

Université de Montréal

Caractérisation des effets antiprolifératifs et pro-inflammatoires associés à une déplétion du coactivateur transcriptionnel PGC-1beta dans le mélanome

Par
Karl Laurin

Département de pharmacie
Faculté de pharmacie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise
En sciences pharmaceutiques
Option pharmacologie
Dépôt initial le 7 mai 2021

© Karl Laurin, 2021

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Caractérisation des effets antiprolifératifs et pro-inflammatoires associés à une
déplétion du coactivateur transcriptionnel PGC-1beta dans le mélanome**

Présenté par
Karl Laurin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Gaétan Mayer
Président-rapporteur

Simon-Pierre Gravel
Directeur de recherche

André Tremblay
Examineur externe

Résumé

Le mélanome est le cancer de la peau le plus mortel. Il est caractérisé par une grande hétérogénéité et une reprogrammation métabolique importante qui lui confère l'habileté de promouvoir des programmes immunosuppresseurs et de développer une résistance aux traitements. Cette capacité permet au mélanome d'agir sur le microenvironnement tumoral et d'échapper à l'immunosurveillance du système immunitaire. La famille des *peroxisome-proliferator activated receptor gamma coactivator 1* (PGC-1s) est un joueur clé du métabolisme cellulaire en régulant la biogenèse mitochondriale, la phosphorylation oxydative et la détoxification du stress oxydatif. Des études ont montré que l'expression de PGC-1 α module la fonction mitochondriale. Les fonctions de PGC-1 β et PRC, les 2 autres membres de cette famille, dans le mélanome restent largement inexplorées. Ce mémoire montre pour la première fois que l'expression des PGC-1s est non seulement associée à l'expression de plusieurs molécules pro-inflammatoires (IL-8, TNF, IL-1), mais aussi à l'expression de molécules immunosuppressives (CD73, PD-L2, Galectin-9) pouvant contrôler la réponse immunitaire. Par l'utilisation d'inhibiteurs ciblant des voies de signalisation de l'immunité innée, nous avons montré que la régulation de ces molécules s'effectue via MEK et IKK dans les cellules déplétées en PGC-1 β . La déplétion en PGC-1 β altère la fonction mitochondriale, induisant l'expression de p21 et l'arrêt du cycle cellulaire d'une manière soutenue et via un mécanisme indépendant des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Nos travaux montrent que les PGC-1s possèdent d'importantes fonctions immunitaires dans le mélanome qui peuvent potentiellement dicter la croissance tumorale, l'évasion cellulaire et la réponse aux thérapies anticancéreuses.

Mots-clé : mélanome, inflammation, immunosuppression, métabolisme, PGC-1s, cycle cellulaire, signalisation cellulaire

Abstract

Melanoma is the deadliest form of skin cancer. It is defined by great heterogeneity and extensive metabolic reprogramming which gives it the ability to promote immunosuppressive programs and develop therapy resistance. This ability allows melanoma to define the tumor microenvironment and escape the immunosurveillance of the immune system. The peroxisome-proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PGC-1s) family is a key player in cell metabolism by regulating mitochondrial biogenesis, oxidative phosphorylation and oxidative stress detoxification. Studies have shown that the expression of PGC-1 α is linked to increased mitochondrial function and the metastatic potential of melanoma. The functions of PGC-1 β and PRC, the other 2 members of this family, in melanoma remain largely unexplored. This thesis shows for the first time that the expression of PGC-1s is not only associated with the expression of several pro-inflammatory molecules (IL-8, TNF, IL-1 β) but also with the expression of immunosuppressive molecules (CD73, PD-L2, Galectin-9) which can control the immune response. Using inhibitors targeting innate immunity signaling pathways, we have shown that the regulation of these molecules occurs via MEK and IKK in PGC-1 β depleted melanoma cells. Depletion of PGC-1 β impairs mitochondrial function and leads to p21 induction and cell cycle arrest in a sustained manner by a reactive oxygen species (ROS)-independent mechanism. Our work shows that PGC-1s have important immune functions in melanoma that can potentially dictate tumor growth, cell evasion and response to cancer therapies.

Keywords: Melanoma, inflammation immunosuppression, metabolism, PGC-1s, cell cycle, signaling pathways

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste de figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xiv
1. Chapitre I : Introduction.....	2
1.1 La peau et ses maladies	2
1.2 Les cancers de la peau et le mélanome	4
1.2.1 Incidence des cancers de la peau	4
1.2.2 Description sommaire des différents types de cancers de la peau	5
1.3 Pathophysiologie moléculaire du mélanome.....	10
1.3.1 Le mélanocyte et la mélanogenèse	10
1.3.2 Facteurs de risque	11
1.3.3 Mutations fréquentes.....	14
1.3.4 Traitements disponibles	19
1.3.5 Résistance aux traitements et défis à surmonter	22
1.3.6 Hétérogénéité du mélanome	24
1.4 Les modifications métaboliques dans le mélanome et leur influence sur l'immunité	25
1.4.1 Remodelage métabolique et effet Warburg	25
1.4.2 La réponse immunitaire et son influence sur le microenvironnement tumoral	31
1.5 La famille des PGC-1s	37
1.5.1 Structure et domaines fonctionnels.....	37
1.5.2 Facteurs de transcriptions et récepteurs nucléaires ciblés par les PGC-1s .	39
1.5.3 Fonctions classiques et mécanismes d'activation.....	40
1.5.4 Régulation transcriptionnelle.....	41
1.5.5 Régulation post-traductionnelle et composés chimiques affectant les PGC-1s	43

1.5.6	Rôles émergents des PGC-1s	46
1.6	Implications du métabolisme cellulaire et des PGC-1s dans le développement du mélanome	46
1.6.1	Les mitochondries et l'immunogénicité du mélanome	46
1.6.2	Modifications métaboliques impliquant les PGC-1s	48
1.6.3	Rôle des PGC-1s dans le cycle cellulaire lent (<i>Slow cycling</i>) et la dédifférenciation cellulaire	49
1.7	Hypothèse et objectifs de recherche	50
2.	Chapitre II Article scientifique	53
3.	Chapitre III: Discussion	94
3.1	Le rôle des mitochondries dans la progression du mélanome.....	94
3.2	L'inflammation dans le mélanome : un allié ou un adversaire?	95
3.3	PGC-1 β comme cible thérapeutique du métabolisme du mélanome	97
3.4	Limites de l'étude.....	98
3.5	Perspectives	99
4.	Conclusion	100
	Bibliographie.....	102

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physiques des différents types de mélanome.....	7
Tableau 2 : Classification diagnostique pour la caractérisation du mélanome	8
Tableau 3 : Stades de progression médicale du mélanome	9
Tableau 4 : Échelle de Fitzpatrick et risque de cancer.....	12

Liste de figures

Figure 1 : Structures principales de la peau et de l'épiderme	3
Figure 2 : Rôles des voies de signalisation des MAPKs et PI3K-AKT dans le développement du mélanome et thérapies ciblant les mutations communes de ces voies	16
Figure 3 : Étapes de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative	28
Figure 4 : Principales voies de signalisation de l'immunité innée	34
Figure 5 : Domaines fonctionnels des PGC-1s.	39
Figure 6 : Principaux régulateurs et voies métaboliques impliquant les PGC-1s.....	43
Figure 7. Low PGC-1s expression is associated with an increase in immune response transcripts in human melanoma tumors and cell lines.....	73
Figure 8. PGC-1β knockdown has growth suppressive effects in human melanoma cell lines.....	74
Figure 9. PGC-1β knockdown induces an immunosuppressive and pro-inflammatory gene expression program in human melanoma cells.....	75
Figure 10. Identification of signaling pathways and transcription factors that mediate the immune response associated with PGC-1β depletion in melanoma cells.	76
Figure 11 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus.....	101

Liste des abréviations

ACTH	Hormone corticotrope
AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AKT	Protéine kinase B
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP-1	Activator protein 1
ASIP	Agouti signaling protein
ATP	Adénosine triphosphate
ATPS	ATP synthase
BRAF ⁱ	Inhibiteur de B-Raf
CAC	Cycle de l'acide citrique
CAFs	Fibroblastes associés au cancer
CBC	Carcinome basocellulaire
CBP/p300	CREB binding protein
CCL2	Chemokine ligand 2
CD80	Cluster of differentiation 80
CD86	Cluster of differentiation 86
CDKN2A	Cyclin dependant kinase inhibitor 2A
chREBP	Carbohydrate response element binding protein
Clk2	CDC like kinase 2
CREB	C-AMP response binding protein
CSC	Carcinome spinocellulaire
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DUSP6	Dual specificity phosphatase 6
ECM	Matrice extracellulaire
EGF	Epidermal growth factor
EIF4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor E4-binding protein 1
ERR	Estrogen-related receptor

FAD	Quinone
FADH ₂	Hydroquinone
FOXA2	Forkhead box protein A2
FOXM1	Forkhead Box protein M1
FOXO1	Forkhead box protein O1
GAPs	GTPase-accelerating proteins
GCN5	General control nonrepressed protein 5
GDP	Guanosine diphosphate
GLI1	GLI family zinc finger 1
GLUT1	Glucose transporter 1
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
GR	Glucocorticoid receptor
GTP	Guanosine triphosphate
HAT	Histone acétyl transférase
HCF	Host cell factor
HIF1 α	Hypoxia inducible factor 1 alpha
HNF4 α	Hepatic nuclear factor-4 α
IDH1	Isocitrate déshydrogénase isoforme 1
IDH2	Isocitrate déshydrogénase isoforme 2
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	Interféron
IKK	I κ B kinase
IKK- α	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha
IKK- β	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
IKK ϵ	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon
IL-1	Interleukine-1
IL-1 α	Interleukine-1 alpha
IL-8	Interleukine-8
IL-10	Interleukine-10

