Biologie Aujourd'hui, 210 (4), 283-295 (2016)
© Société de Biologie, 2017
DOI: 10.1051/jbio/2016028

Régulation épigénétique de l'expression génique dans le mélanome malin

Patrick Laurette, Dana Koludrovic, Sebastien Coassolo et Irwin Davidson

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France

Auteur correspondant : Irwin Davidson, irwin@igbmc.fr

Reçu le 9 décembre 2016

Résumé – Le mélanome malin est un cancer très agressif capable de générer des métastases à des stades précoces de son développement. La transformation oncogénique des mélanocytes résulte principalement de mutations dans BRAF, NRAS ou NF1 qui activent de façon constitutive la voie de signalisation des MAP kinases et la prolifération cellulaire. D'autres mutations inactivant CDKN2A ou PTEN, des mutations activatrices dans la voie béta-caténine ainsi que des altérations de l'épigénome permettent aux cellules d'échapper à la sénescence induite par les oncogènes. Quelle que soit la nature des mutations activatrices, la physiologie des cellules de mélanome est régulée par des facteurs de transcription et des mécanismes épigénétiques. MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) et SOX10 sont deux facteurs de transcription jouant également un rôle essentiel dans la physiologie des mélanocytes normaux. Par une combinaison d'approches incluant la génétique de la souris, la biochimie et la génomique à haut débit, nous avons identifié des protéines partenaires de MITF et analysé les mécanismes de régulation de la transcription par MITF, SOX10 et leurs partenaires.

Mots clés : MITF / SOX10 / PBAF / NuRF / remodelage de la chromatine

Abstract – Epigenetic regulation of gene expression in malignant melanoma.

Malignant melanoma is a highly aggressive cancer with a propensity for early metastasis. Melanocyte transformation results predominantly from oncogenic mutations in BRAF, NRAS or NF1 leading to constitutive activation of the MAP kinase pathway driving cell proliferation and second site mutations such as loss of CDKN1A, or PTEN or activating mutations in the beta-catenin pathway that allow escape from oncogene induced senescence. Nevertheless, irrespective of the nature of the driver mutations, melanoma cell physiology is strongly regulated by transcription factors and epigenetic mechanisms. MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor) and SOX10 are two major transcription factors that regulate both normal melanocyte and melanoma cell physiology. Using a combination of mouse genetics, biochemistry and high throughput genomics we have identified cofactors for MITF and addressed the mechanisms by which MITF, SOX10 and their cofactors regulate gene expression in melanocytes and melanoma.

Key words: MITF / SOX10 / PBAF / NuRF / chromatin remodelling

Article publié par EDP Sciences

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
bHLH-ZIP	Basique hélice-boucle-hélice-glissière à leucine
BPTF	Facteur de transcription comportant des domaines Bromo et PHD *(Bromo and PHD domain containing transcription factor)*
BRG1	Gène apparenté à Brahma *(Brahma related gene 1)*
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine.
Flag-HA	Flag and HA *(hemagglutinin)* epitopes
GSEA	Analyse d'enrichissement des groupes de gènes *(Gene set enrichment analyses)*
LacZ	Beta galactosidase
MAP-kinase	Protéine kinase activée par des mitogènes (*Mitogen activated protein kinase)*
McSC	*Melanocyte Stem Cell*
MITF	(*MIcrophthalmia-associated Transcription Factor*)
NuRD	Complexe de remodelage et de désacétylation des nucléosomes *(Nucleosome remodeling deacetylase complex)*
NuRF	remodeling
PBAF	Complexe de remodelage polybromo associé à Brahma *(Polybromo-containing Brahma-associated factor),*
SASP	Phénotype sécrétoire associé à la sénescence *(Senescence-associated secretory phenotype)*
si/shARN	Acide ribonucléique interférant court/en épingle à cheveux
TAC	Cellules en prolifération transitoire *(Transient amplifying cells)*
UV	Lumière ultraviolette
XGal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-béta-D-galactopyranoside

Introduction

Le mélanome est une tumeur maligne dérivée des mélanocytes qui se développe principalement dans la peau. Elle est très agressive, avec un fort potentiel métastatique et responsable de plus de 90 % des décès liés aux tumeurs cutanées. L'incidence est en constante augmentation dans les populations européennes en raison des modifications du mode de vie et de l'augmentation de l'exposition aux UV. En Europe, le taux d'incidence du mélanome est de 10 à 20/100000 habitants (Ferlay *et al.*, 2013). Les personnes ayant un grand nombre de nævi et un phototype clair présentent un risque accru de développer un mélanome. Les mélanomes surviennent principalement *de novo* à la suite de mutations somatiques, seuls 5 à 10 % des mélanomes ont une origine génétique à caractère héréditaire. En plus des facteurs constitutionnels et génétiques, le facteur de risque de mélanome le plus important est la surexposition aux UV principalement pendant l'enfance (Forsea *et al.*, 2012 ; Garbe *et al.*, 2012). 90 % des mélanomes sont diagnostiqués au stade primaire sans lésion métastatique. Par la suite, des métastases locales, ganglionnaires puis à distance peuvent survenir, modifiant drastiquement le pronostic. Au stade non métastatique, la survie à 10 ans est de 75 à 85 % alors que la survie n'est plus que de 6 à 9 mois au stade métastatique. Le traitement de référence au stade primaire est la chirurgie. Pour les stades métastatiques, le développement des thérapies ciblées et de l'immunothérapie ont permis d'allonger la survie globale (Forsea *et al.*, 2012 ; Garbe *et al.*, 2012).

Plusieurs mutations somatiques responsables de la prolifération des cellules de mélanome ont été identifiées. Les plus fréquentes affectent BRAF ($BRAF^{V600E}$) et NRAS au niveau des acides aminés Q61 ou G12 et entraînent une activation constitutionnelle de la voie de signalisation des MAP-kinases (Hodis *et al.*, 2012 ; *Cancer Genome Atlas*, 2015). La troisième catégorie de mutations affecte le facteur NF1, une protéine qui réprime l'activité de RAS. L'inactivation de NF1 est par conséquent une voie alternative à l'activation de la voie MAP-kinase. En plus de ces trois classes de mutations, il existe des tumeurs dites « triples sauvages » ne comportant pas de mutations dans BRAF, NRAS et NF1, mais dans une pléthore d'autres gènes, chacune ne représentant qu'un faible nombre de cas *(Cancer Genome Atlas*, 2015).

MITF est un acteur clé dans la lignée mélanocytaire

En plus de l'accumulation de mutations somatiques, la progression des mélanomes est régulée par des évènements de signalisation et l'action de facteurs de transcription qui contrôlent la prolifération et l'invasion des cellules de mélanome. Un ensemble d'études a mis en évidence l'existence de cellules de mélanome avec au moins deux phénotypes différents, proliferatif et invasif, caractérisés par des profils d'expression génique distincts (Hoek *et al.*, 2008 ; Widmer *et al.*, 2012 ; Verfaillie *et al.*, 2015). Les cellules proliferatives expriment un niveau élevé du facteur de transcription MITF (*MIcrophthalmia-associated Transcription*

Factor) et de ses gènes cibles et se multiplient rapidement en culture. Elles sont peu invasives et possèdent une faible capacité à initier des tumeurs dans des expériences de xénogreffe. Ces cellules expriment également le facteur de transcription SOX10. En revanche, les cellules exprimant peu ou pas MITF ou SOX10 prolifèrent lentement *in vitro*, sont motiles et invasives et ont une importante capacité à initier des tumeurs (Cheli *et al.*, 2011, 2012). Les programmes d'expression génique et les profils épigénétiques de ces types cellulaires sont différents, et des signatures caractéristiques de chaque état ont été définies (Widmer *et al.*, 2012 ; Verfaillie *et al.*, 2015). MITF joue un rôle clé dans le contrôle de ces phénotypes et dans leur modification dynamique lors de la progression tumorale (Hoek & Goding, 2010). Ces deux types cellulaires coexistent au sein des tumeurs, leur conférant une hétérogénéité et ainsi une capacité à s'adapter aux différentes conditions de croissance (Goodall *et al.*, 2008).

