



INSTITUT DE FRANCE
Académie des sciences

Comptes Rendus

Biologies

Corine Bertolotto

Cutaneous and uveal melanoma: two different cancers in therapeutic needs

Volume 344, issue 3 (2021), p. 219-231

Published online: 15 November 2021

<https://doi.org/10.5802/crbio.63>



This article is licensed under the
CREATIVE COMMONS ATTRIBUTION 4.0 INTERNATIONAL LICENSE.
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Les Comptes Rendus. Biologies sont membres du
Centre Mersenne pour l'édition scientifique ouverte
www.centre-mersenne.org
e-ISSN : 1768-3238



Articles / Reviews / *Articles / Revues*

Cutaneous and uveal melanoma: two different cancers in therapeutic needs

Mélanome cutané et uvéal : deux cancers différents avec des besoins thérapeutiques

Corine Bertolotto^{© a, b}

^a University Côte d'Azur, France

^b Inserm, Biology and Pathologies of melanocytes, team1, Equipe labellisée Ligue 2020, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice, France

E-mail: Corine.Bertolotto@univ-cotedazur.fr

Corine Bertolotto is the 2021 recipient of the Dandrimont-Bénicourt award / Foundation of the Institut de France / Corine Bertolotto est lauréate 2021 du Prix Dandrimont-Bénicourt / Fondation de l'Institut de France

Abstract. Melanocytes are located in various parts of the human body, such as the skin and the eye. Their transformation leads to melanoma, an aggressive and deadly neoplasm. Cutaneous and uveal melanomas show different characteristics, including significant differences in genetic alterations, metastatic sites and therapeutic response. In recent decades, great efforts have been made to obtain a more comprehensive understanding of genetics, genomics and molecular changes, enabling the identification of key cellular processes and signaling pathways in melanomas. Major breakthroughs were realized in the treatment of metastatic cutaneous melanoma, but most patients relapse. Currently, there is no approved systemic treatment for metastatic uveal melanoma. Thus, these two different cancers are in therapeutic need to overcome treatment failure and improve patient prognosis. In this review we discuss on one hand the mutation of MITE the master gene of melanocyte homeostasis, which we identified as a new melanoma predisposition gene in cutaneous melanoma, and on the other hand the recent findings of intratumor heterogeneity and characterization of cell sub-populations in primary uveal melanomas. These studies offer new tools for early detection and therapeutic targets.

Résumé. Les mélanocytes sont situés dans diverses parties du corps humain, tels que la peau et l'oeil. Leur transformation conduit au mélanome, une tumeur agressive et mortelle. Les mélanomes cutanés et uvéaux présentent des caractéristiques différentes, notamment des différences significatives dans les altérations génétiques, les sites métastatiques et la réponse thérapeutique. Au cours des dernières décennies, de nombreux efforts ont été déployés pour obtenir une compréhension plus complète de la génétique, de la génomique et des changements moléculaires, permettant l'identification des processus cellulaires clés et des voies de signalisation. Ces études ont permis des avancées majeures dans le traitement du mélanome cutané métastatique, mais la plupart des patients rechutent.

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement systémique approuvé pour le mélanome uvéal métastatique. Il existe donc un besoin majeur de nouvelles options thérapeutiques pour ces deux cancers pour permettre une prise en charge efficace et améliorer le pronostic des patients. Cette revue se concentre d'une part sur la mutation de MITF, le gène maître de l'homéostasie des mélanocytes, identifié comme un nouveau gène de prédisposition au mélanome cutané, et d'autre part sur l'étude de l'hétérogénéité intratumorale et la caractérisation moléculaire des sous-populations cellulaires dans le mélanome uvéal primaire. Ces travaux offrent de nouveaux outils pour du dépistage précoce et de nouvelles cibles thérapeutiques.

Keywords. Melanoma, Skin, Eye, Genetics, Prognostic markers, Therapeutic targets.

Mots-clés. Mélanome, Peau, Œil, Génétique, Marqueurs pronostiques, Cibles thérapeutiques.

Manuscript received 30th September 2021, accepted 7th October 2021.

1. Human melanocytes biology and pathology

Melanocytes derive from the neural crest as undifferentiated cells, called melanoblasts, which migrate to various parts of the human body, such as the skin, eyes, meninges, heart, and cochlea. The role and function of melanocytes are well established in skin, but not in other anatomical locations. Melanocyte physiological function is to synthesize melanin. Two melanin types are produced, the brown/black pigment eumelanin and the orange/yellow pigment pheomelanin. The proportion of these two types of melanin defines the variation in skin, hair and iris colour: the ratio of eumelanin/pheomelanin is significantly greater in both dark brown skin and eyes than in pale skin and eyes with light-colored irises [1, 2]. Melanin is a light absorbing polymer which has many protective functions in vertebrates, including camouflage, protection from damaging solar ultraviolet (UV) A and B irradiation, and thermoregulation.

The transformation of melanocytes gives rise to melanoma. Prevalence and incidence of cutaneous and uveal melanomas vary between ethnic groups and geographical areas. Caucasian people are most affected than Asians or Africans [3, 4] and in Europe, there is a south to north increasing incidence. For instance, the people with fair eyes and fair skin and those with an inability to tan are more predisposed to cutaneous and ocular melanomas [5].

2. Skin melanoma

2.1. Introduction

Cutaneous malignant melanoma is a deadly form of skin cancer which accounts for 1.6% of all diagnosed cancers. Its incidence has dramatically increased

in white populations over the past several decades (World Health Organization). Early-stage skin localized malignant melanoma can be cured with surgery. However, when it has spread, metastatic melanoma has a poor prognosis.

Major breakthroughs were realized a decade ago in the treatment of cutaneous metastatic melanoma with newer types of immunotherapy and targeted therapies (BRAF, MEK inhibitors) and immunotherapies (anti-CTLA4, anti-PD1). They have allowed for the first time increased in overall survival of patients. However clinical responses are either transient or limited to restricted subsets of melanoma patients, and most patient relapse [6]. Thus, cutaneous melanoma is still a fatal disease that we need to better understand to improve treatment efficiency and achieve long lasting clinical responses. Thus far, the early detection of potentially dangerous lesions remains the best strategy to reduce the tumor burden of advanced disease and for the optimal clinical outcome of patients suffering from cutaneous melanoma.