IRF	Interferon Regulatory Factor
JAK	Janus kinase
LGALS9	Galectine 9
LXR α	Liver X receptor α
MCAD	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase
MAP3K	MAP kinase kinase kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC1R	Melanocortin 1 receptor
MEF2	Myocyte enhancer factor-2
MEKi	Inhibiteur de MEK
MGS	Mutated gene set
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
MMPs	Métalloprotéinases
MNK	MAPK interacting kinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NEMO	NF-kappa-B essential modulator
NF1	Neurofibromin 1
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NMSC	Nonmelanoma skin cancer
NRF	Nuclear respiratory factor
NT5E	Ecto-5'-nucleotidase
OXPHOS	Phosphorylation oxidative
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PD-1	Programmed cell death-1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1

PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PD-L2	Programmed cell death ligand 2
PI3K-AKT	Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
POMC	Pro-opiomelanocortin
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
PPAR _γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPARGC1A (PGC-1 α)	PPAR gamma coactivator 1-alpha
PPARGC1B (PGC-1 β)	PPAR gamma coactivator 1-beta
PPRC1 (PRC)	PPAR gamma coactivator-related protein 1
PRMT1	Protein arginine N-methyltransferase 1
PTCH1	Protein patched homolog 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PYCR	Pyrroline-5-carboxylate réductase
RB1	Retinoblastoma protein
Redox	Oxydoréduction
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène (<i>Reactive oxygen species</i>)
RSK	p90 ribosomal S6 kinase
RTK	Récepteur tyrosine kinase
S6K1	Ribosomal protein S6 kinase beta 1
SCF	Stem cell factor
SET7/9	Histone lysine N-methyltransferase SETD7
SHH	Sonic Hedgehog
SIRT1	Sirtuin 1
SMO	Smoothened
SOD	Superoxyde dismutase
SRC-1	Steroid receptor coactivator-1
SREBP-1c	Sterol regulatory element binding protein 1c

STAG2	Stromal antigen 2
STAG3	Stromal antigen 3
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAM	Macrophages associés à la tumeur
TBK1	Tank binding kinase 1
TGF α	Transforming growth factor alpha
TGF- β	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like receptor
TME	Microenvironnement tumoral
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNFR2	Tumor necrosis factor receptor 2
TP53	Tumor protein p53
TRAP220	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1
TYR	Tyrosinase
UCP2	Mitochondrial uncoupling protein 2
UCP3	Mitochondrial uncoupling protein 3
UVR	Ultraviolet rays
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VISTA	V-domain Ig suppressor of T cell activation
VLDL	Very low density lipoproteins
α -MSH	Alpha-melanocyte stimulating hormone

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Simon-Pierre Gravel pour le soutien qu'il a apporté à mon développement académique et ainsi que pour les opportunités qui m'ont été présentés grâce à lui lors de ma maîtrise.

Je veux également remercier ma collègue Katherine Coutu-Beaudry sans qui ce travail n'aurait pas pu être accompli.

Un merci particulier aux membres du laboratoire Marc Servant : Étienne Durette, Marianna Acevedo et Florence Dô pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire pendant le temps de notre démarrage et pour la formation aux méthodes de travail en laboratoire.

Chapitre I : Introduction

1. Chapitre I : Introduction

1.1 La peau et ses maladies

La peau est le plus grand organe de l'être humain et possède une surface moyenne d'environ 2 mètres carrés chez l'adulte. Ses fonctions principales sont d'assurer la protection des organes contre les chocs, rayons ultraviolets (UV) et substances étrangères, réguler la température corporelle et synthétiser la vitamine D. Afin de remplir ses différents rôles, la peau est composée de 3 couches distinctes: l'hypoderme, le derme et l'épiderme (**Figure 1**). Chacune de ces couches possède des fonctions uniques qui contribuent au bon fonctionnement de l'organisme. L'hypoderme, couche la plus profonde de la peau, est un isolant naturel du corps. Il agit aussi comme réserve énergétique grâce aux adipocytes, un type cellulaire possédant la capacité de conserver les lipides. Le derme, couche intermédiaire de la peau, contient les structures nécessaires à plusieurs processus de régulation physiologiques. Les vaisseaux sanguins présents dans cette couche assurent le transport de nutriments et permettent la régulation de la température corporelle. Le derme contient aussi les glandes sudoripares, qui participent à la régulation de la température via la production de sueur, et les glandes sébacées, qui protègent la peau de la déshydratation par la production de sébum. Les terminaisons nerveuses contenues dans le derme confèrent à la peau les fonctions sensorielles permettant la perception des sensations de température, douleur et pression. Finalement, l'élastine et le collagène qui compose cette couche confèrent la résistance et l'élasticité caractéristiques de la peau. L'épiderme, couche la plus externe de la peau, participe physiquement à la défense du corps. Les kératinocytes sont les principales cellules composant cette couche de la peau. Ceux-ci ont la capacité de migrer de la couche basale de l'épiderme pour se différencier en cornéocytes et former la couche cornée à la surface de la peau. La robustesse et l'imperméabilité que les couches différenciées donnent à l'épiderme permettent de protéger l'organisme contre la majorité des bactéries, virus et substances dangereuses présents dans l'environnement. Cette robustesse confère aussi une certaine protection aux organes internes contre les chocs et les lésions. Les kératinocytes participent aussi à la réponse immunitaire innée en sécrétant des chimiokines tel que le *chemokine ligand 2* (CCL2) (1). La couche basale de l'épiderme contient aussi les mélanocytes, un type cellulaire qui produit la mélanine. En plus d'être en

partie responsables de la pigmentation de la peau, les mélanocytes, et la mélanine qu'ils produisent permettent de protéger la peau contre les rayons ultraviolets (UVR) (2, 3).

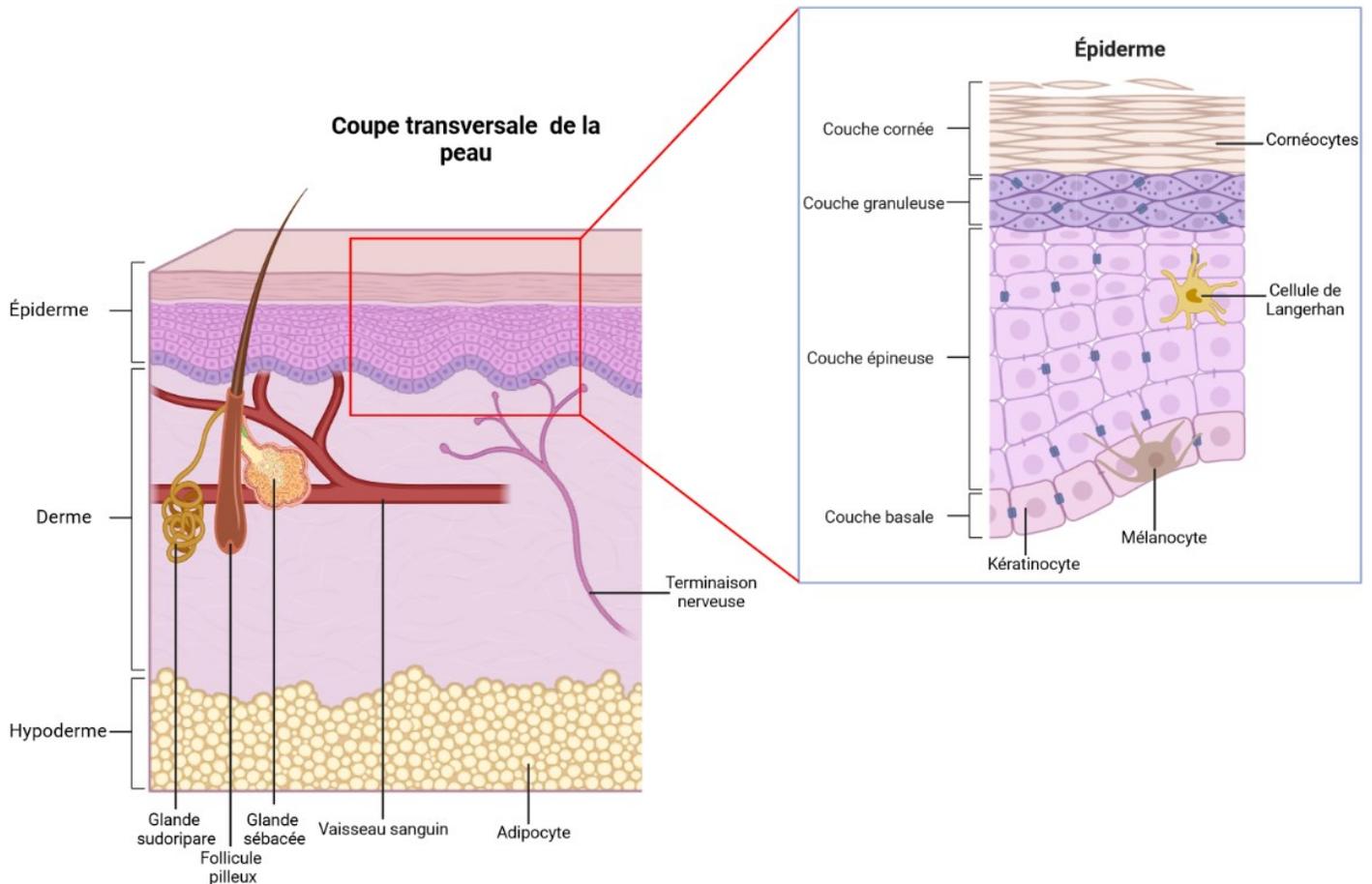


Figure 1 : Structures principales de la peau et de l'épiderme⁽⁴⁻⁶⁾. L'épiderme est composé de 4 couches bien distinctes qui correspondent à différents stades de différenciation des kératinocytes. La couche basale contient les kératinocytes non différenciés, les cellules souches ainsi que les mélanocytes. Les kératinocytes, en forme de colonne, adhèrent entre elles ainsi qu'aux cellules squameuses de la couche épineuse grâce aux desmosomes, jonctions où la membrane cellulaire d'une cellule adhère à une cellule voisine. La couche épineuse est composée de kératinocytes à différents stades de différenciation où les cellules plus proches de la couche cornée sont plus aplaties. Les kératinocytes de cette couche sont reliés entre eux par une abondance de desmosomes et des jonctions *gap* qui leur permettent de communiquer entre eux par l'utilisation de signaux chimiques. La couche granuleuse est composée des kératinocytes complètement aplaties qui participent activement à la production des protéines nécessaires à la kératinisation. Les cellules de cette couche préparent aussi la dissolution de leurs organelles pour entrer en différenciation terminale et devenir les cornéocytes qui forment la couche cornée. L'épiderme contient aussi les cellules de Merkel, qui agissent comme récepteur mécanique, et les cellules de Langerhans, un type de macrophage uniquement présent dans la peau qui est responsable de la régulation de la réponse immunitaire dans la peau et de l'activation des lymphocytes T. Figure créée à l'aide de Biorender : www.biorender.com