MITF est un facteur de transcription de la famille bHLH-ZIP qui définit une sous-famille de protéines « MiT » comportant TFEB, TFEC et TFE3. MITF peut former des homodimères ou des hétérodimères uniquement avec les membres de cette sous-famille. Cette spécificité de dimérisation est conférée par la présence d'une insertion de trois acides aminés dans le domaine ZIP des protéines MiT (Pogenberg *et al.*, 2012). MITF se fixe à la séquence Ebox (5'-CANNTG-3') mais montre une préférence pour la séquence Mbox (5'-TCATGTG-3') ou la séquence (5'-TCANNTGA-3'). Les motifs Mbox sont par exemple présents dans les promoteurs proximaux des gènes codant les enzymes responsables de la synthèse et du transport des mélanines (DCT, TYR, TYRP1 et RAB27A) (Cheli *et al.*, 2010).

Le locus *MITF* comporte plusieurs promoteurs responsables de l'expression de nombreuses isoformes dont l'isoforme MITF-M, spécifique de la lignée mélanocytaire (Hodgkinson *et al.*, 1993 ; Tachibana *et al.*, 1994 ; Goding, 2000 ; Levy *et al.*, 2006). Le promoteur de l'isoforme MITF-M comporte des sites de fixation pour de nombreux facteurs de transcription comme PAX3, SOX10, ZEB2, CREB et TCF/LEF, responsables de la régulation de MITF lors du développement embryonnaire et de l'homéostasie des mélanocytes adultes. Les mutants murins chez lesquels l'isoforme MITF-M (à partir d'ici désignée comme MITF) est inactivée sont blanches, sourdes et possèdent de petits yeux (microphthalmie) due à une absence totale des mélanocytes et de l'épithélium pigmenté de la rétine (Hodgkinson *et al.*, 1993 ; Steigrimsson, 1994, 2004). Chez l'Homme, des mutations dans *MITF* sont responsables du syndrome Waardenburg de type II présentant plusieurs caractéristiques en commun avec les souris mutées dans MITF (Tassabehji *et al.*, 1994). MITF est donc essentiel pour la spécification des mélanocytes à partir de cellules précurseurs de la crête neurale.

MITF est un activateur de la prolifération des cellules de mélanome

Les conséquences de la perte de fonction de MITF dans les cellules de mélanome proliferatives ont été évaluées par des expériences d'interférence à l'ARN à l'aide de si/shARN. Dans un premier temps, il a été démontré que la répression de MITF induit un arrêt du cycle cellulaire et une activation de gènes impliqués dans l'invasion comme DIAPH1 (Carreira *et al.*, 2005, 2006). Après une période plus longue, les cellules entrent en sénescence (Giuliano *et al.*, 2010). La perte de MITF induit également des défauts de mitose avec la génération de cellules à noyaux multiples (Giuliano *et al.*, 2010 ; Strub *et al.*, 2011). De plus, la perte de MITF est associée à l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN avec accumulation de *foci* de P53BP1 et de H2AX dans le noyau (Strub *et al.*, 2011). L'activation de cette voie joue également un rôle dans la sénescence par l'activation de la voie de signalisation de NF-κB qui induit l'expression d'un ensemble de cytokines et de facteurs de croissance constituant le SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (Ohanna *et al.*, 2011).

Afin de définir les réseaux de gènes régulés par MITF et responsables de ces différents effets, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivies de séquençage haut débit (ChIP-seq) qui ont permis de cartographier le profil de fixation de MITF sur le génome (Strub *et al.*, 2011 ; Laurette *et al.*, 2015). De plus, nous avons déterminé les changements d'expression génique lors de la perte de MITF par RNA-seq et nous avons intégré ces données afin d'identifier des gènes régulés directement par MITF dans les cellules de mélanome proliferatives. Les résultats de ces expériences ont mis en évidence le fait que MITF active l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la réplication et la réparation de l'ADN, la mitose ainsi que de plusieurs cyclines impliquées dans la transition des phases G1-S et G2-M (Figure 1).

Nous avons identifié d'autres gènes cibles de MITF impliqués dans l'homéostasie des lysosomes ainsi que le gène *PPARGC1A* codant PGC-1α, un régulateur clé de la biogenèse des mitochondries. MITF se fixe sur de nombreux sites du locus *PPARGC1A* dont l'expression est fortement diminuée lors de la répression de MITF (Strub *et al.*, 2011 ; Laurette *et al.*, 2015). Par la suite, il a été démontré que le métabolisme oxydatif des cellules de mélanome et des tumeurs est fortement corrélé avec l'expression

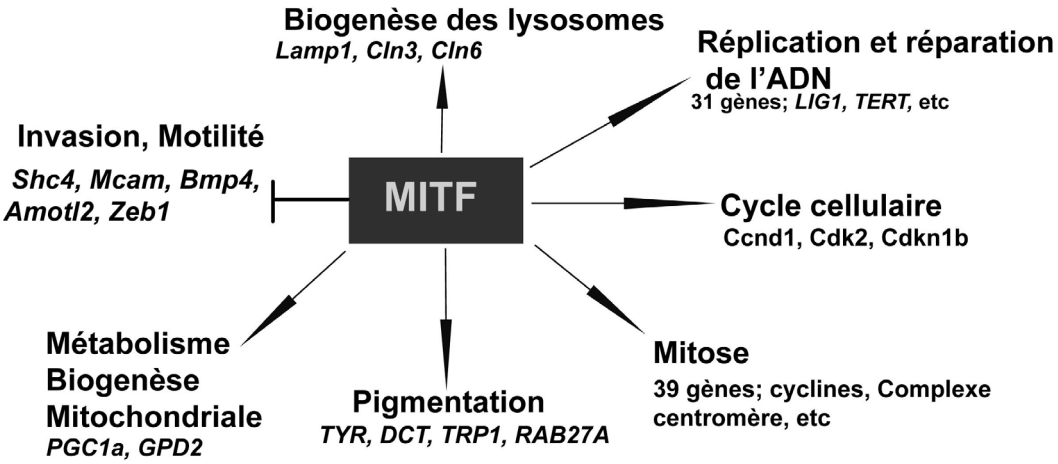

Fig. 1. Résumé des réseaux de gènes régulés par MITF dans les cellules proliératives de mélanome.

de MITF (Haq *et al.*, 2013 ; Vasquez *et al.*, 2013 ; Goding, 2016). Les cellules et tumeurs exprimant des niveaux élevés de MITF expriment fortement PGC-1α et montrent une activité de métabolisme oxydatif importante, tandis que les cellules exprimant peu ou pas de MITF montrent une importante activité de glycolyse. MITF régule donc à la fois la prolifération et une transition entre métabolisme oxydatif et glycolyse.

Enfin, cette étude a conduit à l'identification de gènes dont l'expression est induite par la perte de MITF. Plusieurs de ces gènes possèdent des sites de fixation dans leurs éléments régulateurs suggérant que MITF réprime directement leur expression. Ainsi le gène codant ZEB1, un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse et aussi des cellules invasives, est activé lors de la répression de MITF (Denecker *et al.*, 2014). D'autres gènes de la signature invasive tels que *MCAM* ou *SHC4* sont également induits (Strub *et al.*, 2011 ; Laurette *et al.*, 2015). Ainsi, en activant l'expression de gènes responsables de la prolifération et en réprimant ceux impliqués dans l'invasion, MITF est capable de contrôler la manifestation de ces deux phénotypes mutuellement exclusifs.