2.2. Genetic alterations

Cutaneous melanoma progression requires a combination of multiple environmental and (epi)genetic hits. Large-scale genomic studies in cutaneous melanomas established that UV radiation of sunlight accounts for 46% of driver mutations [7, 8]. Furthermore, these studies highlighted the recurrent somatic oncogenic mutations in the serine/threonine kinase BRAF (59–66% of the cases) [9, 10] and in the small GTPase NRAS (15–20% of the cases) as well as mutations in NF1 (14% of the cases). These genetic alterations demonstrated the importance of the ERK

signaling pathway in the disease and led to the classification of cutaneous melanomas into four subtypes, with the triple wild-type [11]. The dissection of the molecular mechanisms involved in cutaneous melanoma also showed multiple other alterations triggering activation of a broad range of signaling pathways. It is worth noting that oncogenic BRAF or NRAS mutations on their own do not necessarily translate into cutaneous malignant melanoma development. Indeed, in humans, the BRAF^{V600E} oncogenic mutation is frequently detected in common acquired nevi (80% of the cases), and NRAS^{Q61K/R} is frequently found (80% of the cases) in congenital melanocytic nevi [12]. Melanocytic nevi are considered as senescent lesions, which once formed, can remain static for decades and not progress to malignancy, unless they are coupled with other alterations, such as loss of p16^{Ink4a}, p53 or PTEN [13–15]. Cutaneous melanoma originates from a nevus in 25% of the cases.

In approximately 10% of cases, cutaneous melanomas occur in a familial context, and are associated with rare highly penetrant germline mutations in cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 2A (*CDKN2A*), a gene that codes for two different tumor suppressors (*p16^{INK4a}* and *p14^{ARF}*), *CDK4* and BRCA1-associated protein 1 (*BAP1*). The susceptibility alleles, such as *p16^{INK4A}*, can act as modifiers of somatic mutations and dramatically influence the onset of the disease. More common low to moderate risk genes, including melanocortin-1 receptor (*MC1R*) and microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*), the master gene of melanocyte homeostasis were also reported to favor melanoma development [16–18]. The identification of melanoma susceptibility genes helps to better predict, which patients might benefit from increased surveillance and earlier detection of potentially dangerous lesions.

2.3. *MITF^{E318K}, a new cutaneous melanoma susceptibility gene*

By sequencing the entire coding sequence of *MITF* in patients presenting either with a strong family history of cutaneous malignant melanoma or multiple primary cutaneous melanomas, we have identified a recurrent germline missense substitution

p.E318K (c.952G > A) in *MITF*, occurring at a significantly higher frequency in the at-risk patients than in the control population [18]. This mutation was also disclosed by other groups at similar allele frequency [16,17]. The *MITF^{E318K}* mutation has been associated with an increased number of nevi/atypical nevi, which represent a major melanoma risk factor [19].

MITF^{E318K} also confers a higher risk of developing renal carcinoma, highlighting for the first time a genetic predisposition common to melanoma and kidney cancers [18].

Team's work uncovered that the E318K mutation severely impairs *MITF* sumoylation, a ubiquitination-like post-translational modification. The ligase involved in the SUMO modification of *MITF* has not been identified. However, *MITF* has previously been demonstrated to bind PIAS3, which might function as a SUMO ligase for *MITF* [20]. The inhibition of *MITF* sumoylation does not appear to affect *MITF* cellular localization or stability; but to change its transcriptional activity and target sequences, which could explain *MITF* pro-tumoral effects. Indeed, compared to wild-type *MITF* (*MITF^{WT}*), *MITF^{E318K}* is redistributed over the genome on a larger repertoire of low-affinity genomic sequences [18].

To better understand how *MITF^{E318K}* mediates pro-tumoral effects, a new *Mitf^{E318K}* mouse model was built [21]. An increased number of nevi due to the presence of *Mitf^{E318K}* was observed in the oncogenic BRAF^{V600E} setting. Analysis of murine tumors revealed that the expression of *Mitf^{E318K}* prevents the onset of the BRAF^{V600E} oncogene-induced senescence program in melanocytes and promotes their malignant transformation. Furthermore, cultured *MITF^{E318K}* melanocytes proliferate faster than those *MITF^{WT}* [21].

Basically, melanocytes that constitutively express *MITF^{E318K}* could have an altered ability to enter senescence upon the induction of oncogenic BRAF^{V600E} due to high proliferating rates, leading to an increased nevus number. In humans, environmental stresses that influence cutaneous melanoma progression, such as UV radiation and hypoxia, trigger the production of reactive oxygen species [22,23], which may alter the process of sumoylation and senescence, and favor tumorigenesis [24,25].

2.4. Clinical application

The SUMO pathway has been considered a potential target in cancer treatment, yet sumoylation inhibition might not be appropriate for cutaneous melanoma as it is expected to reduce MITF sumoylation and to contribute to tumor progression [18, 21]. Given that p16^{INK4A} inhibits senescence evasion, which is critical to the process of cellular transformation, the restoration of genetic alterations and the epigenetic reactivation of *CDKN2A* may represent strategies for the prevention and therapy of melanoma [26].

Cutaneous melanoma cells have already a powerful pro-senescence signal that exists in dormancy via the activation of BRAF or NRAS that discerns the cancer cells from their normal counterparts and might be exploited to improve the treatment.

More importantly, our work had a direct impact on patient care. The finding that MITF^{E318K} mutation confers to carriers an increased risk of developing melanoma has led in 2015 to new national recommendations for the diagnosis of genetic predisposition to cutaneous melanoma and for the management of people at risk. This may allow the early diagnostic of skin lesions in MITF^{E318K} patients and improve their outcome [27].

If melanocytes are mainly studied for their role in the skin, they also exist in the eye (iris where they control pigmentation and uvea whose role remain unknown), the inner ear (where they are suspected of having a role in hearing), and certain internal tissues (meninges, heart, or digestive system... where their role remains less well studied).

3. Uveal melanoma

3.1. Introduction

Ocular melanoma is a rare form of melanoma (5% of the cases), that arises from melanocytes in the conjunctiva (5%) or the uvea (95%). Among uveal melanomas, which also comprise iris and ciliary body melanomas, choroidal melanomas represent the vast majority (95% cases). While conjunctiva melanoma is primarily related to UV exposure, previous whole genome/exome sequencing of human uveal melanomas indicated no evidence of mutational signatures related to UV radiation [28–30]. To

date, it is not clear what causes choroidal melanoma. A recent study however demonstrated the existence of a UV radiation signature in iris tumors, associated with a high mutation burden [31]. Compared to the choroid, which is known as the posterior uvea, the iris is the anterior part of the uveal tract and is thus directly exposed to sunlight. This opens up new therapeutic perspectives for iris melanomas especially with immunotherapies, which are thought to be more effective in cancers that are more mutated [32].