Malgré ses fonctions de barrière contre les dangers du monde extérieur, plusieurs maladies peuvent tout de même affecter la peau. Facilement repérables par les boutons, plaques rougeâtres ou sensations de démangeaisons sur la peau, plusieurs maladies cutanées sont caractérisées par des inconforts modérés et des désagréments esthétiques. Parmi les conditions cutanées les plus connues, on retrouve l'acné, l'eczéma, le psoriasis, la rosacée et l'urticaire. Alors que ces maux ne sont pas mortels et sont généralement bien contrôlés par des crèmes topiques ou des antibiotiques, d'autres maladies, comme les cancers de la peau et le mélanome, nécessitent des traitements complexes et coûteux pour sauver la vie des personnes atteintes (7).

1.2 Les cancers de la peau et le mélanome

1.2.1 Incidence des cancers de la peau

Le cancer de la peau est de loin le cancer le plus commun parmi tous les types de cancer diagnostiqués. Il existe plusieurs types de cancer de la peau dont les plus communs et les plus connus sont les cancers de la peau non-mélanocytaire (NMSC), regroupant le carcinome basocellulaire (CBC) et le carcinome spinocellulaire (CSC), et le mélanome. Malgré le faible taux de mortalité et le pronostic favorable généralement associés aux cancers de la peau, le mélanome ressort du lot par son habileté d'adaptation et sa grande résistance aux traitements actuels. Ces particularités associées au mélanome engendrent des dépenses accrues en soin de santé ainsi qu'une hausse de la mortalité dans la population. Au Canada, le mélanome se classe à la 7^{ième} position des cancers les plus communs avec 1 homme canadien sur 42 et 1 femme canadienne sur 56 qui seront atteints au cours de leur vie (8, 9). Le mélanome, lorsque diagnostiqué à des stades précoces de la maladie, reste le cancer avec le taux de guérison le plus élevé parmi tous les types de cancer. Cependant, les patients souffrants du mélanome et qui ont atteint un stade avancé de la maladie ont un pronostic peu favorable et une chance de survivre drastiquement diminuée avec seulement 15 à 20% des personnes survivant après 5 ans (10). La faible survie associée aux formes avancées du mélanome est une préoccupation importante et la compréhension des mécanismes de développement sous-jacents au mélanome est nécessaire à la mise en place d'outils pour des diagnostics plus précoces et au

développement de nouvelles thérapies curatives permettant la guérison des formes les plus évoluées du mélanome.

1.2.2 Description sommaire des différents types de cancers de la peau

Le CBC est le plus commun des cancers de la peau et compose environ 80% des cas de NMSC (11). Celui-ci se développe à partir des kératinocytes (**Figure 1**) qui sont les principales cellules de l'épiderme. L'origine cellulaire de ce cancer est controversée puisque certaines études montrent qu'il se développe à partir des cellules souches du follicule pileux (12, 13) (composé de cellules souches de kératinocytes), alors que d'autres montrent qu'il se développe à partir des kératinocytes basaux de l'épiderme interfolliculaire (14, 15). Quoi qu'il en soit, la majorité des études s'accordent sur la voie de signalisation menant au développement de ce cancer de la peau, soit la voie *Sonic Hedgehog* (SHH). La voie de signalisation SHH agit normalement comme antioncogène via son récepteur *protein patched homolog 1* (PTCH1) en inhibant *Smoothened* (SMO) (14, 16). L'inhibition de SMO empêche l'activation de *GLI family zinc finger 1* (GLI1), un joueur important dans la régulation du cycle cellulaire via l'activation de la transcription de *Forkhead Box protein M1* (FOXM1) (17, 18). Une surexpression du ligand SHH, un gain de fonction de SMO ou une perte de fonction de PTCH1 provoque une suractivation de la voie SHH et une activation aberrante du cycle cellulaire menant au développement des cellules cancéreuses du CBC (19). D'autres mutations fréquentes retrouvées dans la plupart des cancers ainsi que dans le CBC incluent *tumor protein p53* (TP53), un gène suppresseur de tumeurs codant pour la protéine p53, et *cyclin dependant kinase inhibitor 2A* (CDKN2A), un autre gène suppresseur de tumeurs codant pour la protéine p16^{INK4A} (20).

Le CSC est le 2^{ième} cancer de la peau le plus commun et représente environ 20% des NMSC (11). Tout comme le CBC, le CSC se développe à partir des kératinocytes. Contrairement au CBC, les altérations génétiques exactes menant au développement du CSC ne sont pas connues présentement. Plusieurs facteurs intrinsèques, tels que des maladies génétiques (21), et extrinsèques telles que l'exposition à des carcinogènes, semblent être responsables de la pathogenèse du CSC. Malgré le développement lent et le

faible taux de mortalité associés au CSC, ce type de cancer de la peau possède une tendance supérieure au CBC à envahir les parties profondes de la peau et à se propager aux tissus environnants (12).

Le mélanome est le cancer de la peau le moins fréquent, mais il est de loin le plus mortel de tous. Le mélanome cutané se développe à partir des mélanocytes de l'épiderme (**Figure 1**) alors que le mélanome uvéal se développe à partir des mélanocytes présents dans les yeux (22). En temps normal, les mélanocytes produisent la mélanine après une exposition aux rayons ultraviolets (UVRs) afin de protéger la peau contre des dommages subséquents causés par les rayons solaires. Un mélanome débute lorsque les mélanocytes prolifèrent de façon anormale et forment un naevus (un grain de beauté) bénin ou dysplasique (anormal). Après la phase d'initiation, les cellules de mélanome formant un naevus entrent dans un état d'arrêt de croissance appelé la sénescence. Il arrive que des mutations subséquentes permettent au mélanome de surmonter la sénescence pour progresser en surface (20). Dans cette première progression, nommée phase de croissance radiale, les cellules de mélanome restent dans l'épiderme et possèdent un faible potentiel d'invasion. Finalement ces cellules peuvent atteindre le derme dans la phase de croissance verticale pour ensuite métastaser vers d'autres tissus.

En excluant formes rares, les mélanomes peuvent être divisés en 4 catégories différentes: le mélanome superficiel extensif, le mélanome nodulaire, le lentigo malin et le mélanome lentigineux des extrémités (23, 24). Ceux-ci sont catégorisés selon leur couleur, leur forme et la surface de la peau où ils débutent (**Tableau 1**). Bien que la progression associée à chacun des types de mélanome soit similaire, une mortalité accrue est associée au mélanome nodulaire comparativement aux autres catégories de mélanome.

Tableau 1 : Caractéristiques physiques des différents types de mélanome

Type de mélanome	Caractéristiques
Superficiel extensif	<ul style="list-style-type: none">• Le plus fréquent• Plat et mince• Proviens parfois d'un grain de beauté préexistant• Peut prendre plusieurs couleurs
Nodulaire	<ul style="list-style-type: none">• Deuxième plus fréquent• Prends la forme d'une masse surélevée• Développement rapide• Habituellement de couleur noire
Lentigo malin	<ul style="list-style-type: none">• Plaque plate aux contours irréguliers• Se développe à partir d'une tumeur <i>in situ</i> de l'épiderme• Couleur dans les teintes de brun ou de noir
Lentigineux des extrémités	<ul style="list-style-type: none">• Le moins fréquent• Prends la forme d'une petite tache décolorée• Couleur brun foncé ou noir• S'étend sur une grande surface de la peau avant de migrer vers les couches profondes de la peau

Afin de caractériser précisément la progression du mélanome est des cancers en général, plusieurs systèmes de classification ont été mis en place. Le système de classement le plus utilisé au niveau diagnostique est le système TNM (ou système AJCC) (25). Ce système classe les cancers selon la taille de la tumeur primaire (allant de T0 à T4), la propagation aux nœuds lymphatiques (N0 à N3) et la présence de métastases (M0 ou M1) (**Tableau 2**). Au niveau pronostic, la progression du mélanome est caractérisée selon un système de gradation composé de 4 stades qui combine les observations du système TNM (**Tableau 3**). Les stades I et II correspondent à des stades de progression précoce du mélanome et le pronostic associé à ces stades est généralement favorable. La chirurgie est utilisée comme traitement curatif pour les mélanomes de stade I et II. Le stade III coïncide avec la progression du mélanome vers les ganglions lymphatiques voisins de la tumeur primaire. Le stade IV correspond à la phase de métastase du mélanome. Pour ces stades, le pronostic de survie est grandement diminué et les traitements pour éliminer ces mélanomes sont plus complexes (26).