Identification de cofacteurs pour MITF par spectrométrie de masse

Comment MITF peut-il agir à la fois comme un activateur et comme un répresseur de la transcription ? Quels sont les cofacteurs impliqués dans sa fonction ? Pour répondre à ces questions, nous avons généré une lignée de cellules de mélanomes proliératives exprimant une version étiquetée Flag-HA de MITF. Nous avons préparé des extraits protéiques à partir du noyau et de la chromatine de ces cellules et réalisé une immunoprécipitation en tandem avec des anticorps Flag et HA (Laurette *et al.*, 2015). Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse et ensemble définissent « l'interactome » de MITF (Figure 2).

Parmi le grand nombre de protéines interagissant avec MITF, nous avons identifié des partenaires déjà connus comme ses partenaires d'hétérodimérisation TFEB et TFE3 ainsi que son co-activateur CTTNB1 (Schepsky *et al.*, 2006). MITF interagit également avec une série de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et sa réplication mais les conséquences fonctionnelles de ces interactions restent à définir.

Rôle des complexes de remodelage de la chromatine partenaires de MITF

Nous avons mis en évidence une interaction entre MITF et au moins trois complexes de remodelage de la chromatine, PBAF, NuRF et NuRD. Chaque complexe est représenté dans l'interactome par plusieurs sous-unités caractéristiques. Les interactions de MITF avec PBAF et NuRF ont été confirmées par des expériences d'immunoprécipitation suivies d'immunoblots, soit en précipitant MITF, soit en précipitant des sous-unités des complexes de remodelage (de la Serna *et al.*, 2006 ; Keenen *et al.*, 2010 ; Koludrovic *et al.*, 2015 ; Laurette *et al.*, 2015). Il semble donc que MITF pourrait se servir de ces complexes pour réguler l'expression de ces gènes cibles.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons entrepris des expériences de perte de fonction des complexes PBAF et NuRF *in vitro* dans des cellules de mélanome et *in vivo* chez la souris (Laurette *et al.*, 2015). Par immunoprécipitation, nous avons démontré que MITF interagit avec un complexe PBAF comprenant la sous-unité catalytique BRG1. Nous avons donc ciblé BRG1

Protéines/Complexes		Sous-unités
MITF/MiT		MITF, TFE3, TFEB, TFEC
Co-activateur		CTNNB1
Complexes de remodelage de la chromatine	PBAF	SMARCA4 (BRG1), PBRM1 (BAF180), SMARCC2 (BAF170), SMARCD2 (BAF60b), ACTL6A (BAF53a), CHD7
	NURF	BPTF, SMARCA1 (SNF2L), SMARCA5 (SNF2H), RBBP4
	TRRAP	TRRAP, RUVBL1, RUVBL2, ACTL6A (BAF53a)
	NURD	CHD4, MTA1, MTA2, HDAC1, HDAC2, RBBP4
Dommages à l'ADN		HERC2, UBR5, PRKDC, XRCC5, XRCC6, MSH2, MSH6, BRCA2
Cycle de l'ubiquitine		HERC2, NEURL4, UBR5, USP7, USP11
Transcription ARN Pol III	TFIIIC	GTFIIIC1, GTFIIIC2, GTFIIIC3, GTFIIIC4
Cohésine		SMC1A, SMC3, PDS5, STAG2
Répresseur		TRIM28, TRIM33, TRIM24, HDAC1, HDAC2, CBX1, CBX3, CBX4
Réplication de l'ADN	MCM	MCM3, MCM5, MCM7
	RFC	RFC1, RFC2, RFC4, RFC5
Kinases		AKAP8, AKAP8L, PLK1
Complexe du pore nucéaire		KPNB1, NUP153, XPO1, NUP50, NPM1, NOP14, TNPO1, KPNA1 KPNA4, XPO5

Fig. 2. Résumé de l'ensemble de protéines constituant « l'interactome » de MITF. Les protéines co-immunoprécipitées avec MITF et identifiées par spectrométrie de masse sont classées par leurs fonctions et/ou leur appartenance aux mêmes complexes.

soit par répression de son expression par des si/shARN soit par son inactivation somatique chez la souris. La répression de BRG1 dans les cellules de mélanome ou des mélanocytes immortalisés *in vitro* provoque un arrêt de la prolifération et une entrée en sénescence. Dans les cellules de mélanome proliferatives plus de 8000 gènes sont dérégulés, montrant la contribution majeure de BRG1 à la régulation transcriptionnelle.

Chez la souris, l'inactivation du gène codant Brg1 (*Smarca4*) de façon spécifique dans la lignée mélanocytaire, en utilisant des souris transgéniques *Tyr*::Cre (Delmas *et al.*, 2003), provoque une perte progressive du nombre de mélanoblastes à partir du jour 12,5 de l'embryogénèse (Figure 3A). À ce stade le nombre de mélanoblastes est fortement réduit tandis qu'au jour 15,5, ils ne sont presque plus détectables (Figure 3B). Par conséquent, à la naissance, les souris mutantes sont blanches en raison de la perte complète des mélanocytes (Figure 3C). Ainsi BRG1 est essentiel dans les cellules de mélanome et dans les mélanocytes *in vitro* et *in vivo*.

Si MITF se sert de PBAF/BRG1 comme cofacteur, ces deux facteurs devraient co-localiser sur le génome au niveau d'éléments régulateurs pour leurs gènes cibles. Nous avons donc intégré des données de localisation génomique de MITF et d'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27ac, un marqueur d'éléments régulateurs actifs) avec des donnés ChIP-seq de BRG1 générées à partir de chromatine de cellules de mélanome, extraite en conditions natives et digérée à la MNase I (Laurette *et al.*, 2015). Nous avons ainsi pu mettre en évidence le fait que MITF et BRG1 co-localisent sur près de 6000 sites dans le génome. Des analyses comparatives ont conduit à l'identification de sites où MITF et BRG1 se fixent avec des combinaisons des facteurs de transcription SOX10, YY1 et TFAP2A, dont les rôles importants dans la lignée mélanocytaire et le mélanome sont bien décrits (Li & Cornell, 2007 ; Li *et al.*, 2012 ; Shakova *et al.*, 2012 ; Harris *et al.*, 2013). Au niveau de ces éléments, MITF et les autres facteurs de transcription se lient à l'ADN accessible entre deux nucléosomes fixés par BRG1. Nous avons démontré que MITF et SOX10, qui interagit également avec BRG1/PBAF (Weider *et al.*, 2012), agissent ensemble pour recruter BRG1 sur la chromatine au niveau de ces sites. Nous avons ainsi proposé un modèle où MITF (et SOX10) utilisent BRG1/PBAF pour définir la conformation de la chromatine au niveau des éléments régulateurs (promoteurs et *enhancers*) des gènes de la signature des cellules de mélanome proliferatives (Figure 4).