Choroidal melanoma usually presents as a pigmented nodular mass in the eye fundus, growing toward the vitreous space with a typical mushroom shape. Symptoms of choroidal melanoma include blurred vision and seeing flashing lights and shadows, but most of them are initially completely asymptomatic and are diagnosed by an ophthalmologist during a routine sight test, accounting for their frequent late-stage diagnosis. Despite successful treatment of the primary lesions, up to 50% of choroidal melanoma patients will develop metastases, mainly to the liver. Metastatic choroidal melanomas are refractory to all therapies, yet bispecific fusion protein tebentafusp (IMC-gp100), has recently been reported to improve the overall survival of HLA-A*02:01 positive patients suffering from metastatic choroidal melanomas. Tebentafusp has been FDA approved. Nonetheless, overall, 90% of patients will nevertheless die within 6 months after diagnosis of metastases [33], highlighting an urgent need for efficient therapeutic strategies.

3.2. Genomic alterations

Choroidal melanoma and cutaneous melanoma both originates from neural-crest derived melanocytes, but they show different characteristics, including significant differences in genetic alterations, metastatic sites and therapeutic response. In contrast to cutaneous melanomas, which is driven by mutation in BRAF or NRAS and to a lesser extent in NF1, the primary oncogenic driver of choroidal melanoma is a mutant form of the heterotrimeric G-protein alpha subunit GNAQ or its closely related homolog GNA11 [34]. Additional rare mutations in *CYSLTR2* and *PLCB4*, which function upstream and downstream of GNAQ/GNA11, respectively, are also found [28, 35].

In addition to these oncogenic drivers, mutations in the ubiquitin hydrolase BAP1 [36], in the splicing factor SF3B1 or in the translation initiation factor EIF1AX contribute to choroidal melanoma progression. BAP1 loss of function is associated with a high metastatic risk and a poor prognosis. Choroidal melanoma is also characterized by recurring chromosomal abnormalities, one of the most important is loss of one copy of chromosome 3, which carries BAP1 and is considered the most significant marker of poor outcome.

Of note, primary choroidal melanomas are separated into two classes according to transcriptomic profiles. Class 1 is predictive of poor metastatic risk and long-term survival, while class 2 is associated with a high risk of distant metastasis and a dismal prognosis [37].

Mechanistically, downstream of GNAQ/11, ARF6 orchestrates the activation of a broad range of events, including the activation of the PKC, PI3K/AKT/mTOR, ERK/MAPK and HIPPO/YAP signaling pathways [38]. Compelling recent data suggest that the ERK module is the pivotal signaling axis in choroidal melanoma cell proliferation [10, 39], bringing attention back to MEK and ERK inhibitors as rational choroidal melanoma treatment. Despite advance in the molecular characterization that has allowed a better insight into the pathogenesis of choroidal melanoma, thus far none of the studies allowed to identify efficient therapeutic targets to prevent or eliminate metastases. Choroidal melanomas are resistant to all systemic therapies including targeted therapies and immunotherapies that improved the overall survival of patients with metastatic cutaneous melanoma.

3.3. *Identification of intratumoral heterogeneity in choroidal melanoma*

The fact that at diagnosis, only 1–3% of the patients have detectable metastatic choroidal melanoma, and that metastases develop in 50% of patients within a median time of 2.4 years, imply that cell subpopulations responsible for metastases, and patient death, disseminate early from the primary tumor.

In line with this, solid tumors are heterogeneous neoplasms comprising within the same tumor, malignant cells that can vary in molecular and phenotypic profiles over time and space [40]. This intratu-

mor heterogeneity (ITH) has been recognized in numerous cancers as a major source of metastatic dissemination and therapy resistance.

In choroidal melanoma, ITH is supported by the co-existence in some tumors of epithelioid and spindle shaped cells. The survival rate at 15 years is almost three times lower in patients with epithelioid cell tumors than in those with spindle cell tumors. Cells with these different morphological presentations might each exhibit distinct gene expression patterns as a result of different transcriptional states [41, 42].

Using single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) of 7890 single cells from six different primary choroidal melanomas, we have uncovered an ITH at the genomic and transcriptomic level in a subset of human choroidal melanoma samples [43]. Furthermore, in addition to canonical copy number variations commonly identified in choroidal melanomas, the single-cell approach revealed new cryptic genomic alterations that cannot be detected at the bulk level by classical comparative genomic hybridization [43, 44]. For instance, in one tumor classified as having a good prognosis due to chromosome 3 disomy, a subset (2–5%) of cells exhibits chromosome 3 loss, which could represent a reservoir of poor prognosis cells that will give rise to hepatic metastasis responsible of patient death. Therefore, the single-cell approach could be more efficient than current standard histological and genomic analyses for predicting metastases, and thus could be beneficial for patient follow-up.

Using SCENIC (Single-Cell rEgulatory Network Inference and Clustering), a program that monitors the activity of the transcription factors and their predictive downstream target genes [45], distinct transcriptional cell states were inferred from our scRNA-seq dataset, among which a gene regulatory network underlying an invasive and poor prognosis state in part driven by the transcription factor HES6. HES6 is a poorly studied member of the HES/HEY family of transcription factors in the NOTCH signaling pathway. Its expression is enhanced in various tumors and it represents a poor prognostic marker in prostate and colorectal cancers [46]. Consistent with these observations, analysis of public data shows that HES6 expression is associated with a poor prognosis (TCGA UM dataset).

HES6 heterogenous expression has been validated within primary human choroidal melanomas, which

further unveils the existence of the cells, even in small quantities, conveying a dismal prognosis in tumors diagnosed with a favorable outcome using bulk analyses. At the cellular and molecular levels, HES6 expression is associated with an epithelioid phenotype and is inversely correlated with BAP1 level, two markers of high metastatic risk and poor prognosis. We showed that depletion of HES6 impairs proliferation, migration and metastatic dissemination, indicating that HES6 is a valid prognosis biomarker and potential therapeutic target in choroidal melanoma. Altogether, the molecular characterization of ITH and the identification of transcriptional cell states in choroidal melanoma enables the identification of subpopulation(s) prone to metastatic dissemination and revealed new biomarkers for accurate prognosis and potential therapeutic targets.

4. Conclusion and perspectives

Cutaneous melanoma, a cancer that was difficult to treat, has provided an example for how results from basic research have been translated into targeted therapy. This holds the promise that a better understanding of the molecular mechanisms and identification of frailties, may render possible to defeat metastatic choroidal melanoma and prolong patient overall survival.

ITH appears to be an unavoidable problem in solid cancer. Clearly, this research field is still in its infancy, and faces immense challenges including the translation to clinical practice and the rational therapeutic design. In cutaneous melanoma, research begins to tackle this problem seriously and identify therapeutic targets to delay the process of resistance [47].

In choroidal melanoma, conventional bulk approaches (sequencing and arrays) which provide only an average expression signal or mutation profile for a group of cells have failed to identify valuable therapeutic targets. Single-cell analysis approaches are expected to provide crucial information for the design of rational therapeutic options.