Tableau 2 : Classification diagnostique pour la caractérisation du mélanome

Classification		Caractéristiques
T	T0	Pas de tumeur
	T1 a, b	Tumeur <0.8mm sans ulcération (a) ou avec ulcération (b)
	T2 a, b	Tumeur >1.0-2mm sans ulcération (a) ou avec ulcération (b)
	T3 a, b	Tumeur >2.0-4mm sans ulcération (a) ou avec ulcération (b)
	T4 a, b	Tumeur >4mm sans ulcération (a) ou avec ulcération (b)
N	N0	Pas de métastase détectée dans les nodules
	N1 a, b, c	1 nœud lymphatique avec présence de micrométastase (a), macrométastase (b), ou métastase microsatellite sans atteinte au nœud lymphatique (c)
	N2 a, b, c	2 à 3 nœuds lymphatiques avec présence de micrométastases (a), macrométastases (b), ou métastase microsatellite avec 1 nœud lymphatique atteint (c)
	N3 a, b, c	≥4 nœuds lymphatiques avec présence de micrométastases (a), macrométastases (b), ou métastase microsatellite avec ≥2 nœuds lymphatiques atteints (c)
M	M0	Pas de métastase distal
	M1, a, b, c, d	Métastases distales à la peau et aux tissus musculaires (a), aux poumons (b), aux intestins (c) ou au système nerveux central (d)

Tableau 3 : Stades de progression médicale du mélanome

Grade	Caractéristiques
Stade 0	Le mélanome se situe à la surface de l'épiderme
Stade I	La tumeur mesure moins de 2mm et progresse vers le derme. Le grade I est subdivisé en grade A et B selon la taille et l'ulcération de la tumeur. Stade IA : tumeur <1mm avec ulcération. Stade IB : tumeur > 1mm mais <2mm sans ulcération
Stade II	La tumeur mesure plus de 4mm sans ulcération ou mesure moins de 4mm avec ulcération. Le stade II est subdivisé en stade A, B et C selon la taille et l'ulcération de la tumeur. Stade IIA : tumeur >1mm mais <2mm avec ulcération ou >2mm mais <4mm sans ulcération. Stade IIB : tumeur >2mm mais <4mm avec ulcération ou > 4mm sans ulcération. Stade IIC : tumeur > 4mm avec ulcération
Stade III	La tumeur primaire s'étend aux régions avoisinantes ainsi qu'à au moins 1 nœud lymphatique. Le stade III est subdivisé en stade A, B, C et D selon le nombre de nœuds lymphatiques affectés, la quantité de cellules cancéreuses et l'état de propagation aux régions voisines.
Stade IV	La tumeur métastase à d'autres endroits du corps.

1.3 Pathophysiologie moléculaire du mélanome

1.3.1 Le mélanocyte et la mélanogenèse

Le mélanome diffère des autres cancers de la peau puisqu'il provient du mélanocyte, contrairement aux NMSC qui se développent à partir des kératinocytes. À l'opposé des kératinocytes, le mélanocyte est une cellule clé dans la défense de l'organisme contre le développement d'un cancer de la peau par son habilité à protéger l'ADN contre les UVRs. Le mélanocyte est situé à la base de l'épiderme et possède une forme semblable aux cellules dendritiques dont la morphologie en branche s'étend entre les kératinocytes de l'épiderme. Le mélanocyte contient les mélanosomes, une organelle semblable aux lysosomes et unique à cette cellule. Le mélanosome a pour fonction de produire, stocker et acheminer la mélanine, une molécule participant à la pigmentation de la peau qui est essentielle dans la protection de l'organisme contre les UVRs. Afin d'exercer son rôle protecteur, les mélanosomes migrent à partir du noyau du mélanocyte vers les dendrites en utilisant le réseau de microtubules. Le transfert vers les kératinocytes adjacents se fait via divers mécanismes incluant la cytophagocytose des dendrites du mélanocyte par le kératinocyte, l'exocytose de la mélanine dans l'espace extracellulaire suivi de son internalisation par le kératinocyte, le transport via les nanotubes membranaires et la fusion des membranes plasmiques (27-29). Une fois internalisée par les kératinocytes, la mélanine protège l'ADN en absorbant les UVRs et en interagissant avec les ROS générés par la photodégradation des lipides membranaires (30). Dans la peau, on retrouve principalement 2 types de mélanine bien distinctes, mais toutes deux produites par l'enzyme tyrosinase (TYR) : l'eumélanine et la phéomélanine. L'eumélanine, dont la coloration est brune ou noire, est produite à partir de l'acide aminé L-tyrosine et filtre efficacement les UVRs. La phéomélanine, qui a une coloration variant du jaune au rouge, est produite en intégrant l'acide aminé cystéine à sa composition (31). Elle est fortement exprimée chez les personnes à la peau pâle et très peu impliquée dans la protection contre les UVRs (32). Il est à noter que l'absence de mélanine chez les personnes albinos est associée à une augmentation accrue de développer un NMSC mais ont une incidence plus faible de mélanome (33).

La mélanogenèse, processus par lequel ces mélanines sont synthétisées, est composée d'une voie de signalisation complexe dont plusieurs protéines peuvent être impliquées dans le développement et la progression du mélanome. Ce processus biologique débute lors d'une exposition aux rayons UVA et UVB du soleil ou lors d'une exposition aux rayons UV d'un appareil de bronzage. Les dommages causés par ces radiations incitent les mélanocytes à enclencher la mélanogenèse en stabilisant la protéine p53 (34). Cette stabilisation permettra à p53 de se lier au promoteur du gène *pro-opiomelanocortin* (*POMC*), un gène dont la protéine sera clivée pour produire la *α-melanocyte stimulating hormone* (α -MSH) ou la *adrenocorticotropie hormone* (ACTH) (35). Ces peptides peuvent se lier directement au *melanocortin 1 receptor* (MC1R), un récepteur couplé aux protéines G situé à la surface des mélanocytes. La liaison α -MSH-MC1R (ou ACTH-MC1R) est essentielle à la production des mélanines puisqu'elle permet d'augmenter la transcription du gène *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF), qui encode un facteur de transcription qui régule à la hausse l'activité et la synthèse d'enzymes nécessaires à la production des différentes mélanines (p. ex. TYR) (32, 36).

Les fonctions des mélanocytes et de la mélanogenèse sont essentielles à la protection de la peau contre les dommages à l'ADN provoqués par les UVRs. Malgré ces rôles importants, plusieurs voies de signalisation impliquées dans la mélanogenèse participent activement au développement du mélanome et peuvent devenir des facteurs de risque pour la progression du mélanome.

1.3.2 Facteurs de risque

L'initiation et la progression d'un mélanome sont multifactorielles et implique des facteurs environnementaux et génétiques particuliers. Parmi les facteurs de risques les plus importants, on retrouve l'exposition aux UVRs (37). Que ce soit lors d'une sortie à l'extérieure ou lors d'une séance de bronzage, les UVRs générés par le soleil ou le lit de bronzage ont la capacité d'endommager l'ADN et de provoquer des mutations lors de sa réparation. Les dommages à l'ADN résultent de la formation de dimères de pyrimidine (aussi appelés photoproduits) (38) causant des erreurs dans le code génétique. Les UVRs

ont aussi la capacité de générer des dérivés réactifs de l’oxygène (ROS) qui peuvent eux aussi endommager l’ADN (39). Une forte exposition aux UVRs, accompagné d’un historique de coup de soleil en bas âge augmente drastiquement le risque de développer un mélanome (40).

Tel que mentionné précédemment, la production de l’eumélanine est le principal mécanisme de défense que la peau possède afin de diminuer les dommages à l’ADN causés par les UVRs. La faible production d’eumélanine par les peaux pâles est donc un facteur de risque important dans le développement d’un mélanome. Les types de peau d’une personne peuvent d’ailleurs être définis selon l’échelle de Fitzpatrick (**Tableau 4**), une échelle classant la peau selon sa sensibilité aux UVRs (41). Les catégories de cette échelle correspondent à la capacité de la peau à produire de l’eumélanine. Une peau de type I aura une faible capacité à produire de l’eumélanine et aura un faible ratio eumélanine/phéomélanine, laissant la personne vulnérable au développement de réactions cellulaires aiguës (p. ex. coup de soleil) ou de cancer de la peau. D’autre part, les personnes ayant une peau de type V ou VI ont une capacité accrue de production d’eumélanine et possèdent un ratio eumélanine/phéomélanine qui leur confère une photoprotection optimale.

Tableau 4 : Échelle de Fitzpatrick et risque de cancer

Type de peau (Selon Fitzpatrick)	Quantité de mélanine⁽⁴²⁾	Risque de Cancer
I (Peau très blanche)	Très peu	Très élevé
II (Peau blanche)	Très peu à peu	Très Élevé
III (Peau rosée)	Peu	Élevé
IV (Peau basanée)	Moyen	Modéré
V (Peau brune)	Grande	Faible
VI (Peau noire)	Très grande	Très faible

Les nævi atypiques sont un autre facteur facilitant l'apparition d'un mélanome. Ceux-ci correspondent à une agglomération de plusieurs mélanocytes formant un grain de beauté et apparaissent généralement dans la jeunesse d'un individu. Ils partagent des caractéristiques communes au mélanome dont la plus importante est l'activation de la voie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs). Cette voie de signalisation cellulaire est directement impliquée dans la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose (voir section 1.3.3). Selon plusieurs études, environ 30% des cas de mélanome proviennent d'un naevus préexistant (43, 44). Le risque de développer un mélanome à partir d'un naevus augmente proportionnellement au nombre de nævi qu'un individu possède (45).

Les antécédents familiaux ou personnels de cancer de la peau augmentent aussi les risques de contracter un mélanome (46). Ces antécédents peuvent témoigner d'une prédisposition génétique augmentant le risque de mélanome. Par exemple, une mutation du gène *CDKN2A*, dont la fonction est essentielle à la régulation du cycle cellulaire, est associée à un risque accru de mélanome allant jusqu'à 28% d'augmentation dans les familles porteuses d'une mutation inactivant ce gène (47). Dans le même ordre d'idée, une personne ayant déjà été atteinte d'un mélanome ou d'un cancer de la peau sera plus à risque d'être atteint d'un mélanome.

