunity* 9, 3.
- Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M.T., Hodgkinson, C.A., Pavan, W.J., and Arnheiter, H. (1997). Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development* 124, 2377-2386.
- Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *Journal of immunology* 182, 4499-4506.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Perrot, C.Y., Javelaud, D., and Mauviel, A. (2013). Insights into the Transforming Growth Factor-beta Signaling Pathway in Cutaneous Melanoma. *Annals of dermatology* 25, 135-144.
- Pilotte, L., Larrieu, P., Stroobant, V., Colau, D., Dolusic, E., Frederick, R., De Plaen, E., Uyttenhove, C., Wouters, J., Masereel, B., *et al.* (2012). Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 2497-2502.
- Pingault, V., Ente, D., Dastot-Le Moal, F., Goossens, M., Marlin, S., and Bondurand, N. (2010). Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Human mutation* 31, 391-406.
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., *et al.* (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics* 33, 19-20.
- Primot, A., Mogha, A., Corre, S., Roberts, K., Debbache, J., Adamski, H., Dreno, B., Khammari, A., Lesimple, T., Mereau, A., *et al.* (2010). ERK-regulated differential expression of the Mitf 6a/b splicing isoforms in melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 23, 93-102.
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51.
- Quaglino, P., Marengo, F., Osella-Abate, S., Cappello, N., Ortoncelli, M., Salomone, B., Fierro, M.T., Savoia, P., and Bernengo, M.G. (2010). Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21, 409-414.
- Ramirez-Montagut, T., Turk, M.J., Wolchok, J.D., Guevara-Patino, J.A., and Houghton, A.N. (2003). Immunity to melanoma: unraveling the relation of tumor immunity and autoimmunity. *Oncogene* 22, 3180-3187.
- Ratliff, M.L., Templeton, T.D., Ward, J.M., and Webb, C.F. (2014). The Bright Side of Hematopoiesis: Regulatory Roles of ARID3a/Bright in Human and Mouse Hematopoiesis. *Frontiers in immunology* 5, 113.
- Rayet, B., and Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18, 6938-6947.
- Read, A.P., and Newton, V.E. (1997). Waardenburg syndrome. *Journal of medical genetics* 34, 656-665.
- Rimm, D.L., Caca, K., Hu, G., Harrison, F.B., and Fearon, E.R. (1999). Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *The American journal of pathology* 154, 325-329.
- Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 183, 1185-1192.
- Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M.V., Couttet, P., Soond, D.R., van Dongen, S., Grocock, R.J., Das, P.P., Miska, E.A., *et al.* (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316, 608-611.
- Romero, P., Valmori, D., Pittet, M.J., Zippelius, A., Rimoldi, D., Levy, F., Dutoit, V., Ayyoub, M., Rubio-Godoy, V., Michielin, O., *et al.* (2002). Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1

- derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunological reviews* 188, 81-96.
- Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N.W., Toscano, M.A., Iltis, J.M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O.L., and Rabinovich, G.A. (2004). Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer cell* 5, 241-251.
- Ryu, B., Kim, D.S., Deluca, A.M., and Alani, R.M. (2007). Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. *PloS one* 2, e594.
- Sabat, R., Grutz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., and Geginat, J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine & growth factor reviews* 21, 331-344.
- Saez-Ayala, M., Montenegro, M.F., Sanchez-Del-Campo, L., Fernandez-Perez, M.P., Chazarra, S., Freter, R., Middleton, M., Pinero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Goding, C.R., *et al.* (2013). Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy. *Cancer cell* 24, 105-119.
- Schepsky, A., Bruser, K., Gunnarsson, G.J., Goodall, J., Hallsson, J.H., Goding, C.R., Steingrimsdottir, E., and Hecht, A. (2006). The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression. *Molecular and cellular biology* 26, 8914-8927.
- Schirbel, A., and Fiocchi, C. (2010). Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *Journal of digestive diseases* 11, 266-276.
- Schmid, M.C., and Varner, J.A. (2010). Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *Journal of oncology* 2010, 201026.
- Schottelius, A.J., Mayo, M.W., Sartor, R.B., and Baldwin, A.S., Jr. (1999). Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *The Journal of biological chemistry* 274, 31868-31874.
- Segura, M.F., Hanniford, D., Menendez, S., Reavie, L., Zou, X., Alvarez-Diaz, S., Zakrzewski, J., Blochin, E., Rose, A., Bogunovic, D., *et al.* (2009). Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1814-1819.
- Shahlaee, A.H., Brandal, S., Lee, Y.N., Jie, C., and Takemoto, C.M. (2007). Distinct and shared transcriptomes are regulated by microphthalmia-associated transcription factor isoforms in mast cells. *Journal of immunology* 178, 378-388.
- Shibahara, S., Takeda, K., Yasumoto, K., Udono, T., Watanabe, K., Saito, H., and Takahashi, K. (2001). Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 6, 99-104.