The single-cell analysis that we conducted in primary choroidal melanomas offers an unprecedented view of their heterogeneity, identifies bona fide biomarkers for cells with metastatic capacity in the primary tumor, and reveals targetable modules driving growth and metastasis formation.

The original and innovative aspects of our work are the identification for the first time of a poor prognosis signature with high clinical relevance [43, 48], that allows to detect rare cells expressing this signature in choroidal melanomas classified of good prognosis [43]. These cells may be missed by classical bulk sequencing because their abundance falls below the lower limit of sensitivity, while they represent the functional cell subsets that will outgrowth and drive the metastatic dissemination that is responsible of patient' death.

Crucially, tumors are complex ecosystems, where cancer cells, and diverse cell types from their microenvironment engage in dynamic spatiotemporal crosstalk that allows cancer progression, adaptation and evolution. This highlights the urgent need to gain insight into ITH in uveal melanomas and its intersection with the microenvironment to overcome treatment failure and improve patient prognosis.

Acknowledgements

I thank deeply the members of the French Académie des Sciences for receiving the 2021 Dandrimont-Bénicourt award. I have a special thought for the previous recipients of this award, and I am honored to be one of these laureates.

Research is a human adventure, “*Alone, I go faster; together, we go further*” (African proverb). I share this price with Robert Ballotti. I also express special thanks to Karine Bille, who has been working as a team's engineer for almost the last 30 years. I'm immensely grateful to our collaborators and our funding sources in particular l'Institut National du Cancer, Fondation ARC, La Société Française de Dermatologie, and La Ligue nationale contre le cancer. I have a special thought to professor Axel Kahn. Finally, I dedicate this review to all members of the “Biology and pathologies of melanocytes” team. I'm very proud of the engagement of everyone in making good science, which aims is to benefit patients.

French version

1. Biologie et pathologie des mélanocytes humains

Les mélanocytes dérivent de la crête neurale sous forme de cellules indifférenciées, appelées mélanoblastes, qui migrent vers diverses parties du corps humain, comme la peau, les yeux, les méninges, le cœur et la cochlée. Le rôle et la fonction des mélanocytes sont bien établis dans la peau, mais pas dans d'autres emplacements anatomiques. La fonction physiologique des mélanocytes est de synthétiser la mélanine. Deux types de mélanine sont produits, l'eumélanine, pigment de couleur brune/noire, et la phéomélanine, pigment de couleur jaune/orange. La proportion de ces deux types de mélanine définit les différentes couleurs de peaux, cheveux et yeux : le rapport eumélanine/phéomélanine est significativement plus important dans la peau foncée et les yeux brun que dans la peau pâle et les yeux avec un iris de couleur claire [1, 2]. La mélanine est un polymère absorbant la lumière qui a de nombreuses fonctions protectrices chez les vertébrés, notamment le camouflage, la protection contre l'effet nocif des rayonnements ultraviolets (UV) A et UVB du soleil et la thermorégulation.

La transformation des mélanocytes donne naissance au mélanome. La prévalence et l'incidence des mélanomes cutanés et uvéaux varient selon les groupes ethniques et les zones géographiques. Les Caucasiens sont plus touchés que les Asiatiques ou les Africains [3, 4] et en Europe, on observe une augmentation de l'incidence du sud au nord. Par exemple, les personnes aux yeux et à la peau clairs et celles qui bronzent peu sont plus prédisposées aux mélanomes cutanés et oculaires [5].

2. Mélanome de la peau

2.1. Introduction

Le mélanome malin cutané est une forme mortelle de cancer de la peau qui représente 1,6% de tous les cancers diagnostiqués. Son incidence a augmenté de façon spectaculaire dans les populations caucasiennes au cours des dernières décennies (Organisation mondiale de la santé). Le mélanome malin localisé à la peau peut être guéri par la chirurgie s'il est détecté à un stade précoce. Cependant, à un stade tar-

dif, lorsqu'il s'est propagé, le mélanome cutané métastatique a un mauvais pronostic.

Des percées majeures ont été réalisées il y a une dizaine d'années dans le traitement du mélanome cutané métastatique grâce aux thérapies ciblées (inhibiteurs de BRAF et MEK) et aux immunothérapies (anti-CTLA4, anti-PD1). Ils ont permis pour la première fois d'augmenter la survie globale des patients. Cependant, les réponses cliniques sont soit transitoires, soit limitées à un groupe restreint de patients atteints de mélanome, et la plupart des patients rechutent [6]. Le mélanome cutané reste donc une maladie mortelle que nous devons mieux comprendre pour améliorer l'efficacité du traitement et obtenir des réponses cliniques durables. Jusqu'à présent, la détection précoce des lésions potentiellement dangereuses reste la meilleure stratégie pour un pronostic optimal des patients souffrant de mélanome.

2.2. Altérations génétiques

Le mélanome cutané résulte de l'effet d'une combinaison de facteurs environnementaux et (épi)généétiques. Des études génomiques à grande échelle ont établi que le rayonnement UV de la lumière solaire est à l'origine de 46% des mutations conductrices dans les mélanomes cutanés [7, 8]. De plus, ces études ont mis en évidence les mutations somatiques oncogènes récurrentes dans la sérine/thréonine kinase BRAF (59–66% des cas) [9, 10] et dans la petite GTPase NRAS (15–20% des cas) ainsi que des mutations dans NF1 (14% des cas). Ces altérations génétiques ont démontré l'importance de la voie de signalisation ERK dans la maladie et ont conduit à la classification du mélanome cutané en quatre sous-types, avec le type « triple sauvage » (sauvage pour les 3 gènes) [11]. La dissection des mécanismes moléculaires impliqués dans le mélanome cutané a également montré de multiples autres altérations déclenchant l'activation d'un large éventail de voies de signalisation. Il convient de noter que les mutations oncogènes BRAF ou NRAS ne se traduisent pas nécessairement, à elles seules, par l'induction d'un mélanome cutané. En effet, chez l'homme, la mutation oncogène BRAF^{V600E} est fréquemment détectée dans les nævi communs acquis (80% des cas), et NRAS^{Q61K/R} est fréquemment

trouvé (80% des cas) dans les nævi congénitaux [12]. Les nævi sont considérés comme des lésions sénescences qui, une fois formées, peuvent rester statiques pendant des décennies et ne pas évoluer vers la malignité, à moins qu'elles ne soient associées à d'autres altérations, telles que la perte de p16^{Ink4a}, p53 ou PTEN [13–15]. Le mélanome cutané a pour origine un nævus dans 25% des cas.