Une mutation du gène *MC1R* est un autre facteur de risque génétique du développement d'un mélanome. Tel que mentionné précédemment, *MC1R* joue un rôle crucial dans la protection contre les UVRs via son interaction avec la α -MSH et son implication dans la production d'eumélanine. Certaines mutations du récepteur favorisent la liaison entre *MC1R* et un antagoniste compétitif de la α -MSH, l'*agouti signaling protein* (ASIP). Contrairement à la α -MSH, l'ASIP favorise la synthèse de la phéomélanine plutôt que la synthèse d'eumélanine (48, 49). Ce phénomène limite la protection contre UVRs conférée par l'eumélanine et restreint les effets bénéfiques de la mélanogenèse. Dans ce cas, chaque exposition aux UVRs pourrait endommager durablement l'ADN tout en augmentant grandement le risque de développer un mélanome (50).

Certaines maladies héréditaires peuvent elles aussi contribuer au risque de mélanome. Parmi les principales, on retrouve le Xeroderma pigmentosum et le syndrome de Werner. La première est une maladie génétique autosomale récessive de la peau qui diminue l'efficacité du processus de réparation de l'ADN (51). L'altération de ces mécanismes rend la peau de ces personnes extrêmement vulnérables aux mutations provoquées par les UVRs et les prédispose au développement d'un mélanome. Le syndrome de Werner est, quant à lui, une maladie causant un vieillissement prématuré de la peau. Ce vieillissement est accompagné d'un dysfonctionnement cellulaire et d'altérations génétiques qui peuvent conférer des avantages évolutifs aux cellules et favoriser le développement de cellules cancéreuses incluant le mélanome (52).

Finalement, d'autres conditions associées à une défaillance immunitaire tel que des maladies ou la prise de certains médicaments peuvent augmenter le risque de développer un mélanome. Par exemple, la contraction du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou la prise d'immunosuppresseurs confèrent une chance de survie aux cellules de mélanome puisque, contrairement à une situation normale, les cellules immunitaires sont inaptes à repérer et éliminer les cellules de mélanome (53, 54).

1.3.3 Mutations fréquentes

Dans la section précédente, certaines mutations augmentant le risque de mélanome ont été abordées. Cependant, celles-ci ne sont pas garantes de son développement. Le mélanome est un cancer ayant un des taux de mutation les plus élevés parmi tous les types de cancer (55). L'ensemble de ces mutations, nommé *mutated gene set* (MGS), regroupe les *passenger* mutations (ou mutations passagères), qui donnent peu d'avantages évolutifs à la tumeur, et les *driver* mutations (ou mutations pilotes), qui dictent l'évolution de la tumeur ainsi que les traitements qui seront utilisés pour l'éliminer (56, 57). La variabilité génétique retrouvée dans le mélanome permet de caractériser les tumeurs en fonction de leur mutation et d'établir une classification génétique du mélanome différente des classifications diagnostiques (voir **Tableau 2**) et cliniques (voir **Tableau 3**). Le mélanome est généralement séparé en 4 sous-types déterminés selon les mutations génétiques

suivantes: BRAF-mutant, NRAS-mutant, Neurofibromin 1 (*NFI*) -mutant et triple négatif (58).

Les mutations de BRAF, NRAS et *NFI* sont présentes dans la voie des MAPKs, une voie de signalisation qui joue un rôle clé dans plusieurs processus biologiques en activant la transcription de gènes nécessaires à la prolifération, à la différenciation et à la survie cellulaire. La voie des MAPKs est aussi indispensable dans la processus de traduction des protéines en phosphorylant p90 ribosomal S6 kinase (RSK), *MAPK interacting kinase* (MNK) et *ribosomal protein S6 kinase beta 1* (S6K1), qui vont, à leur tour, initier la synthèse de protéines (59, 60). En temps normal, cette voie de signalisation médie les actions de facteurs de croissance tels que l'*epidermal growth factor* (EGF), le *platelet-derived growth factor* (PDGF) et le *transforming growth factor alpha* (TGF α) (61-63). Dans le mélanome, on retrouve des mutations qui activent cette voie de façon constitutive et confèrent une indépendance à ces facteurs de croissance, un mécanisme caractéristique du cancer. La voie des MAPKs est composée de différentes kinases, notamment Ras, BRAF, MEK1/2 et ERK, qui vont s'activer de façon subséquente pour promouvoir la transcription génétique (**Figure 2**). Un dysfonctionnement de la voie des MAPKs entraîne une prolifération aberrante des cellules et leur confère des avantages évolutifs favorisant leur survie (64). L'altération la plus fréquente de la voie des MAPKs dans le mélanome est la mutation du gène *BRAF*. Cette mutation, qu'on retrouve dans 50% des tumeurs causées par le mélanome, survient au codon 600 de *BRAF* où l'acide aminé valine est souvent substitué par un acide glutamique (V600E, 90%) ou une lysine (V600K, 8%) (65, 66). Cette modification génétique entraîne l'activation constitutive de la sérine/thréonine protéine kinase B-Raf et permet au mélanome doté de cette mutation de proliférer de façon aberrante et de survivre dans l'organisme. Une autre altération fréquente de la voie MAPKs dans le mélanome est la mutation du gène NRAS (20% des tumeurs) (66). La protéine codée par le gène NRAS est une GTPase essentielle au fonctionnement de la voie des MAPKs en permettant l'activation de la sérine/thréonine protéine kinase B-Raf. Les mutations NRAS varient d'un mélanome à l'autre. Alors que certaines mutations modifient la protéine pour qu'elle reste active, d'autres altérations diminuent sa sensibilité aux *GTPase-accelerating proteins* (GAPs) qui provoquent l'arrêt de son activité. Dans les deux cas, une mutation de NRAS entraîne une activation de la voie des MAPKs et favorise

la prolifération et la survie des cellules du mélanome. Le dernier gène le plus fréquemment muté dans le mélanome est le gène *NF1* (12%-18% des tumeurs) qui est connu comme un suppresseur de tumeur. Le gène *NF1* code pour une protéine d'une large taille dont le domaine fonctionnel le plus caractérisé est le *GTPase-activating protein-related domain*. Ce domaine fonctionnel est connu pour réguler négativement l'activation de RAS en permettant le passage de la forme active de RAS à sa forme inactive par la conversion de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP). La conversion de RAS-GTP en RAS-GDP empêche l'activation de la voie MAPK. Les mutations qui touchent *NF1* entraînent une perte de fonction de la protéine et, sans causer l'activation constitutive de la voie MAPKs, empêchent une régulation négative de RAS (67). En l'absence de ce frein essentiel à la prolifération cellulaire, le mélanome peut exploiter cette perte de fonction pour faciliter sa progression et sa survie.

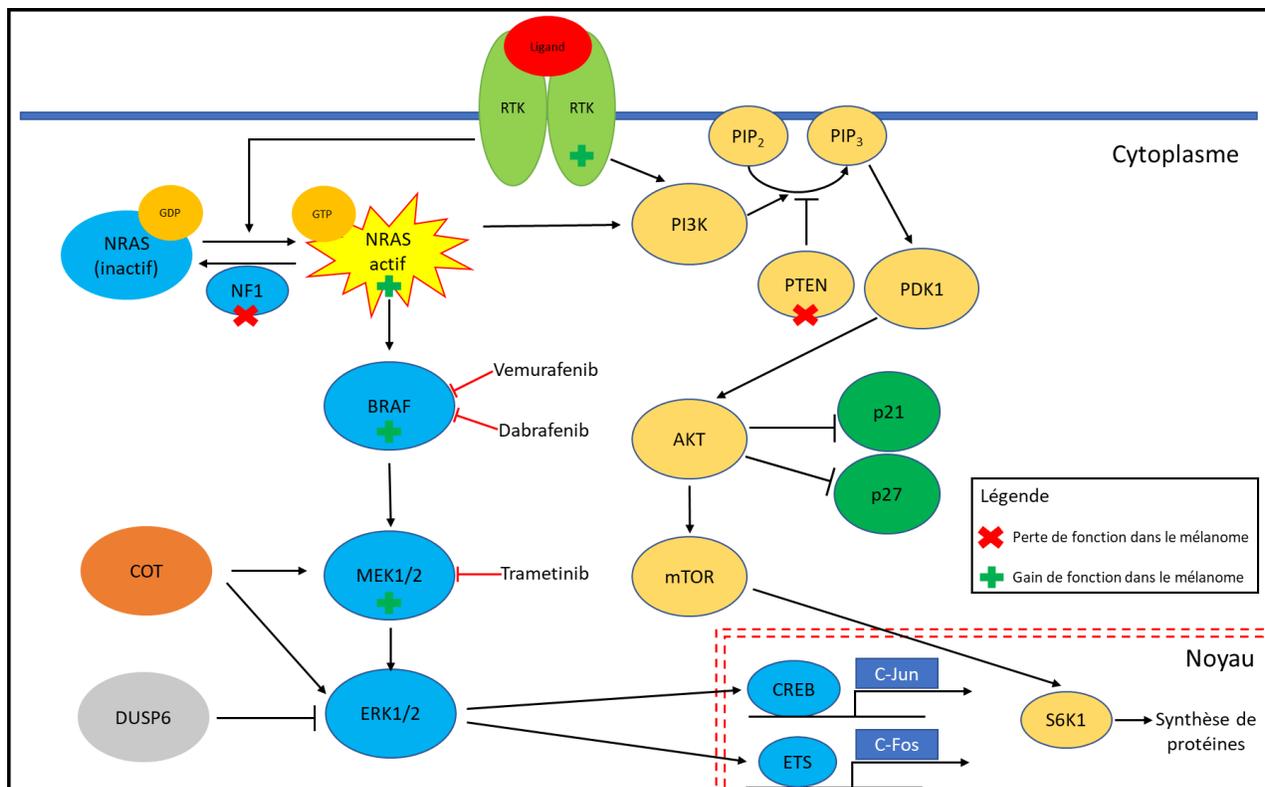


Figure 2 : Rôles des voies de signalisation des MAPKs et PI3K-AKT dans le développement du mélanome et thérapies ciblant les mutations communes de ces voies (68-75). Les voies de signalisation des MAPKs et PI3K-AKT sont impliquées de façon importante dans le développement du mélanome. Plusieurs famille de RTKs incluant les EGFR (EGFR et ERBB3), les FGFR (FGFR1), les VEGFR (VEGFR1, 2 et 3) et les PDGFR (PDGFRA, C-Kit) sont surexprimés ou mutés dans le mélanome. Lors de la liaison à leur ligand respectif, ces récepteurs vont activer la voie des MAPKs et/ou la voie PI3K-AKT. La voie des MAPKs mène à la phosphorylation de facteurs de transcription incluant CREB et