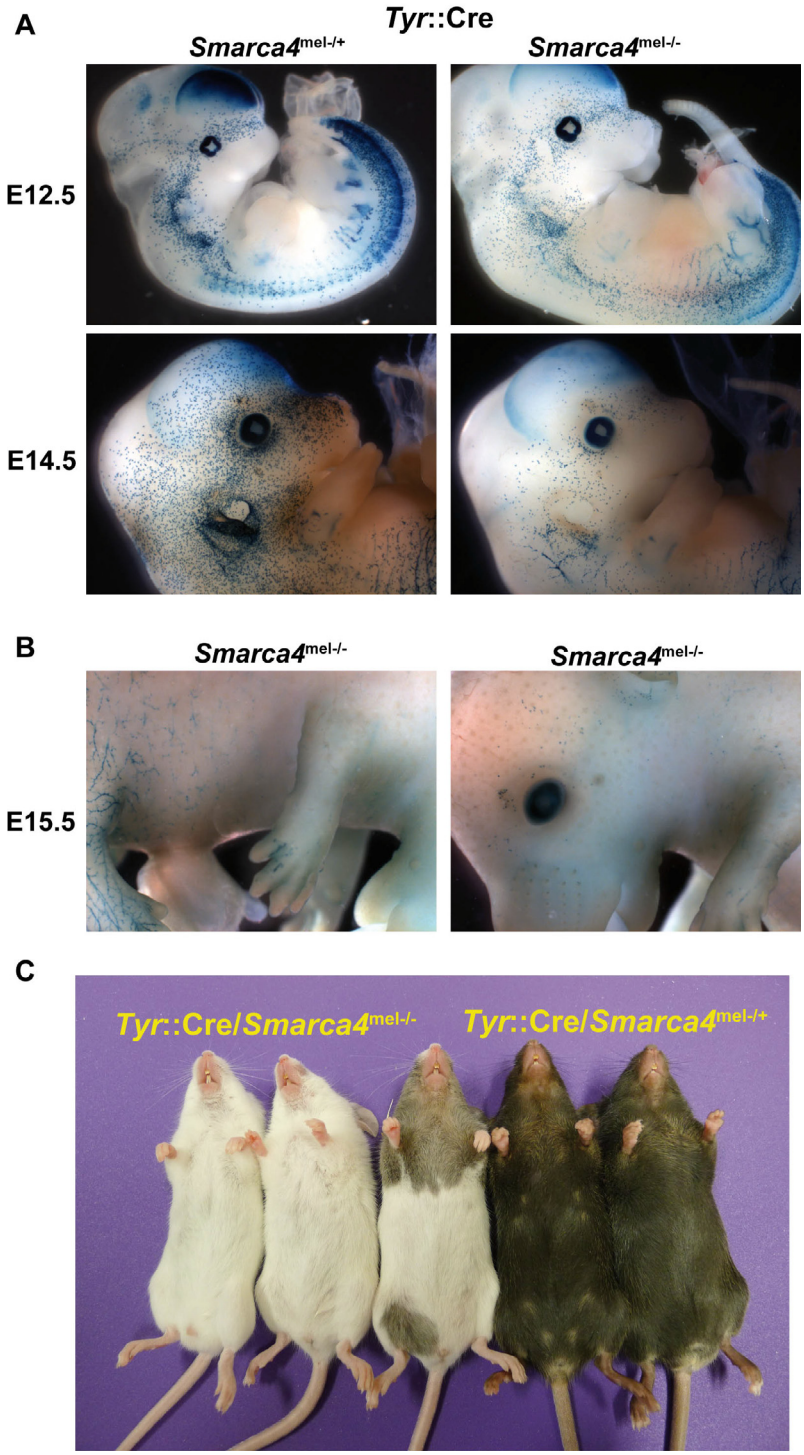

Fig. 3. Une fonction essentielle de Brg1 dans le développement des mélanoblastes murins. **A-B.** Les images montrent des embryons de souris où le gène *Smarca4* codant Brg1 a été inactivé de façon sélective dans les mélanoblastes par croisement avec les souris *Tyr*::Cre. Ces souris qui ont été croisées avec des souris *Dct*::LacZ expriment la beta-galactosidase de façon spécifique dans les mélanoblastes, permettant leur marquage par un essai colorimétrique utilisant le XGal. Aux jours 12,5 et 14,5 de l'embryogenèse une forte réduction du nombre de mélanoblastes est observée. Au jour 15,5, les mélanoblastes ne sont plus détectés. **C.** Les souris adultes où le gène *Smarca4* est inactivé sont blanches par suite de la disparition des mélanoblastes lors de l'embryogenèse.

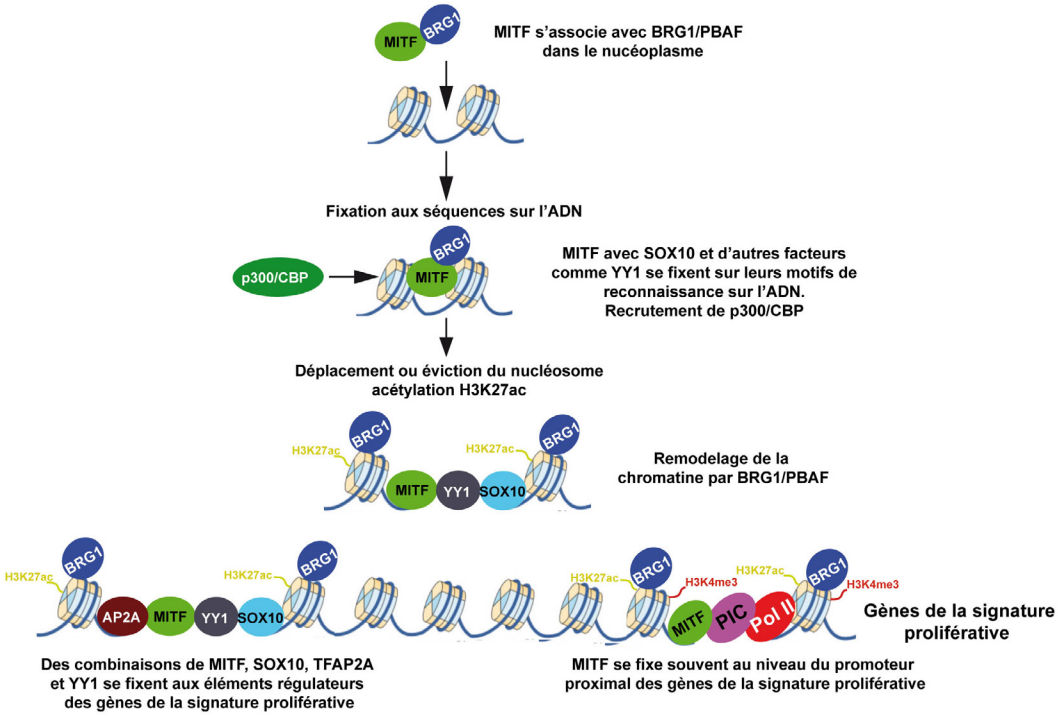

Fig. 4. Modèle pour la régulation de l'organisation de la chromatine par MITF et BRG1/PBAF. Nos expériences d'immunoprécipitation et de spectrométrie de masse montrent une interaction entre MITF et BRG1/PBAF dans le nucléoplasme. Ce complexe MITF-BRG1/PBAF peut être recruté sur les sites de fixation de MITF sur l'ADN où l'activité de remodelage de BRG1 permet de déplacer ou évincer des nucléosomes au niveau de ces sites. MITF recrute l'enzyme P300 qui acétyle K27 de l'histone H3 dans les nucléosomes entourant les sites de fixation de MITF. Des combinaisons de différents facteurs de transcription se fixent à l'ADN exposé entre ces nucléosomes pour réguler l'expression des gènes de la signature proliférative. Nous avons également montré que MITF se fixe souvent au niveau du promoteur proximal proche du site d'initiation de la transcription des gènes de la signature proliférative.

Le complexe de remodelage de la chromatine NuRF est constitué de BPTF, une protéine de grande masse moléculaire, qui sert d'échafaudage au complexe, et des sous-unités catalytiques SMARCA2 ou SMARCA5 ainsi que d'autres sous-unités dont les fonctions ne sont pas bien comprises (Tsukiyama *et al.*, 1995, Tsukiyama & Wu, 1995 ; Vermeulen *et al.*, 2010 ; Alkhatib & Landry, 2011). BPTF est la seule sous-unité spécifique de NuRF, les autres étant partagées avec d'autres complexes de remodelage. Nous avons donc ciblé BPTF soit par répression de son expression à l'aide de si/shARN ou par son inactivation chez la souris (Koludrvic *et al.*, 2015).