Dans environ 10% des cas, les mélanomes cutanés surviennent dans un contexte familial et sont associés à de rares mutations germinales hautement pénétrantes dans l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante 2A (*CDKN2A*), un gène qui code pour deux gènes suppresseurs de tumeurs (*p16^{INK4a}* et *p14^{ARF}*), *CDK4* et la protéine associée à *BRCAl* (*BAP1*). Les allèles de susceptibilité, tels que *p16^{INK4A}*, peuvent agir comme des modificateurs de mutations somatiques et influencer considérablement l'apparition de la maladie. Des allèles fréquents de gènes de la pigmentation, en particulier ceux du gène du récepteur de la mélanocortine 1 (*MC1R*) ou du facteur de transcription associé à la microphthalmie (*MITF*), le gène maître de l'homéostasie des mélanocytes, confèrent un risque faible à modéré de développer un mélanome cutané [16–18]. L'identification des gènes de susceptibilité permet de mieux prédire quels patients pourraient bénéficier d'une surveillance accrue et d'une détection plus précoce des lésions potentiellement dangereuses.

2.3. *MITF^{E318K}, un nouveau gène de susceptibilité au mélanome cutané*

En séquençant l'ensemble de la séquence codante du gène *MITF* chez des individus présentant des antécédents familiaux de mélanome cutané malin ou de mélanomes cutanés primaires multiples, nous avons identifié une substitution germinale récurrente faux-sens p.E318K (c.952G > A) dans *MITF*, survenant à une fréquence significativement plus élevée chez les individus à risque que dans la population témoin [18]. Cette mutation a également été révélée à une fréquence allélique similaire par d'autres groupes [16, 17]. La mutation *MITF^{E318K}* a été associée à un nombre accru de nævi atypiques, qui représentent un facteur de risque majeur de mélanome [19].

MITF^{E318K} confère également un risque plus élevé de développer un carcinome rénal, mettant en évidence pour la première fois une prédisposition génétique commune aux mélanomes cutanés et aux cancers du rein [18].

Les travaux de l'équipe ont permis de découvrir que la mutation E318K diminue la sumoylation de *MITF*, une modification post-traductionnelle de type ubiquitination. La ligase impliquée dans la modification de *MITF* par la protéine SUMO n'a pas été identifiée. Cependant, un travail a montré que *MITF* se lie à *PIAS3*, qui pourrait fonctionner comme une SUMO ligase de *MITF* [20]. L'inhibition de la sumoylation de *MITF* ne semble pas affecter sa localisation cellulaire ou sa stabilité, mais modifier son activité transcriptionnelle et ses séquences cibles, ce qui pourrait expliquer ses effets pro-tumoraux. En effet, comparé à la forme sauvage de *MITF* (*MITF^{WT}*), *MITF^{E318K}* est redistribué sur le génome sur un plus grand répertoire de séquences génomiques de faible affinité [18].

Pour mieux comprendre comment *MITF^{E318K}* induit ses effets pro-tumoraux, un nouveau modèle de souris *MITF^{E318K}* a été construit [21]. Une augmentation du nombre de nævus en présence de *MITF^{E318K}* et de la mutation oncogène *BRAF^{V600E}* a été observée. L'analyse des tumeurs murines a révélé que l'expression de *MITF^{E318K}* empêche le déclenchement du programme de sénescence induit par l'oncogène *BRAF^{V600E}* dans les mélanocytes et favorise leur transformation maligne. De plus, les mélanocytes en culture exprimant *MITF^{E318K}* prolifèrent plus rapidement que ceux exprimant *MITF^{WT}* [21].

Fondamentalement, les mélanocytes qui expriment de manière constitutive *MITF^{E318K}* pourraient avoir une capacité altérée à entrer en sénescence lors de l'induction de l'oncogène *BRAF^{V600E}* en raison de leur taux de prolifération élevé, ce qui entraînerait une augmentation du nombre de nævus. Chez l'homme, les stress environnementaux qui influencent la progression du mélanome cutané, comme les radiations UV et l'hypoxie, déclenchent la production d'espèces réactives de l'oxygène [22, 23], qui peuvent altérer le processus de sumoylation et de sénescence, et favoriser la tumorigénèse [24, 25].

2.4. Application clinique

La voie SUMO a été considérée comme une cible potentielle dans le traitement du cancer, mais l'inhibition de la sumoylation pourrait ne pas être appropriée dans le cadre du mélanome cutané, car elle devrait réduire la sumoylation de MITF et contribuer à sa progression [18, 21]. Étant donné que p16^{INK4A} inhibe le dépassement de la sénescence, qui est essentiel au processus de transformation cellulaire, la restauration des altérations génétiques et la réactivation épigénétique de *CDKN2A* peuvent représenter des stratégies pour la prévention et le traitement du mélanome [26]. Les cellules de mélanome ont déjà un puissant signal pro-sénescence qui existe en dormance via l'activation de BRAF ou NRAS qui différencie les cellules cancéreuses des cellules normales et qui pourrait être exploité pour améliorer le traitement actuel du mélanome.

Plus important encore, notre travail a eu un impact direct sur les soins aux patients. La découverte que la mutation MITF^{E318K} confère aux porteurs un risque accru de développer un mélanome a conduit en 2015 à de nouvelles recommandations nationales pour le diagnostic de prédisposition génétique au mélanome cutané et pour la prise en charge des personnes à risque. Celles-ci pourraient permettre le diagnostic précoce des lésions cutanées chez les individus porteurs de la mutation MITF^{E318K} et un meilleur pronostic [27].

Si les mélanocytes sont principalement étudiés pour leur rôle dans la peau, ils existent également dans l'œil (iris où ils contrôlent la pigmentation et uvée dont le rôle reste inconnu), l'oreille interne (où ils sont suspectés d'avoir un rôle dans l'audition), et certains tissus internes (méninges, cœur, ou système digestif... où leur rôle reste moins bien étudié).

3. Mélanome uvéal

3.1. Introduction

Le mélanome oculaire est une forme rare de mélanome (5% des cas), qui provient des mélanocytes de la conjonctive (5%) ou de l'uvée (95%). Parmi les mélanomes uvéaux, qui comprennent également les mélanomes de l'iris et du corps ciliaire, les mélanomes choroïdiens représentent la grande majorité

(95% des cas). Alors que le mélanome de la conjonctive est principalement lié à l'exposition aux UV, le séquençage du génome/exome de mélanomes uvéaux humains n'a indiqué aucun signe de signature mutationnelle liée aux UV [28–30]. À ce jour, les causes du mélanome choroïdien ne sont pas claires. Une étude récente a cependant démontré l'existence d'une signature UV dans les mélanomes de l'iris, associée à une charge mutationnelle élevée [31]. Par rapport à la choroïde qui est connue comme l'uvée postérieure, l'iris est la partie antérieure du tractus uvéal et est donc directement exposé à la lumière du soleil. Cela ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les mélanomes de l'iris, notamment avec les immunothérapies, qui seraient plus efficaces dans les cancers avec une charge mutationnelle plus élevée [32].