- Shirley, S.H., Greene, V.R., Duncan, L.M., Torres Cabala, C.A., Grimm, E.A., and Kusewitt, D.F. (2012). Slug expression during melanoma progression. *The American journal of pathology* 180, 2479-2489.
- Silver, D.L., Hou, L., and Pavan, W.J. (2006). The genetic regulation of pigment cell development. *Advances in experimental medicine and biology* 589, 155-169.
- Siomi, H., and Siomi, M.C. (2010). Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular cell* 38, 323-332.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., *et al.* (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.
- Smith, S.D., Kelley, P.M., Kenyon, J.B., and Hoover, D. (2000). Tietz syndrome (hypopigmentation/deafness) caused by mutation of MITF. *Journal of medical genetics* 37, 446-448.
- Soudja, S.M., Wehbe, M., Mas, A., Chasson, L., de Tenbossche, C.P., Huijbers, I., Van den Eynde, B., and Schmitt-Verhulst, A.M. (2010). Tumor-initiated inflammation overrides protective adaptive immunity in an induced melanoma model in mice. *Cancer research* 70, 3515-3525.

- Sparmann, A., and Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer cell* 6, 447-458.
- Spira, A.I., and Carducci, M.A. (2003). Differentiation therapy. *Current opinion in pharmacology* 3, 338-343.
- Stanczyk, J., Pedrioli, D.M., Brentano, F., Sanchez-Pernaute, O., Kolling, C., Gay, R.E., Detmar, M., Gay, S., and Kyburz, D. (2008). Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 58, 1001-1009.
- Stark, M.S., Tyagi, S., Nancarrow, D.J., Boyle, G.M., Cook, A.L., Whiteman, D.C., Parsons, P.G., Schmidt, C., Sturm, R.A., and Hayward, N.K. (2010). Characterization of the Melanoma miRNAome by Deep Sequencing. *PloS one* 5, e9685.
- Steingrimsson, E., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annual review of genetics* 38, 365-411.
- Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K., and Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *Journal of immunology* 175, 342-349.
- Sumimoto, H., Imabayashi, F., Iwata, T., and Kawakami, Y. (2006). The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 1651-1656.
- Tachibana, M. (2001). Cochlear melanocytes and MITF signaling. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 6, 95-98.
- Takeda, K., Yasumoto, K., Takada, R., Takada, S., Watanabe, K., Udono, T., Saito, H., Takahashi, K., and Shibahara, S. (2000). Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *The Journal of biological chemistry* 275, 14013-14016.
- Takemoto, C.M., Yoon, Y.J., and Fisher, D.E. (2002). The identification and functional characterization of a novel mast cell isoform of the microphthalmia-associated transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 277, 30244-30252.
- Thingnes, J., Lavelle, T.J., Gjuvsland, A.B., Omholt, S.W., and Hovig, E. (2012). Towards a quantitative understanding of the MITF-PIAS3-STAT3 connection. *BMC systems biology* 6, 11.
- Thomas, A.J., and Erickson, C.A. (2008). The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment cell & melanoma research* 21, 598-610.
- Thomas, A.J., and Erickson, C.A. (2009). FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. *Development* 136, 1849-1858.
- Thomas, M., Lieberman, J., and Lal, A. (2010). Desperately seeking microRNA targets. *Nature structural & molecular biology* 17, 1169-1174.
- Tili, E., Michaille, J.J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C.D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C.G., Calin, G.A., *et al.* (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *Journal of immunology* 179, 5082-5089.
- Tjin, E.P., Krebbers, G., Meijlink, K.J., van de Kastelee, W., Rosenberg, E.H., Sanders, J., Nederlof, P.M., van de Wiel, B.A., Haanen, J.B., Melief, C.J., *et al.* (2014). Immune-escape markers in relation to clinical outcome of advanced melanoma patients following immunotherapy. *Cancer immunology research* 2, 538-546.
- Torisu, H., Ono, M., Kiryu, H., Furue, M., Ohmoto, Y., Nakayama, J., Nishioka, Y., Sone, S., and Kuwano, M. (2000). Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *International journal of cancer Journal international du cancer* 85, 182-188.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature medicine* 9, 1269-1274.

- Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S., and Boon, T. (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *The Journal of experimental medicine* 182, 689-698.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- van Oijen, M., Bins, A., Elias, S., Sein, J., Weder, P., de Gast, G., Mallo, H., Gallee, M., Van Tinteren, H., Schumacher, T., *et al.* (2004). On the role of melanoma-specific CD8+ T-cell immunity in disease progression of advanced-stage melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 4754-4760.
- Vance, K.W., Carreira, S., Brosch, G., and Goding, C.R. (2005). Tbx2 is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. *Cancer research* 65, 2260-2268.