Dans les cellules de mélanome prolifératives, la répression de BPTF provoque un arrêt de la prolifération et une entrée en sénescence caractérisée par une altération de la morphologie et l'induction d'un SASP. Plus de 30 % des gènes dérégulés (induits ou réprimés) par la répression de BPTF le sont également par la répression de MITF (Figures 5A–5B). Une fraction significative de gènes dont l'expression est diminuée se trouve être impliquée dans la progression du cycle cellulaire mais également dans le métabolisme oxydatif, y compris *PPARGC1A* (Figure 5B). Ainsi MITF et BPTF co-régulent la prolifération et l'état métabolique des cellules de mélanome (Koludrovic *et al.*, 2015). Il a été démontré que l'expression de BPTF est augmentée dans des mélanomes humains, le locus génomique codant BPTF étant parfois même amplifié dans ces tumeurs et un facteur de mauvais pronostic (Dar *et al.*, 2015). Nos résultats permettent d'expliquer ces observations par le rôle assuré par BPTF en tant que cofacteur pour MITF dans la régulation des gènes nécessaires à la prolifération et au fonctionnement du métabolisme oxydatif.

Le rôle critique du métabolisme oxydatif des cellules dans la progression du mélanome est également mis en lumière par une seconde étude (Leucci *et al.*, 2016). Nous avons identifié parmi les gènes régulés par SOX10, un nouvel ARN long non codant situé en 3'

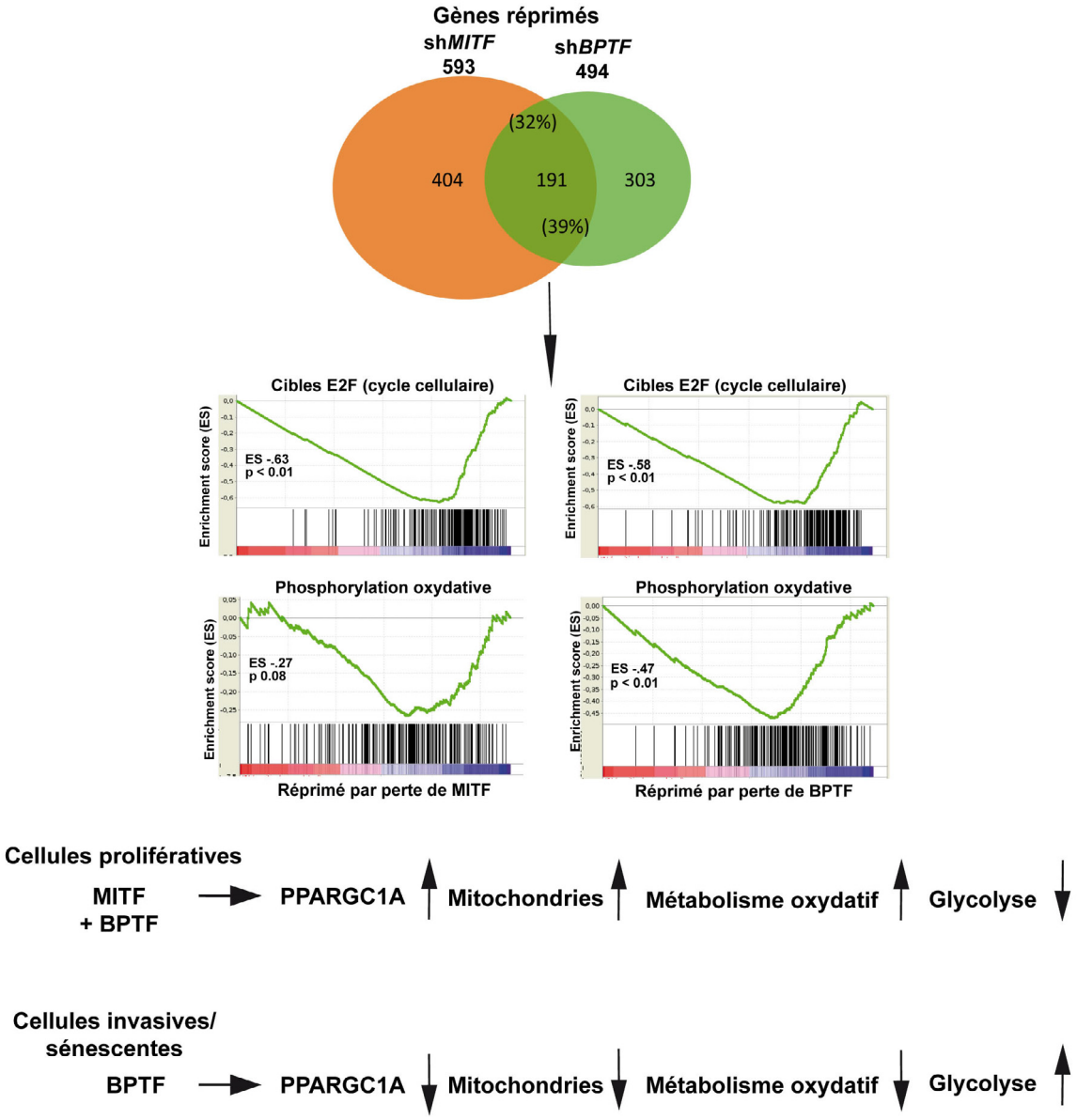

Fig. 5. MITF et BPTF/NuRF co-régulent des gènes impliqués dans la prolifération et le métabolisme oxydatif. Après des expériences de shMITF ou shBPTF dans les cellules proliferatives, les gènes dérégulés ont été identifiés par RNA-seq et leur ontologie analysée par la technique de GSEA. Parmi les gènes dont l'expression est diminuée, 191 sont régulés en commun par MITF et BPTF. Les gènes sont enrichis dans les fonctions du contrôle du cycle cellulaire et du métabolisme oxydatif.

du locus *MITF,* dont l'expression est diminuée lors de la répression de SOX10. L'équipe de Jean-Christophe Marine (VIB Leuven, Belgique) a démontré que cet ARNnc baptisé SAMMSON interagit avec la protéine CQBP1, intensifie sa localisation mitochondriale et y stimule la traduction ainsi que la mise en place des enzymes de la chaîne respiratoire. SAMMSON a donc comme effet d'augmenter le métabolisme oxydatif des cellules de mélanome nécessaires à la croissance tumorale (Leucci *et al.*, 2016).

Nous avons montré que SOX10 recrute BRG1 sur ses sites de transcription, y activant la transcription (Laurette *et al.*, 2015). Dans le cas du promoteur de SAMMSON, deux sites de fixation sont observés (Leucci *et al.*, 2016) au niveau desquels SOX10 recrute BRG1 et y active la transcription (Figure 6). Ainsi MITF et BPTF/NuRF co-régulent *PPARGC1A* et SOX10 et BRG1/PBAF co-régulent *SAMMSON*. Par ces deux mécanismes, ces facteurs clés de la signature proliférative utilisent deux complexes de remodelage