Le mélanome choroïdien se présente généralement comme une masse nodulaire pigmentée dans le fond de l'œil, se développant vers l'espace vitré avec une forme typique de champignon. Les symptômes du mélanome choroïdien comprennent une baisse d'acuité visuelle, une tache dans le champ visuel et des flashes à répétition, mais la plupart sont initialement complètement asymptomatiques et sont diagnostiqués par un ophtalmologiste lors d'un examen de routine, ce qui explique leur diagnostic tardif fréquent. Malgré un traitement réussi des lésions primaires, jusqu'à 50% des patients atteints de mélanome choroïdien développeront des métastases, principalement au foie. Les métastases sont réfractaires à tous les traitements, mais il a récemment été montré que la protéine de fusion bispécifique tebentafusp (IMC-gp100) améliore la survie globale des patients HLA-A*02 : 01 positifs. Le tebentafusp a été approuvé par la FDA. Quoiqu'il en soit, globalement, 90% des patients décéderont dans les 6 mois suivant le diagnostic des métastases [33], soulignant un besoin urgent de stratégies thérapeutiques efficaces pour traiter le mélanome choroïdien.

3.2. Altérations génomiques

Le mélanome uvéal et le mélanome cutané sont tous deux issus de mélanocytes dérivés de la crête neurale, mais ils présentent des caractéristiques différentes, notamment des différences significatives dans les altérations génétiques, les sites métastatiques et la réponse thérapeutique. Contrairement au mélanome cutané, qui est dû à une mutation de BRAF ou NRAS

et, dans une moindre mesure, de NF1, le principal facteur oncogène du mélanome choroïdien est une forme mutante de la sous-unité alpha de la protéine G hétérotrimérique GNAQ ou de son homologue GNA11 [34]. D'autres mutations rares dans CYSLTR2 et PLCB4, qui fonctionnent respectivement en amont et en aval de GNAQ/GNA11, sont également trouvées [28, 35].

En plus de ces facteurs oncogènes, des mutations dans l'ubiquitine hydrolase BAP1 [36], dans le facteur d'épissage SF3B1 ou dans le facteur d'initiation de la traduction EIF1AX contribuent à la progression du mélanome choroïdien. La perte de fonction de BAP1 est associée à un risque métastatique élevé et à un mauvais pronostic. Le mélanome choroïdien est également caractérisé par des anomalies chromosomiques récurrentes, l'une des plus importantes étant la perte d'une copie du chromosome 3, qui porte BAP1 et qui est considérée comme le marqueur de mauvais pronostic le plus significatif.

Il convient de noter que les mélanomes choroïdiens primaires sont séparés en deux classes selon les profils transcriptomiques. La classe 1 est prédictive d'un faible risque métastatique et d'une survie à long terme, tandis que la classe 2 est associée à un risque élevé de métastases à distance et à un pronostic sombre [37].

D'un point de vue mécanistique, en aval de GNAQ/11, ARF6 orchestre l'activation d'un large éventail d'événements, notamment l'activation des voies de signalisation PKC, PI3K/AKT/mTOR, ERK/MAPK et HIPPO/YAP [38]. Des données récentes convaincantes suggèrent que le module ERK est l'axe de signalisation pivot dans la prolifération des cellules de MU [10, 39], ramenant l'attention sur les inhibiteurs de MEK et ERK comme traitements rationnels du mélanome choroïdien.

Malgré les progrès dans la caractérisation moléculaire du mélanome choroïdien qui ont permis de mieux comprendre sa pathogenèse, aucune de ces études n'a permis jusqu'à présent d'identifier des cibles thérapeutiques efficaces pour prévenir ou éliminer les métastases. Les mélanomes choroïdiens sont résistants à toutes les thérapies systémiques, y compris les thérapies ciblées et les immunothérapies qui ont amélioré la survie globale des patients atteints de mélanome cutané métastatique.

3.3. *Identification de l'hétérogénéité intratumorale dans le mélanome choroïdien*

Le fait qu'au moment du diagnostic, seuls 1 à 3% des patients atteints d'un mélanome choroïdien présentent des métastases, et que des métastases se développent chez 50% des patients dans un délai médian de 2,4 ans, implique que des sous-populations cellulaires responsables des métastases qui vont entraîner la mort du patient, se disséminent précocement à partir de la tumeur primaire.

En accord avec cette idée, les tumeurs solides sont des néoplasmes hétérogènes comprenant, au sein d'une même tumeur, des cellules malignes dont les profils moléculaires et phénotypiques peuvent varier dans le temps et l'espace [40]. Cette hétérogénéité intratumorale (HIT) a été reconnue dans de nombreux cancers comme une source majeure de dissémination métastatique et de résistance aux traitements.

Dans le mélanome choroïdien, l'hypothèse d'une HIT est soutenue par la coexistence dans certaines tumeurs de cellules épithélioïdes et fusiformes. Le taux de survie à 15 ans est presque trois fois plus faible chez les patients atteints de tumeurs à cellules épithélioïdes que chez ceux atteints de tumeurs à cellules fusiformes. Les cellules avec l'une ou l'autre de ces morphologies pourraient chacune présenter des signatures d'expression génétique distinctes en raison d'états transcriptionnels différents [41, 42].

En utilisant le séquençage de l'ARN de 7890 cellules uniques (scrRNA-seq) provenant de six mélanomes choroïdiens primaires, nous avons découvert une HIT au niveau génomique et transcriptomique dans un sous-ensemble de mélanomes choroïdiens [43]. En plus des variations du nombre de copies communément identifiées dans les mélanomes choroïdiens, l'approche en cellule unique a révélé de nouvelles altérations génomiques cryptiques qui ne peuvent pas être détectées au niveau global par hybridation génomique comparative classique [43, 44]. Par exemple, dans une tumeur classée comme ayant un bon pronostic en raison de la disomie du chromosome 3, un sous-ensemble (2–5%) de cellules présente une perte du chromosome 3, ce qui pourrait représenter un réservoir de cellules de mauvais pronostic qui donneront naissance à des métastases hépatiques responsables du décès du patient. Par conséquent, l'approche en cellules uniques pourrait être plus efficace que les analyses histologiques et

génomiques standard actuelles pour prédire les métastases, et pourrait être bénéfique pour le suivi des patients.