les ETS qui augmentent la transcription de gènes de prolifération cellulaire comme c-FOS et c-JUN et anti-apoptotique comme Bcl-X_L (B-cell lymphoma-extra large). La voie PI3K-AKT, quant à elle, augmente la synthèse protéique via la phosphorylation de S6K1 par mTOR. Le vemurafenib, le dabrafenib et le trametinib sont parmi les thérapies ciblées qui ont été développées afin de traiter spécifiquement les mutations de BRAF et MEK1/2 fréquemment retrouvées dans le mélanome. **PI3K**: *Phosphoinositide 3-kinase*. **PTEN**: *Phosphatase and tensin homolog*. **PIP₂**: *Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*. **PIP₃**: *Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*. **PDK1**: *Phosphoinositide-dependent kinase 1*. **DUSP6**: *Dual specificity phosphatase 6*. **CREB**: *cAMP response element binding protein*. **ETS**: *Erythroblast transformation specific*. **S6K1**: *Ribosomal protein S6 kinase beta-1*. **EGFR**: *Epidermal growth factor receptor*. **FGFR**: *Fibroblast growth factor receptor*. **VEGFR**: *Vascular endothelial growth factor receptor*. **PDGFR**: *Platelet-derived growth factor receptor*.

Les mutations exploitées par le mélanome ne sont pas uniquement présentes dans la voie des MAPKs. Ainsi, des voies de signalisation alternatives aussi impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire peuvent dicter son développement. La voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) -protéine kinase B (AKT) (ou voie PI3K-AKT), dont les protéines NRAS et PTEN sont intimement liées, est l'une de ces voies de signalisation hautement altérée au sein du mélanome. La voie PI3K-AKT possède des fonctions similaires à la voie des MAPKs en régulant la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. Pour promouvoir ces mécanismes, l'activité catalytique de la PI3K doit être enclenchée par un signal provenant d'un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK), d'un GPCR ou d'une protéine RAS (76). La conformation active de la PI3K permettra la conversion du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃). Le PIP₃ se liera ensuite à la kinase *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) qui, à son tour, va phosphoryler AKT (**Figure 2**) (77). L'activation subséquente d'AKT inhibera des protéines empêchant le cycle cellulaire tel que p21/p27 et activera des protéines telles que le *mammalian target of rapamycin* (mTOR) pour initier la progression du cycle cellulaire (78-80). Le double rôle de NRAS dans l'activation des voies MAPKs et PI3K-AKT a des répercussions sur les processus biologiques régulés par ces deux voies lorsqu'il est muté. Les mélanomes NRAS-mutant sont accompagnés d'une agressivité accrue et d'un pronostic de survie faible comparativement aux mélanomes BRAF-mutants puisque le premier peut accéder à différentes voies de signalisation pour promouvoir sa prolifération et sa survie. Outre NRAS, d'autres gènes de la voie PI3K-AKT essentiels à sa régulation sont des inducteurs du mélanome lorsqu'ils sont mutés. Le gène *Phosphatase*

and tensin homolog (PTEN) code pour une protéine dont la fonction est d'arrêter le cycle cellulaire et d'induire l'apoptose en exerçant son activité phosphatase. Dans la voie PI3K-AKT, la protéine PTEN renverse la conversion de PIP₂ en PIP₃ et empêche ainsi l'activation subséquente d'AKT (77). Une mutation de PTEN (10% des mélanomes primaires) est accompagnée d'une perte de fonction de la protéine et d'une dérégulation du cycle cellulaire, favorisant la formation du mélanome (81, 82).

Les RTKs peuvent aussi être affectés et potentialiser la progression du mélanome. Le gène c-KIT, dont le rôle dans le mélanome est bien caractérisé, est un proto-oncogène qui encode un RTK impliqué dans l'activation de la voie des MAPKs et l'activation de la voie PI3K-AKT (83, 84). L'activation de KIT nécessite la liaison à son ligand, la protéine *stem cell factor* (SCF). Cette liaison entraîne une dimérisation du récepteur c-KIT et son activation subséquente par autophosphorylation (85). Dans le mélanome, c-KIT semblerait avoir des effets qui varient selon le microenvironnement cellulaire. Dans certaines sous-populations de mélanome, les mutations L576P (exon 11) et K642E (exon 13) mènent à un gain de fonction du récepteur et sont associées à la tumorigénèse (86, 87). En effet, le gain de fonction de c-KIT permet l'activation des voies de signalisation des MAPKs et PI3K-AKT dans le mélanome. D'autre part, la perte d'expression de c-KIT est aussi associée à la progression et à la survie de certaines formes de mélanome. Le récepteur c-KIT est un type de récepteur classé comme un récepteur à dépendance (*dependance receptor*): en absence de son ligand SCF, le récepteur c-KIT possède une activité intrinsèque qui déclenche l'apoptose (88). Au niveau du mélanome, l'absence du récepteur c-KIT permet la progression de la tumeur puisque l'activité apoptotique qui permettrait d'empêcher la croissance du mélanome n'est plus présente.

L'adaptation rapide du mélanome pour favoriser sa survie et son développement via plusieurs voies de signalisation alternative est largement due aux nombreuses mutations présentes. Afin de cibler les différentes voies de prolifération du mélanome, plusieurs thérapies efficaces ont été développées. L'éventail de traitements disponibles permet de s'attaquer à ce cancer de différentes façons tout en attribuant le remède le plus efficace à chacun des patients selon les caractéristiques de leur maladie.

1.3.4 Traitements disponibles

Depuis le développement des premiers traitements anticancéreux, des efforts considérables ont été déployés afin de mettre au point des thérapies efficaces contre les mélanomes superficiels et les mélanomes métastatiques. Cependant, la capacité d'adaptation et la propension aux métastases du mélanome que l'on retrouve dans les stades plus avancés rendent les thérapies conventionnelles rapidement désuètes. Dans un effort d'attribuer le traitement curatif adéquat à chaque patient, la détection rapide du mélanome est essentielle afin d'éviter que le mélanome progresse vers des stades plus avancés. De nos jours, les techniques conventionnelles comme la chirurgie et la chimiothérapie restent largement utilisés comme traitements de première ligne pour éliminer les cellules cancéreuses.

La chirurgie est le traitement curatif de première ligne contre le mélanome. Celle-ci est utilisée autant pour les mélanomes de stade I que pour les mélanomes métastatiques (voir **Tableau 3**). Cette méthode consiste généralement à effectuer une opération locale pour retirer la tumeur. Dans les stades plus avancés (p. ex. stade III), les ganglions lymphatiques en périphérie de la tumeur primaire peuvent être retirés. La chirurgie peut aussi être utilisée pour retirer des métastases provoquées par un mélanome métastatique. Lorsque le mélanome est repéré dans sa phase précoce, la chirurgie s'avère être un traitement d'une grande efficacité avec un taux de survie de plus de 90% après la chirurgie initiale (89). Cependant, cette méthode ne peut pas être utilisée dans tous les cas de mélanome. Dans les stades avancés ou pour traiter de grosses tumeurs, la chirurgie doit être combinée avec d'autres traitements comme la radiothérapie, l'immunothérapie ou la chimiothérapie afin de réduire la taille de la tumeur ou encore pour détruire l'ensemble des cellules cancéreuses dans l'organisme.

La chimiothérapie est, pour la plupart des cancers, le traitement le plus utilisé. Celle-ci est administrée oralement ou de façon systémique. Les molécules chimiothérapeutiques sont des agents cytotoxiques qui empêchent la division cellulaire en usant d'une panoplie de mécanismes d'action. Certains agents, tel que le cisplatine, possèdent un large spectre d'action en perturbant les mécanismes de transcription de l'ADN. D'autres

agents, tels que le méthotrexate ou le paclitaxel, empêchent la formation des métabolites ou des microtubules nécessaires à la division cellulaire. La faible spécificité de ce type de thérapie lui confère une efficacité extrêmement variable selon le type de cancer traité et le stade de progression de la maladie. La grande variabilité génétique entre les mélanomes et leur propension à développer des mécanismes de résistance ne fait pas de la chimiothérapie un traitement de choix. Dans le traitement du mélanome, la chimiothérapie est généralement utilisée comme traitement palliatif et ne sert qu'à alléger les symptômes causés par la maladie. Présentement les molécules chimiothérapeutiques de première ligne pour traiter le mélanome sont le dacarbazine et le temozolomide, des agents alkylants provoquant des lésions cytotoxiques (90).

La radiothérapie est aussi régulièrement utilisée pour traiter le mélanome cutané. Habituellement, celle-ci est employée localement pour réduire la taille d'une tumeur, contrôler sa progression ou encore empêcher la réapparition des cellules cancéreuses après une chirurgie. La radiothérapie est réalisée en dirigeant un rayon ionisant vers la région atteinte afin d'endommager l'ADN du mélanome. Au fur et à mesure des traitements, leur ADN sera suffisamment détérioré pour ralentir leur croissance et entraîner leur mort. La radiothérapie a une efficacité élevée et possède un faible coût par traitement conférant cette thérapie très accessible. Cependant, celle-ci peut demander plusieurs semaines de traitement avant d'observer une réduction de la tumeur (91, 92).