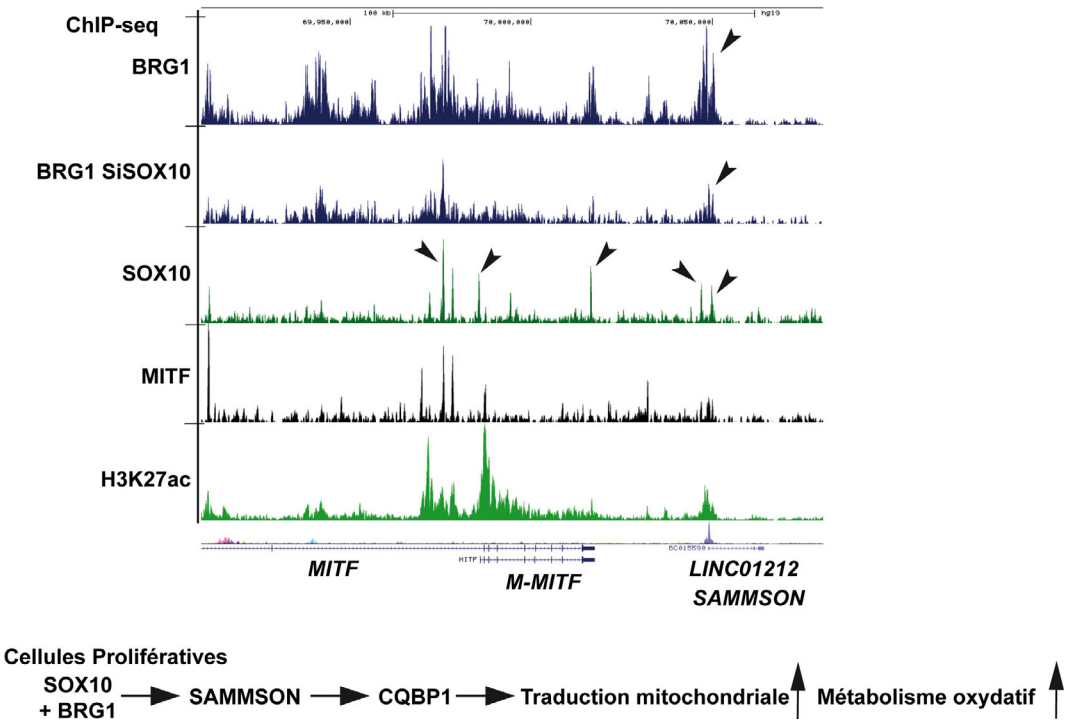

Fig. 6. Régulation de l'état métabolique des cellules de mélanome par SOX10 et sa cible l'ARN long non codant SAMMSON. Les profils de ChIP-seq pour MITF, SOX10, BRG1 and H3K27ac sont montrés au niveau du locus *MITF* et *SAMMSON*. Des sites de fixation de SOX10 sont indiqués par les têtes de flèches. Les deux sites situés à droite sont localisés dans le promoteur proximal de *SAMMSON*. Les sites de fixation de BRG1 associés à ces sites de fixation de SOX10 sont également indiqués par des têtes de flèches. Nous avons réalisé un ChIP-seq de BRG1 à la suite de la répression de SOX10 par un siARN. Les résultats montrent une forte diminution du recrutement de BRG1 au niveau de plusieurs sites de fixation de SOX10, y compris ceux localisés dans le promoteur proximal de *SAMMSON*. SOX10 recrute donc BRG1 pour stimuler l'expression de *SAMMSON,* qui interagit avec CQBP1 pour promouvoir la traduction mitochondriale et le métabolisme oxydatif.

de la chromatine pour activer des gènes nécessaires au métabolisme oxydatif et contribuent ainsi à la progression tumorale.

Une fonction spécifique pour BPTF/NuRF dans les cellules souches mélanocytaires adultes

Bien que nos résultats définissent un rôle de BPTF/NuRF en tant que cofacteur pour MITF dans les cellules de mélanome, son inactivation dans les mélanocytes chez la souris a mis en évidence une fonction très spécifique dans les cellules souches mélanocytaires adultes (*Melanocyte Stem Cells*, McSC). L'inactivation de Bptf lors de l'embryogenèse dans la lignée transgénique *Tyr*::Cre provoque une diminution de 20–30 % du nombre de mélanoblastes, de sorte que les souriceaux présentent une diminution de leur pigmentation à la naissance (Koludrovic *et al.*, 2015). Vers l'âge de 4 semaines, les souris mutantes perdent rapidement leur pigmentation pour devenir blanches, et le restent jusqu'à la fin de leur vie. Par ailleurs, si ces souris sont épilées vers l'âge de 4 semaines, les nouveaux poils qui poussent sont blancs, indiquant une incapacité à pigmenter les poils à partir du premier renouvellement du pelage adulte et lors de tous les cycles de régénération suivants.

Lors de l'embryogenèse, les mélanoblastes colonisent les follicules pileux en formation et à la naissance une partie de ces mélanoblastes se différencient directement en mélanocytes matures responsables de la pigmentation des premiers poils. Les autres mélanoblastes colonisent la partie dite permanente du follicule pileux et deviennent des McSC qui, vers l'âge de 4 semaines, lors du premier renouvellement folliculaire, produisent les mélanocytes responsables de la pigmentation des nouveaux poils (Nishikawa & Osawa, 2005 ; Osawa *et al.*, 2005 ; Nishimura, 2011 ; Tanimura *et al.*, 2011). Les McSC assurent ensuite la production de mélanocytes lors du renouvellement des poils tout au long de la vie adulte. Au stade anagène de chaque cycle de croissance et de régression de follicules pileux, les McSC sont stimulées *via* la voie Wnt

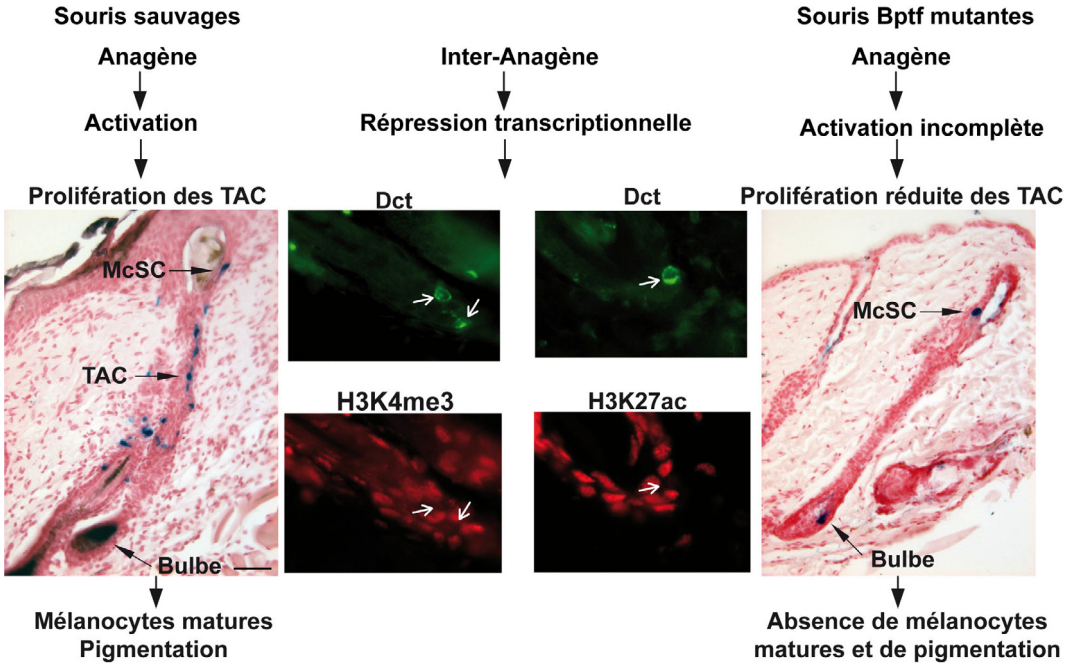

Fig. 7. Rôle de BPTF/NuRF dans l'homéostasie des mélanocytes adultes. À chaque phase anagène les McSC prolifèrent pour produire des TAC qui migrent vers le bulbe du follicule et se différencient en mélanocytes matures. Lors de la phase anagène 6 jours après dépilation de souris *Dct*::LacZ, les McSC, les TAC et les mélanocytes dans le bulbe sont visualisés par coloration à XGal dans une section de follicule pileux (image de gauche). Entre les phases anagènes, une forte diminution des marques épigénétiques H3K4me3 et H3K27ac est observée dans les McSC (indiquées par des flèches blanches), identifiées par leur expression cytoplasmique de la protéine Dct. Dans une section de follicule pileux 6 jours après dépilation de souris mutante pour BPTF/NuRF (image de droite), les McSC sont présentes, mais il n'y a pas de TAC et seuls quelques mélanocytes sont visibles dans le bulbe.

et prolifèrent pour donner naissance à des cellules dites TAC (*Transient Amplifying Cells*) qui migrent vers le bulbe du follicule pileux et se différencient en mélanocytes matures produisant de la mélanine (Rabbani *et al.*, 2011). L'absence de pigmentation chez les souris Bptf mutantes peut donc s'expliquer soit par l'absence de la population des McSC, soit par leur incapacité à proliférer et se différencier en mélanocytes lors de la phase anagène.