À l'aide de SCENIC (Single-Cell rEgulatory Network Inference and Clustering), un programme qui détecte l'activité des facteurs de transcription et de leurs gènes cibles prédictifs en aval [45], des états cellulaires transcriptionnels distincts ont été déduits de notre ensemble de données scRNA-seq, parmi lesquels un réseau de régulation de gènes qui sous-tend un état invasif et de mauvais pronostic en partie dirigé par le facteur de transcription HES6. HES6 est un membre peu étudié de la famille des facteurs de transcription HES/HEY dans la voie de signalisation NOTCH. Son expression est augmentée dans diverses tumeurs et il représente un marqueur de mauvais pronostic dans les cancers de la prostate et colorectal [46]. En accord avec ces observations, l'analyse des données publiques montre que l'expression d'HES6 est associée à un mauvais pronostic (TCGA UM dataset).

L'expression hétérogène d'HES6 a été validée au sein de mélanomes choroïdiens humains primaires, et a confirmé l'existence de cellules, même en petite quantité, véhiculant un pronostic sombre dans des tumeurs diagnostiquées avec un pronostic favorable par une analyse globale. Aux niveaux cellulaire et moléculaire, HES6 est associé à un phénotype épithélioïde et est inversement corrélé à l'expression de BAP1, deux marqueurs de risque métastatique élevé et de mauvais pronostics. Nous avons montré que la déplétion d'HES6 réduit la prolifération, la migration et la dissémination métastatique, indiquant qu'HES6 est un biomarqueur de pronostic valable et une cible thérapeutique potentielle contre le mélanome choroïdien. Ainsi, la caractérisation moléculaire de l'HIT et l'identification des états transcriptionnels cellulaires dans le mélanome choroïdien ont permis d'identifier la ou les sous-populations sujettes à la dissémination métastatique et de révéler de nouveaux biomarqueurs pour un pronostic plus précis, et des cibles thérapeutiques potentielles.

4. Conclusion et perspectives

Le mélanome cutané, un cancer qui était difficile à traiter, a montré comment la recherche fondamentale a conduit au développement de thérapies ciblées. Ceci laisse présager qu'une meilleure compré-

hension des mécanismes moléculaires et l'identification des fragilités dans le mélanome choroïdien, peuvent rendre possible de vaincre cette maladie et de prolonger la survie globale des patients.

L'HIT semble être un problème inévitable dans les cancers solides. Il est clair que ce domaine de recherche n'en est qu'à ses débuts et qu'il doit faire face à d'immenses défis, notamment la traduction en pratique clinique pour une conception thérapeutique rationnelle. Dans le cas du mélanome cutané, la recherche commence à s'attaquer sérieusement à ce problème et à identifier des cibles thérapeutiques pour retarder le processus de résistance [47].

Dans le cas du mélanome uvéal, les approches conventionnelles globales (séquençage et puces) qui ne fournissent qu'un signal d'expression moyen ou un profil de mutation pour un groupe de cellules n'ont pas permis d'identifier des cibles thérapeutiques valables. Les approches d'analyse en cellule unique devraient fournir des informations cruciales pour la conception d'options thérapeutiques pertinentes.

Dans ce contexte, l'analyse en cellule unique que nous avons menée sur des mélanomes choroïdiens primaires offre une vue sans précédent de leur hétérogénéité, identifie de véritables biomarqueurs pour les cellules ayant une capacité métastatique dans la tumeur primaire, et révèle des modules ciblables conduisant à la croissance et à la formation de métastases.

Les aspects originaux et innovants de notre travail sont l'identification pour la première fois d'une signature de mauvais pronostic avec une pertinence clinique [43, 48], qui permet de détecter de rares cellules exprimant cette signature dans les mélanomes choroïdiens classés de bon pronostic [43]. Ces cellules peuvent être manquées par le séquençage classique global parce que leur nombre est inférieur à la limite de sensibilité des approches, alors qu'elles représentent les sous-ensembles de cellules fonctionnelles qui vont croître et conduire la dissémination métastatique qui est responsable de la mort des patients.

Les tumeurs sont des écosystèmes complexes, où les cellules cancéreuses et divers types cellulaires de leur microenvironnement s'engagent dans un dialogue spatio-temporel dynamique qui permet la progression, l'adaptation et l'évolution du cancer. Cela souligne le besoin urgent de mieux comprendre l'HIT

dans le mélanome uvéal et son intersection avec le microenvironnement pour surmonter l'échec du traitement et améliorer le pronostic des patients.

Remerciements

Je remercie vivement les membres de l'Académie des sciences pour l'attribution du prix Dandrimont-Bénicourt 2021. J'ai une pensée particulière pour les précédents récipiendaires de ce prix, et je suis honorée de faire partie de ces lauréats.

La recherche est une aventure humaine, « Seul, je vais plus vite; ensemble, nous allons plus loin » (proverbe africain). Je partage ce prix avec Robert Ballotti. J'adresse également des remerciements particuliers à Karine Bille, qui travaille comme ingénieur dans l'équipe depuis presque 30 ans. Je suis immensément reconnaissante à nos collaborateurs et aux organismes qui ont financièrement soutenu nos recherches en particulier l'Institut National du Cancer, la Fondation ARC, la Société Française de Dermatologie, et la Ligue nationale contre le cancer. J'ai une pensée particulière pour le professeur Axel Kahn. Enfin, je dédie cette revue à tous les membres de l'équipe « Biologie et pathologies des mélanocytes ». Je suis très fière de l'engagement de chacun à réaliser une science de qualité au bénéfice des patients.