Similaire à la radiothérapie, l'immunothérapie est aussi utilisée pour contrôler, réduire ou tuer le mélanome. Ce type de thérapie agit en facilitant le rôle naturel des cellules immunitaires à repérer et éliminer les cellules cancéreuses. Dans les deux dernières décennies, le développement des thérapies visant le récepteur *programmed cell death-1* (PD-1) et le récepteur *cytotoxic T lymphocyte antigen-4* (CTLA-4) a révolutionné la façon de traiter les cancers, incluant le mélanome. Ces récepteurs, présents sur une variété de cellules immunitaires, ont pour fonction de limiter la réponse immunitaire pour éviter de provoquer des réactions auto-immunes lors d'une infection ou lors de la résolution d'un état inflammatoire (93). La contraction de la réponse immunitaire demande une interaction entre PD-1 et un de ses ligands PD-L1/PD-L2 ou de CTLA-4 et ses ligands CD80/CD86.

Pour échapper à la surveillance des cellules immunitaires, les cellules du mélanome peuvent aussi exprimer ces ligands pour provoquer une contraction involontaire de la réponse immune (94). Bien que le mélanome possède des mécanismes lui permettant d'échapper à la vigilance des cellules immunes, celui-ci exprime aussi des protéines de surface hautement immunogéniques et facilement repérables par les lymphocytes T. L'utilisation d'un anti-PD-1 prévient la contraction de la réponse immunitaire alors que l'utilisation d'un anti-CTLA-4 ajoute un effet activateur en favorisant la liaison CD80/CD86 avec le récepteur CD28 (95, 96), une protéine activatrice du système immunitaire. Malgré l'efficacité des immunothérapies, l'hétérogénéité du mélanome lui permet tout de même de développer des mécanismes de résistance rendant ces thérapies inefficaces.

Plus récemment, les thérapies ciblées ont été développées afin de viser des protéines ou des enzymes possédant des mutations spécifiques à un cancer. Le mélanome possède des mutations caractéristiques, tel que la mutation V600E du gène BRAF ou encore une mutation des gènes RAS, lui permettant d'initier son développement et de progresser vers des stades avancés (voir section 1.3.3). Les thérapies ciblées visent à inhiber les voies de signalisation activées de façon aberrante qui sont utilisées par le mélanome pour survivre. Parmi les traitements disponibles, on retrouve le vemurafenib et le dabrafenib, deux inhibiteurs sélectifs de la voie BRAF (BRAFi) et spécifiques pour la mutation V600, ainsi que le trametinib, un inhibiteur sélectif de MEK (MEKi) (**Figure 2**) (97-100). Leur inhibition empêche la prolifération et la survie cellulaire favorisées par la mutation BRAF V600E et l'activation constitutive de la voie des MAPKs qu'elle entraîne. Comme pour l'immunothérapie, l'hétérogénéité et le nombre élevé de mutations typique du mélanome lui permettent de développer une résistance à ce type de traitement.

Malgré l'arsenal de traitement disponible, plusieurs des thérapies abordées possèdent une efficacité allant de faible à modérée. Alors que les techniques conventionnelles peinent à soigner les patients, les thérapies plus récentes deviennent rapidement inefficaces lorsqu'elles font face à des mélanomes extrêmement résistants.

1.3.5 Résistance aux traitements et défis à surmonter

Un défi majeur pour traiter le mélanome est de contrer le développement de sa résistance aux thérapies utilisées pour le tuer. Cette aptitude intrinsèque du mélanome diffère de tumeur en tumeur puisqu'il existe de multiples mécanismes biologiques pour contourner un traitement spécifique. Une stratégie fréquemment employée par le mélanome afin de surmonter les inhibiteurs de BRAF et de MEK est de réactiver la voie de signalisation des MAPKs ciblée par ces thérapies. Cette réactivation survient après un gain de fonction de protéines de la voie MAPK ou à une perte de fonction de NF1 (101). La protéine BRAF peut être impliquée de plusieurs façons dans le développement de la résistance aux thérapies ciblées. Par exemple, une variante de 61-kDa de la mutation V600E [p61BRAF(V600E)] retrouvée dans le mélanome mène à une absence de domaine de liaison à la protéine RAS et à un gain de fonction de BRAF (102, 103). Cette absence favorise une dimérisation de BRAF indépendante du niveau d'activité de la protéine RAS menant à la hausse de l'activation de la voie des MAPKs qui favorisera la prolifération du mélanome. L'augmentation du nombre de copies du gène codant pour BRAF est aussi associée à une résistance accrue aux thérapies ciblées. En amont de BRAF, la protéine N-RAS est aussi impliquée dans le développement d'une résistance aux traitements. Similaire à BRAF, une mutation *de novo* de *NRAS* après traitement permet de réactiver la voie MAPK et de promouvoir la progression du mélanome (104).

En aval de BRAF, d'autres kinases peuvent être responsables du développement de la résistance aux thérapies anticancéreuses. La kinase COT est une MAP kinase kinase kinase (MAP3K) responsable de l'activation des kinases MEK1 et ERK (**Figure 2**). Son expression protéique est inversement proportionnelle à la présence de BRAF et est associée au développement d'une résistance *de novo* dans les lignées de mélanome mutées BRAF V600E. Contrairement à d'autres protéines de la voie des MAPKs, COT ne requiert pas la signalisation de BRAF pour activer la transcription des gènes de survie associés à cette voie de signalisation. L'utilisation d'inhibiteurs de BRAF permet le développement indirect d'un nouveau mécanisme de résistance chez le mélanome en favorisant la survie des cellules exprimant la protéine COT (105). MEK1, une autre kinase de cette voie de

signalisation, peut aussi être responsable de la résistance aux inhibiteurs de BRAF. La mutation MEK1^{C121S} est notamment connue pour sa capacité à réactiver la voie MAPK en augmentant l'activité de MEK1 et la phosphorylation subséquente de la kinase ERK1/2 (106). Une kinase en aval de MEK1 qui peut être impliquée dans le développement de la résistance aux thérapies ciblées est la kinase ERK1/2. Celle-ci survient via une perte de fonction du *stomal antigen 2 (STAG2)* ou 3 (*STAG3*), des gènes codant pour des complexes de cohésines responsables de la cohésion entre les chromatides sœurs. Des mutations de ces gènes sont souvent retrouvées dans plusieurs cancers. La perte de fonction de *STAG2* entraîne une diminution de l'expression de la *dual specificity phosphatase 6 (DUSP6)*, une phosphatase qui a pour fonction d'inactiver ERK (**Figure 2**). La diminution de l'expression de *DUSP6* corrèle avec une augmentation de l'activation de ERK et avec une résistance aux thérapies ciblées (107).

Le développement de la résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome ne se fait pas exclusivement via la mutation des kinases de la voie des MAPKs. Une stratégie de résistance fréquemment retrouvée dans les mélanomes résistants aux BRAFi et aux MEKi est l'activation anormale de voies de signalisation alternatives telle que la voie PI3K/AKT/mTOR pour soutenir sa prolifération et sa survie. L'activation de ces voies redondantes permet de contourner l'inhibition des MAPKs. PTEN et *retinoblastoma protein (RB1)*, deux régulateurs négatifs de la voie de signalisation PI3K-AKT, sont connus pour participer au développement de la résistance du mélanome. Des mutations de PTEN ou RB1 menant à une perte de leur fonction corrèle avec une augmentation de l'activation de la voie PI3K-AKT. La disponibilité de cette voie de signalisation affecte directement la résistance en mélanome en diminuant la dépendance du mélanome à la voie BRAF pour activer les programmes transcriptionnels nécessaires à sa prolifération et à sa survie (108).

Les multiples voies de signalisation utilisées par le mélanome pour développer des mécanismes de résistance aux thérapies ciblées ne sont pas les seuls défis à surmonter pour traiter ce type de cancer de façon consistante. Le fardeau mutationnel associé au mélanome est un défi colossal à surmonter afin d'être en mesure de traiter tous les mélanomes. À

cause de leur fréquence de mutation élevée, les mélanomes ont la particularité de former des tumeurs très hétérogènes en plus de posséder la capacité de modifier leur métabolisme afin soutenir leur progression. Ces spécificités sont hautement importantes afin de comprendre le fonctionnement du mélanome et ainsi établir une stratégie pour le supprimer.

1.3.6 Hétérogénéité du mélanome

L'hétérogénéité du mélanome peut se définir par les différences retrouvées entre les cellules d'une même tumeur (intratumoral), de tumeurs d'un même patient dont l'origine cellulaire est la même (intertumoral) ou entre des tumeurs de la même origine pour différents patients (interpatient). Ces différences peuvent être expliquées en partie par les différentes mutations génétiques, mais aussi par la composition de l'environnement dans lequel les cellules tumorales évoluent (109). Les nombreuses mutations génétiques, alimentées par la vitesse de division cellulaire élevée des cellules de mélanome, contribuent à la pression sélective du mélanome et à l'acquisition de la résistance aux thérapies en favorisant la survie des cellules adaptées à leur environnement. L'hétérogénéité du mélanome est bien illustrée par le niveau d'expression du gène *MITF* présent dans le mélanome puisque ce facteur de transcription joue un rôle déterminant dans son comportement (voir section 1.3.1). Autant une expression élevée qu'une expression faible de *MITF* peut promouvoir la survie et la résistance dans le mélanome (110, 111). Outre son implication dans la mélanogenèse, le niveau de *MITF* présent dans le mélanocyte dicte sa différenciation et sa prolifération en plus de contrôler le phénotype invasif du mélanome (112). Un autre bon exemple de l'hétérogénéité du mélanome est sa capacité à adapter son métabolisme pour répondre à ses besoins. Il est reconnu que le métabolisme cellulaire influence directement la progression du mélanome en fournissant les bases essentielles à la production de l'énergie et des macromolécules dont les cellules ont besoin pour proliférer. En bref, cette hétérogénéité possède un impact non seulement sur les voies métaboliques exploitées par le mélanome, mais aussi sur l'inflammation et la réponse immunitaire innée mise en branle pour rétablir l'homéostasie cellulaire.