Une analyse approfondie de ces souris a permis de montrer que la population des McSC est bien établie et persiste tout au long de leur vie, mais qu'il existe un défaut dans leur capacité à proliférer à la phase anagène (Koludrovic *et al.*, 2015). Après une épilation locale qui permet de synchroniser la phase anagène, nous avons observé un nombre réduit de TAC et une absence de mélanocytes matures. De plus, les TAC n'expriment ni MITF, ni SOX10, ni PAX3, et donc aucun des facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des mélanocytes.

Le laboratoire de Nishikawa avait déjà montré une absence de phosphorylation de la sérine 2 dans le domaine C-terminal de la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II dans les McSC lorsque celles-ci sont en période de quiescence entre deux phases anagènes (Freter *et al.*, 2010). Cette phosphorylation est caractéristique de la polymérase en élongation, suggérant une absence de transcription active durant cette période. Nous avons observé une absence de marques épigénétiques de la chromatine active comme H3K27ac et H3K4 triméthylée (H3K4me3) et une diminution de l'expression de Brg1 et de Smarca5. Il semble donc qu'entre deux phases anagènes, les McSC entrent dans un état caractérisé par une chromatine réprimée et sans transcription active. Ainsi, nous proposons qu'un remodelage de la chromatine par Bptf dans ces cellules est nécessaire pour permettre une réactivation du programme d'expression génique essentielle au processus de différenciation ayant lieu lors de la phase anagène (Figure 7). Bptf aurait donc une fonction très spécifique lors de la transition de la phase quiescente vers la phase de prolifération et de différenciation des McSC adultes.

Conclusion

L'ensemble de ces études a permis de mieux comprendre la fonction de MITF et SOX10 et de certains

de leurs cofacteurs dans la physiologie normale des mélanocytes et dans les cellules proliferatives de mélanome. Nous avons défini l'ensemble du réseau de gènes régulés par ces facteurs dans les cellules proliferatives de mélanome et décrit comment MITF et SOX10 utilisent le complexe de remodelage de la chromatine PBAF pour établir une organisation de la chromatine au niveau des éléments régulateurs de leurs gènes cibles. Nous avons également montré que BRG1/PBAF et BPTF/NuRF jouent des rôles très différents dans la différenciation et l'homéostasie des mélanocytes.

Dans l'avenir, il sera important de déterminer la fonction de ces complexes de remodelage de la chromatine dans les cellules invasives de mélanome qui n'expriment ni MITF ni SOX10. Quelles fonctions assurent-ils dans ces cellules ? Agissent-ils comme des cofacteurs pour d'autres facteurs de transcription comme Jun et TEAD qui semblent jouer un rôle clé dans la signature de ce phénotype (Verfaillie *et al.*, 2015) ? De plus, quelles sont les fonctions des autres complexes qui interagissent avec MITF tel que NuRD ? Interviennent-ils dans la répression de gènes cibles par MITF ? Quels autres interactants de MITF seraient-ils essentiels ? Quelles sont leurs fonctions ? Nos futures expériences visent à répondre à ces questions et à développer une vue d'ensemble du fonctionnement et de la dynamique des évènements transcriptionnels et épigénétiques responsables de la régulation des gènes dans les mélanocytes et le mélanome.

Remerciements. Nous remercions tous nos collaborateurs pour leur aide, les discussions et le matériel partagés. Nous remercions également les services communs et infrastructures de l'IGBMC, en particulier la plate-forme de séquençage haut débit et bioinformatique, membre de l'infrastructure nationale France Génomique (ANR10-INBS-09-08), et l'animalerie de l'IGBMC. Le travail de notre équipe est financé par le CNRS, l'INSERM, l'Université de Strasbourg, la Ligue Nationale contre le Cancer, l'ARC et le Labex INRT ANR-10-LABX-0030-INRT du programme des Grands Investissements. Notre équipe est labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer.

Références

Alkhatib S.G., Landry, J.W. (2011). The nucleosome remodeling factor. *FEBS Letters,* 585, 3197-3207.

Cancer Genome Atlas Network (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell,* 161, 1681-1696.

Carreira S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S.A., Galibert, M.D., Denat, L., Larue, L., 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., Goding, C.R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev*, 20, 3426-3439.

Cheli Y., Ohanna, M., Ballotti, R., Bertolotto, C. (2010). Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res,* 23, 27-40.

Cheli Y., Guiliano, 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, 2461-2470 .

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

Dar A.A., Nosrati, M., Bezrookove, V., de Semir, D., Majid, S., Thummala, S., Sun, V., Tong, S., Leong, S.P., Minor, D., Billings, P.R., Soroceanu, L., Debs, R., Miller, J.R., 3rd, Sagebiel, R.W., Kashani-Sabet, M. (2015). The Role of BPTF in Melanoma Progression and in Response to BRAF-Targeted Therapy. *J Natl Cancer Inst*, 107.

de la Serna, I.L., Ohkawa, Y., Higashi, C., Dutta, C., Osias, J., Kommajosyula, N., Tachibana, T., Imbalzano, A.N. (2006). The microphthalmia-associated transcription factor requires SWI/SNF enzymes to activate melanocyte-specific genes. *J Biol Chem,* 281, 20233-20241.

Delmas V., Martinozzi, S., Bourgeois, Y., Holzenberger, M., Larue, L. (2003). Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage. *Genesis*, 36, 73-80.

Denecker G., Vandamme, N., Akay, O., Koludrovic, D., Taminau, J., Lemeire, K., Gheldof, A., De Craene, B., Van Gele, M., Brochez, L., Udupi, G.M., Rafferty, M., Balint, B., Gallagher, W.M., Ghanem, G., Huylebroeck, D., Haigh, J., van den Oord, J., Larue, L., Davidson, I., Marine, J.C., Berx, G. (2014). Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ,* 21, 1250-1261.

Ferlay J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W., Comber, H., Forman, D., Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe : estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49, 1374-1403.

Forsea A.M., Del Marmol, V., de Vries, E., Bailey, E.E., Geller, A.C. (2012). Melanoma incidence and mortality in Europe : new estimates, persistent disparities. *Br J Dermatol*, 167, 1124-1130.

Freter R., Osawa, M., Nishikawa, S. (2010). Adult stem cells exhibit global suppression of RNA polymerase II serine-2 phosphorylation. *Stem Cells,* 28, 1571-1580.

Garbe C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., Grob, J.J., Malvehy, J., Newton-Bishop, J., Stratigos, A., Pehamberger, H., Eggermont, A.M., European Dermatology, F., European Association of, D.-O., European Organization of Research and Treatment of Cancer. (2012). Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline–Update 2012. *Eur J Cancer*, 48, 2375-2390.

Giuliano S., Cheli, Y., Ohanna, M., Bonet, C., Beuret, L., Bille, K., Loubat, A., Hofman, V., Hofman, P., Ponzio, G., Bahadoran, P., Ballotti, R., Bertolotto, C. (2010). Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Res*, 70, 3813-3822.

Goding C.R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma : signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*, 14, 1712-1728.

Goding C.R. (2016). Targeting the lncRNA SAMMSON Reveals Metabolic Vulnerability in Melanoma. *Cancer Cell*, 29, 619-621.

Goodall J., Carreira, S., Denat, L., Kobi, D., Davidson, I., Nuciforo, P., Sturm, R.A., Larue, L., 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 Res,* 68, 7788-7794.

Haq R., Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G.C., Frederick, D.T., Hurley, A.D., Nellore, A., Kung, A.L., Wargo, J.A., Song, J.S., Fisher, D.E., Arany, Z., Widlund, H.R. (2013). Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer Cell,* 23, 302-315.

Harris M.L., Buac, K., Shakhova, O., Hakami, R.M., Wegner, M., Sommer, L., Pavan, W.J. (2013). A dual role for SOX10 in the maintenance of the postnatal melanocyte lineage and the differentiation of melanocyte stem cell progenitors. *PLoS Genet,* 9, e1003644.