References

- [1] K. Wakamatsu, D. N. Hu, S. A. McCormick, S. Ito, "Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides", *Pigment Cell Melanoma Res.* **21** (2008), p. 97-105.
- [2] J. L. Rees, "The genetics of sun sensitivity in humans", *Am. J. Hum. Genet.* **75** (2004), p. 739-751.
- [3] B. A. Krantz, N. Dave, K. M. Komatsubara, B. P. Marr, R. D. Carvajal, "Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease", *Clin. Ophthalmol.* **11** (2017), p. 279-289.
- [4] L. T. Xu *et al.*, "Uveal melanoma metastatic to the liver: Treatment trends and outcomes", *Ocul. Oncol. Pathol.* **5** (2019), p. 323-332.
- [5] G. Virgili *et al.*, "Incidence of uveal melanoma in Europe", *Ophthalmology* **114** (2007), p. 2309-2315.
- [6] E. E. Patton *et al.*, "Melanoma models for the next generation of therapies", *Cancer Cell* **39** (2021), p. 610-631.
- [7] M. F. Berger *et al.*, "Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations", *Nature* **485** (2012), p. 502-506.
- [8] E. Hodis *et al.*, "A landscape of driver mutations in melanoma", *Cell* **150** (2012), p. 251-263.
- [9] H. Davies *et al.*, "Mutations of the BRAF gene in human cancer", *Nature* **417** (2002), p. 949-954.
- [10] P. M. Pollock, P. S. Meltzer, "A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma", *Cancer Cell* **2** (2002), p. 5-7.
- [11] The Cancer Genome Atlas Network, "Genomic classification of cutaneous melanoma", *Cell* **161** (2015), p. 1681-1696.
- [12] P. M. Pollock *et al.*, "Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia", *Nat. Genet.* **34** (2003), p. 108-112.
- [13] V. K. Goel *et al.*, "Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice", *Oncogene* **28** (2009), p. 2289-2298.
- [14] D. Dankort *et al.*, "Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma", *Nat. Genet.* **41** (2009), p. 544-552.
- [15] J. Ackermann *et al.*, "Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background", *Cancer Res.* **65** (2005), p. 4005-4011.
- [16] S. Yokoyama *et al.*, "A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma", *Nature* **480** (2011), p. 99-103.
- [17] P. Ghorzo *et al.*, "Prevalence of the E318K MITF germline mutation in Italian melanoma patients: associations with histological subtypes and family cancer history", *Pigment Cell Melanoma Res.* **26** (2013), p. 259-262.
- [18] C. Bertolotto *et al.*, "A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma", *Nature* **480** (2011), p. 94-98.
- [19] R. A. Sturm *et al.*, "Phenotypic characterization of nevus and tumor patterns in MITF E318K mutation carrier melanoma patients", *J. Invest. Dermatol.* **134** (2014), p. 141-149.
- [20] A. Sonnenblick, C. Levy, E. Razin, "Interplay between MITF, PIAS3, and STAT3 in mast cells and melanocytes", *Mol. Cell Biol.* **24** (2004), p. 10584-10592.
- [21] C. Bonet *et al.*, "Deciphering the role of oncogenic MITFE318K in senescence delay and melanoma progression", *J. Nat. Cancer Inst.* **109** (2017), article no. djw340.
- [22] C. Jhappan, F. P. Noonan, G. Merlino, "Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma", *Oncogene* **22** (2003), p. 3099-3112.
- [23] B. Bedogni, M. B. Powell, "Skin hypoxia: a promoting environmental factor in melanomagenesis", *Cell Cycle* **5** (2006), p. 1258-1261.
- [24] G. Bossis *et al.*, "The ROS/SUMO axis contributes to the response of acute myeloid leukemia cells to chemotherapeutic drugs", *Cell Rep.* **7** (2014), p. 1815-1823.
- [25] L. L. Scurr, S. Haferkamp, H. Rizos, "The role of sumoylation in senescence", *Adv. Exp. Med. Biol.* **963** (2017), p. 215-226.
- [26] R. Zhao, B. Y. Choi, M. H. Lee, A. M. Bode, Z. Dong, "Implications of genetic and epigenetic alterations of CDKN2A (p16(INK4a)) in cancer", *EBioMedicine* **8** (2016), p. 30-39.
- [27] M. F. Avril *et al.*, "Recommendations for genetic testing and management of individuals genetically at-risk of cutaneous melanoma", *Ann. Dermatol. Venereol.* **142** (2015), p. 26-36.
- [28] P. Johansson *et al.*, "Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in PLCB4", *Oncotarget* **7** (2016), p. 4624-4631.
- [29] B. Royer-Bertrand *et al.*, "Comprehensive genetic landscape of uveal melanoma by whole-genome sequencing", *Am. J. Hum. Genet.* **99** (2016), p. 1190-1198.

- [30] S. J. Furney *et al.*, “SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma”, *Cancer Discov.* **3** (2013), p. 1122-1129.
- [31] P. A. Johansson *et al.*, “Whole genome landscapes of uveal melanoma show an ultraviolet radiation signature in iris tumours”, *Nat. Commun.* **11** (2020), p. 1-8.
- [32] M. Yarchoan, A. Hopkins, E. M. Jaffee, “Tumor mutational burden and response rate to PD-1 inhibition”, *New Engl. J. Med.* **377** (2017), p. 2500-2501.
- [33] M. O’Hayre *et al.*, “The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer”, *Nat. Rev. Cancer* **13** (2013), p. 412-424.
- [34] J. Karlsson *et al.*, “Molecular profiling of driver events in metastatic uveal melanoma”, *Nat. Commun.* **11** (2020), article no. 1894.
- [35] A. R. Moore *et al.*, “Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor CYSLTR2 in uveal melanoma”, *Nat. Genet.* **48** (2016), p. 675-680.
- [36] J. W. Harbour *et al.*, “Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas”, *Science* **330** (2010), p. 1410-1413.
- [37] M. D. Onken, L. A. Worley, J. P. Ehlers, J. W. Harbour, “Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death”, *Cancer Res.* **64** (2004), p. 7205-7209.
- [38] J. H. Yoo *et al.*, “ARF6 is an actionable node that orchestrates oncogenic GNAQ Signaling in uveal melanoma”, *Cancer Cell* **29** (2016), p. 889-904.
- [39] J. Ma, L. Weng, B. C. Bastian, X. Chen, “Functional characterization of uveal melanoma oncogenes”, *Oncogene* **40** (2020), p. 806-820.
- [40] C. E. Meacham, S. J. Morrison, “Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity”, *Nature* **501** (2013), p. 328-337.
- [41] M. D. Onken *et al.*, “Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas”, *Cancer Res.* **66** (2006), p. 4602-4609.
- [42] E. A. Seftor *et al.*, “Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis”, *Clin. Exp. Metastasis* **19** (2002), p. 233-246.
- [43] C. Pandiani *et al.*, “Single-cell RNA sequencing reveals intratumoral heterogeneity in primary uveal melanomas and identifies HES6 as a driver of the metastatic disease”, *Cell Death Differ.* **28** (2021), p. 1990-2000.
- [44] M. A. Durante *et al.*, “Single-cell analysis reveals new evolutionary complexity in uveal melanoma”, *Nat. Commun.* **11** (2020), article no. 496.
- [45] S. Aibar *et al.*, “SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering”, *Nat. Methods* **14** (2017), p. 1083-1086.
- [46] A. Ramos-Montoya *et al.*, “HES6 drives a critical AR transcriptional programme to induce castration-resistant prostate cancer through activation of an E2F1-mediated cell cycle network”, *EMBO Mol. Med.* **6** (2014), p. 651-661.
- [47] F. Rambow *et al.*, “Toward minimal residual disease-directed therapy in melanoma”, *Cell* **174** (2018), p. 843-855, e19.
- [48] T. Strub *et al.*, “Translation of single-cell transcriptomic analysis of uveal melanomas to clinical oncology”, *Prog. Retin. Eye Res.* (2021), article no. 100968.