- Vidal-Vanaclocha, F., Fantuzzi, G., Mendoza, L., Fuentes, A.M., Anasagasti, M.J., Martin, J., Carrascal, T., Walsh, P., Reznikov, L.L., Kim, S.H., *et al.* (2000). IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 734-739.
- Voelter, V., Pica, A., Laurent, J., Rimoldi, D., Bouzourene, H., Sajadi, A., Matter, M., Romero, P., Rufer, N., and Speiser, D.E. (2008). An unusual case of metastatic melanoma sensitive to chemotherapy and immunotherapy, with late immune escape in the brain. *Cancer immunity* 8, 6.
- Voronov, E., Shouval, D.S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2645-2650.
- Wang, B., Majumder, S., Nuovo, G., Kutay, H., Volinia, S., Patel, T., Schmittgen, T.D., Croce, C., Ghoshal, K., and Jacob, S.T. (2009). Role of microRNA-155 at early stages of hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient and amino acid-defined diet in C57BL/6 mice. *Hepatology* 50, 1152-1161.
- Watanabe, K., Takeda, K., Yasumoto, K., Udono, T., Saito, H., Ikeda, K., Takasaka, T., Takahashi, K., Kobayashi, T., Tachibana, M., *et al.* (2002). Identification of a distal enhancer for the melanocyte-specific promoter of the MITF gene. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 15, 201-211.
- Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science signaling* 3, cm1.
- Wehbe, M., Soudja, S.M., Mas, A., Chasson, L., Guinamard, R., de Tenbossche, C.P., Verdeil, G., Van den Eynde, B., and Schmitt-Verhulst, A.M. (2012). Epithelial-mesenchymal-transition-like and TGFbeta pathways associated with autochthonous inflammatory melanoma development in mice. *PloS one* 7, e49419.
- Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., and Marais, R. (2008). Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PloS one* 3, e2734.
- Wu, L., and Belasco, J.G. (2008). Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell* 29, 1-7.
- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4034-4039.
- Wu, M., Hemesath, T.J., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Price, E.R., Fisher, D.Z., and Fisher, D.E. (2000). c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes & development* 14, 301-312.
- Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer research* 64, 7022-7029.

- Xiao, C., and Rajewsky, K. (2009). MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 136, 26-36.
- Xu, S., Witmer, P.D., Lumayag, S., Kovacs, B., and Valle, D. (2007). MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *The Journal of biological chemistry* 282, 25053-25066.
- Yang, C.H., Yue, J., Pfeffer, S.R., Handorf, C.R., and Pfeffer, L.M. (2011). MicroRNA miR-21 regulates the metastatic behavior of B16 melanoma cells. *The Journal of biological chemistry* 286, 39172-39178.
- Yang, J., Pan, W.H., Clawson, G.A., and Richmond, A. (2007). Systemic targeting inhibitor of kappaB kinase inhibits melanoma tumor growth. *Cancer research* 67, 3127-3134.
- Yasumoto, K., Amae, S., Udon, T., Fuse, N., Takeda, K., and Shibahara, S. (1998). A big gene linked to small eyes encodes multiple Mitf isoforms: many promoters make light work. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 11, 329-336.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. (1994). Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Molecular and cellular biology* 14, 8058-8070.
- Yokoyama, S., Feige, E., Poling, L.L., Levy, C., Widlund, H.R., Khaled, M., Kung, A.L., and Fisher, D.E. (2008). Pharmacologic suppression of MITF expression via HDAC inhibitors in the melanocyte lineage. *Pigment cell & melanoma research* 21, 457-463.
- Zaidi, M.R., Day, C.P., and Merlino, G. (2008). From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *The Journal of investigative dermatology* 128, 2381-2391.
- Zarour, H., De Smet, C., Lehmann, F., Marchand, M., Lethe, B., Romero, P., Boon, T., and Renauld, J.C. (1996). The majority of autologous cytolytic T-lymphocyte clones derived from peripheral blood lymphocytes of a melanoma patient recognize an antigenic peptide derived from gene Pmel17/gp100. *The Journal of investigative dermatology* 107, 63-67.
- Zhao, H., Li, Y., Wang, S., Yang, Y., Wang, J., Ruan, X., Yang, Y., Cai, K., Zhang, B., Cui, P., *et al.* (2014). Whole transcriptome RNA-seq analysis: tumorigenesis and metastasis of melanoma. *Gene* 548, 234-243.
- Zhu, Z., He, J., Jia, X., Jiang, J., Bai, R., Yu, X., Lv, L., Fan, R., He, X., Geng, J., *et al.* (2010). MicroRNA-25 functions in regulation of pigmentation by targeting the transcription factor MITF in Alpaca (*Lama pacos*) skin melanocytes. *Domestic animal endocrinology* 38, 200-209.