Hodgkinson C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 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.

Hodis E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A.H., Lawrence, M.S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R.C., Winckler, W., Ardlie, K., Wagle, N., Wargo, J., Chong, K., Morton, D.L., Stemke-Hale, K., Chen, G., Noble, M., Meyerson, M., Ladbury, J.E., Davies, M.A., Gershenwald, J.E., Wagner, S.N., Hoon, D.S., Schadendorf, D., Lander, E.S., Gabriel, S.B., Getz, G., Garraway, L.A., Chin, L. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell,* 150, 251-263.

Hoek K.S., Eichhoff, O.M., Schlegel, N.C., Dobbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., Dummer, R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res*, 68, 650-656.

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

Keenen B., Qi, H., Saladi, S.V., Yeung, M., de la Serna, I.L. (2010). Heterogeneous SWI/SNF chromatin remodeling complexes promote expression of microphthalmia-associated transcription factor target genes in melanoma. *Oncogene,* 29, 81-92.

Koludrovic D., Laurette, P., Strub, T., Keime, C., Le Coz, M., Coassolo, S., Mengus, G., Larue, L., Davidson, I. (2015). Chromatin-Remodelling Complex NURF Is Essential for Differentiation of Adult Melanocyte Stem Cells. *PLoS Genet,* 11, e1005555.

Laurette P., Strub, T., Koludrovic, D., Keime, C., Le Gras, S., Seberg, H., Van Otterloo, E., Imrichova, H., Siddaway, R., Aerts, S., Cornell., R.A, Mengus, G., Davidson, I. (2015). Transcription factor MITF and remodeller BRG1 define chromatin organisation at regulatory elements in melanoma cells. *eLife,* 10.7554/eLife.06857.

Leucci, E., Vendramin, R., Spinazzi, M., Laurette, P., Fiers, M., Wouters, J., Radaelli, E., Eyckerman, S., Leonelli, C., Vanderheyden, K., Rogiers, A., Hermans, E., Baatsen, P., Aerts, S., Amant, F., Van Aelst, S., van den Oord, J., de Strooper, B., Davidson, I., Lafontaine, D.L., Gevaert, K., Vandesompele, J., Mestdagh, P., Marine, J.C. (2016). Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature,* 531, 518-522.

Levy C., Khaled, M., Fisher, D.E. (2006). MITF : master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med,* 12, 406-414.

Li W., Cornell, R.A. (2007). Redundant activities of Tfap2a and Tfap2c are required for neural crest induction and development of other non-neural ectoderm derivatives in zebrafish embryos. *Dev Biol,* 304, 338-354.

Li J., Song, J.S., Bell, R.J., Tran, T.N., Haq, R., Liu, H., Love, K.T., Langer, R., Anderson, D.G., Larue, L., Fisher, D.E. (2012). YY1 regulates melanocyte development and function by cooperating with MITF. *PLoS Genet*, 8, e1002688.

Nishikawa S.I., Osawa, M. (2005). Melanocyte system for studying stem cell niche. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, 1-13.

Nishimura E.K. (2011). Melanocyte stem cells : a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res*, 24, 401-410.

Ohanna M., Giuliano, S., Bonet, C., Imbert, V., Hofman, V., Zangari, J., Bille, K., Robert, C., Bressac-de Paillerets, B., Hofman, P., Rocchi, S., Peyron, J.F., Lacour, J.P., Ballotti, R., Bertolotto, C. (2011). Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor-{kappa}B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev*, 25, 1245-1261.

Osawa M., Egawa, G., Mak, S.S., Moriyama, M., Freter, R., Yonetani, S., Beermann, F., Nishikawa, S. (2005). Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Development,* 132, 5589-5599.

Pogenberg V., Ogmundsdottir, M.H., Bergsteinsdottir, K., Schepsky, A., Phung, B., Deineko, V., Milewski, M., Steingrimsson, E., Wilmanns, M. (2012). Restricted leucine zipper dimerization and specificity of DNA recognition of the melanocyte master regulator MITF. *Genes Dev,* 26, 2647-2658.

Rabbani P., Takeo, M., Chou, W., Myung, P., Bosenberg, M., Chin, L., Taketo, M.M., Ito, M. (2011). Coordinated activation of Wnt in epithelial and melanocyte stem cells initiates pigmented hair regeneration. *Cell,* 145, 941-955.

Schepsky A., Bruser, K., Gunnarsson, G.J., Goodall, J., Hallsson, J.H., Goding, C.R., Steingrimsson, E., Hecht, A. (2006). The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression. *Mol Cell Biol,* 26, 8914-8927.

Shakhova O., Zingg, D., Schaefer, S.M., Hari, L., Civenni, G., Blunschi, J., Claudinot, S., Okoniewski, M., Beermann, F., Mihic-Probst, D., Moch, H., Wegner, M., Dummer, R., Barrandon, Y., Cinelli, P., Sommer, L. (2012). Sox10 promotes the formation and maintenance of giant congenital naevi and melanoma. *Nat Cell Biol*, 14, 882-890.

Steingrimsson E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet*, 38, 365-411.

Steingrimsson, E., Moore, K.J., Lamoreux, M.L., Ferre-D'Amare, A.R., Burley, S.K., Zimring, D.C., Skow, L.C., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G., Jenkins A. (1994). Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat Genet*, 8, 256-263.

Strub T., Giuliano, S., Ye, T., Bonet, C., Keime, C., Kobi, D., Le Gras, S., Cormont, M., Ballotti, R., Bertolotto, C., Davidson, I. (2011). Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene,* 30, 2319-2332.

Tachibana M., Perez-Jurado, L.A., Nakayama, A., Hodgkinson, C.A., Li, X., Schneider, M., Miki, T., Fex, J., Francke, U., Arnheiter, H. (1994). Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-p12.3. *Hum Mol Genet,* 3, 553-557.

Tanimura S., Tadokoro, Y., Inomata, K., Binh, N.T., Nishie, W., Yamazaki, S., Nakauchi, H., Tanaka, Y., McMillan, J.R., Sawamura, D., Yancey, K., Shimizu, H., Nishimura, E.K. (2011). Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell*, 8, 177-187.

Tassabehji M., Newton, V.E., Read, A.P. (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet,* 8, 251-255.

Tsukiyama T., Wu, C. (1995). Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell,* 83, 1011-1020.

Tsukiyama T., Daniel, C., Tamkun, J., Wu, C. (1995). ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell,* 83, 1021-1026.

Vazquez F., Lim, J.H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C.B., Granter, S.R., Widlund, H.R., Spiegelman, B.M., Puigserver, P. (2013). PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell,* 23, 287-301.

Verfaillie A., Imrichova, H., Atak, Z.K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., Christiaens, V., Svetlichnyy, D., Luciani, F., Van den Mooter, L., Claerhout, S., Fiers, M., Journe, F., Ghanem, G.E., Herrmann, C., Halder, G., Marine, J.C., Aerts, S. (2015). Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun*, 6, 6683.

Vermeulen M., Eberl, H.C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Lee, K.K., Olsen, J.V., Hyman, A.A., Stunnenberg, H.G., Mann, M. (2010). Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell*, 142, 967-980.

Weider M., Kuspert, M., Bischof, M., Vogl, M.R., Hornig, J., Loy, K., Kosian, T., Muller, J., Hillgartner, S., Tamm, E.R., Metzger, D., Wegner, M. (2012). Chromatin-remodeling factor Brg1 is required for Schwann cell differentiation and myelination. *Dev Cell,* 23, 193-201.

Widmer D.S., Cheng, P.F., Eichhoff, O.M., Belloni, B.C., Zipser, M.C., Schlegel, N.C., Javelaud, D., Mauviel, A., Dummer, R., Hoek, K.S. (2012). Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res*, 25, 343-353.