1.4 Les modifications métaboliques dans le mélanome et leur influence sur l'immunité

1.4.1 Remodelage métabolique et effet Warburg

Le métabolisme cellulaire est vital pour la survie d'un organisme. Il regroupe diverses réactions chimiques qui vont permettre de convertir les nutriments provenant de l'alimentation en énergie ou en molécules qui seront utilisées pour fabriquer des protéines, des lipides et des acides nucléiques. À l'aide d'une panoplie de voies métaboliques, les cellules sont en mesure de produire l'énergie et les molécules nécessaires à la réplication de leur ADN et à leur prolifération. La principale source d'énergie produite par les cellules est l'adénosine triphosphate ou ATP, une molécule utilisée par tous organismes vivants pour générer l'énergie nécessaire aux différentes réactions biologiques prenant place dans un être vivant. Cette énergie est généralement produite par l'action de la glycolyse ou par la phosphorylation oxydative (OXPHOS), les deux principaux processus de production énergétique chez les eucaryotes. En présence d'oxygène, les cellules privilégient normalement l'utilisation de l'OXPHOS et du cycle de l'acide citrique (CAC), processus par lequel le pyruvate provenant de la glycolyse sera oxydé pour générer l'ATP. Dans les eucaryotes, ceux-ci prennent place dans la mitochondrie, l'organelle dont la fonction principale est la production de l'ATP (**Figure 3**). Les mitochondries sont composées d'une membrane externe et d'une membrane interne séparées par l'espace intermembranaire. Le CAC prend place dans la matrice des mitochondries, l'espace inclus dans la membrane interne et consiste en une succession de réactions qui relâchent des molécules de NADH et FADH₂. Celles-ci seront ensuite reprises par les complexes de la chaîne de transport d'électron, situés dans la membrane interne, où les molécules de NADH et FADH₂ seront réduites en NAD⁺ et FAD pour créer un gradient de proton qui permettra à l'ATP synthase (ATPS) de convertir l'ADP en ATP (**Figure 3**) (113). Les différentes étapes du CAC sont contrôlées par plusieurs enzymes dont certaines agissent comme point de contrôle pour les étapes suivantes du cycle. Une de ces enzymes est l'isocitrate déshydrogénase dont on retrouve trois isoformes (IDH1, IDH2 et IDH3). IDH3, l'isoforme principale dans la matrice mitochondriale, permet la conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate et agit comme enzyme limitante du CAC puisque cette conversion est une réaction irréversible (114). L' α -cétoglutarate déshydrogénase, une autre enzyme ayant un rôle majeur dans le

CAC, permet de catalyser la réaction menant à la formation succinyl-CoA à partir de l' α -cétooglutarate. Tout comme pour l'enzyme IDH, l' α -cétooglutarate déshydrogénase joue un rôle limitant dans le CAC compte tenu de la nature irréversible de la réaction qu'elle catalyse. L'activité de ces deux enzymes est régulée principalement par le niveau d'ATP présent dans la cellule où une grande quantité d'ATP ralentit le cycle alors qu'une faible quantité d'ATP stimule l'activité enzymatique d'IDH et de l' α -cétooglutarate déshydrogénase.

Alors que les cellules saines requièrent le bon fonctionnement des mitochondries pour produire l'ATP grâce au CAC, les cellules cancéreuses peuvent, quant à elles, utiliser le cycle de l'acide citrique pour d'autres fonctions que la production d'ATP. Le mélanome est notamment capable de détourner les molécules intermédiaires du CAC pour s'en servir comme précurseurs pour d'autres voies métaboliques servant à leur prolifération. Par exemple, l'oxaloacétate, qui se condense normalement avec l'acétyl-CoA pour former le citrate lors de la première étape du CAC, est plutôt converti en aspartate. L'aspartate agira de concert avec un autre intermédiaire du CAC, le malate, pour opérer la navette aspartate-malate qui déplace les molécules de NADH produites dans le cytosol par la glycolyse vers la mitochondrie. L'aspartate produit à partir de l'oxaloacétate est utilisé par les cellules du mélanome pour synthétiser les pyrimidines nécessaires à la production des nucléotides qui seront par la suite utilisés lors de la prolifération du mélanome (115). Un autre intermédiaire du CAC utilisé dans d'autres voies métaboliques dans le contexte du mélanome est le citrate. En temps normal, les cellules peuvent utiliser le citrate produit par le CAC pour synthétiser des acides gras. La réduction de la glutamine est alors utilisée comme source de production d' α -cétooglutarate (116). Cependant, le mélanome, tout comme d'autres cancers, a la capacité d'inverser le sens du CAC afin de produire du citrate à partir de l' α -cétooglutarate généré par la réduction de la glutamine. Ce phénomène survient grâce à IDH1 et IDH2 qui, contrairement à IDH3, peuvent réaliser la carboxylation de l' α -cétooglutarate pour produire l'isocitrate (**Figure 3**) (116, 117). Le citrate produit ce cette façon sera utilisé pour synthétiser des acides gras et promouvoir la progression du mélanome (118). Dans le mélanome, des mutations de IDH1 confèrent un avantage sélectif

à ces cellules en contribuant à la reprogrammation métabolique via une augmentation de la méthylation des histones (119).

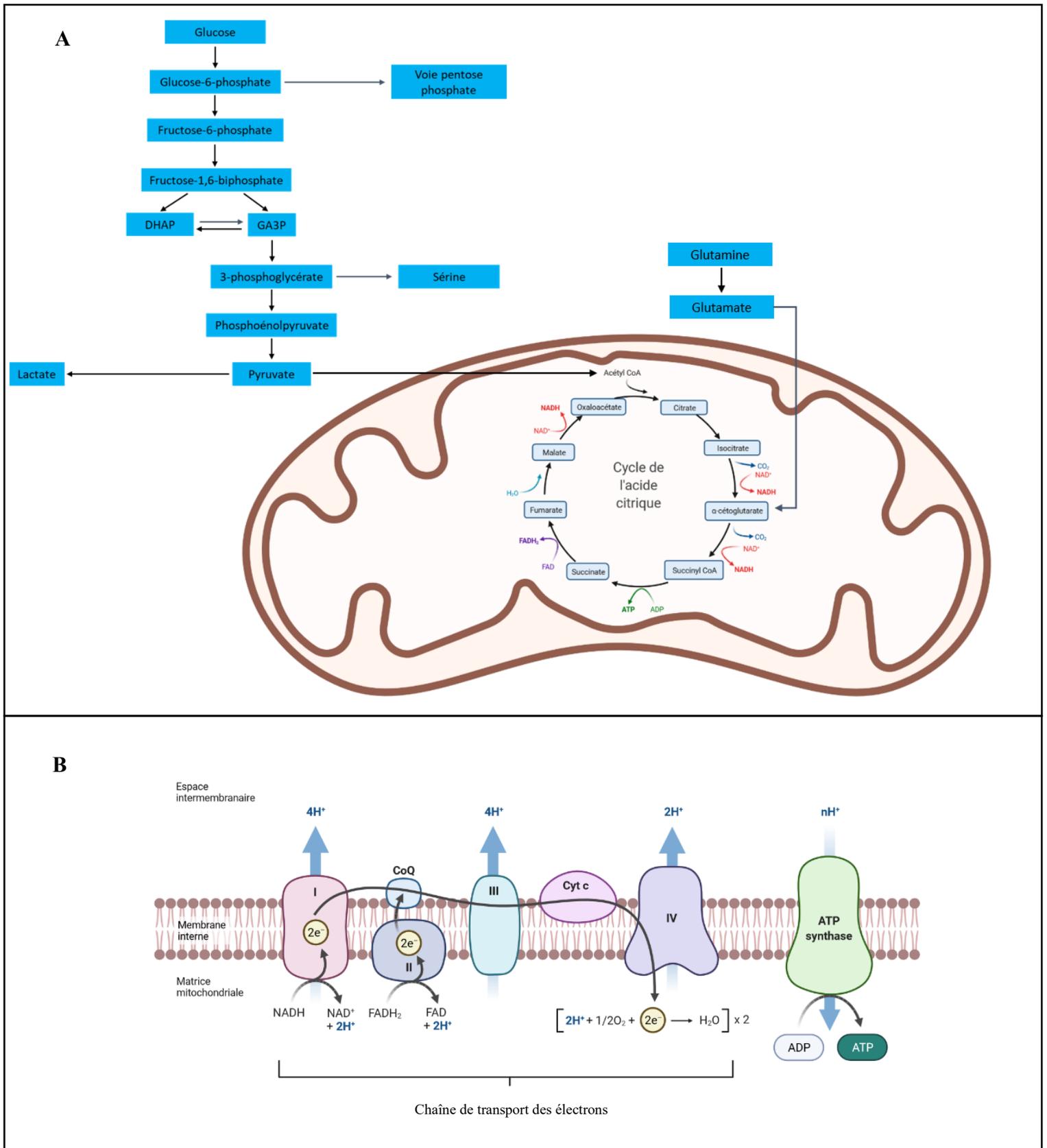


Figure 3 : Étapes de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative ^(115, 120-123). A. Dans les cellules normales, la

glycolyse et la phosphorylation oxydative agissent ensemble afin de produire l'ensemble des molécules d'ATP. Pour y parvenir, le glucose est métabolisé en pyruvate dans le cytosol des cellules. Le pyruvate est ensuite oxydé en acétyl-CoA dans la mitochondrie où celui-ci entre dans le cycle de l'acide citrique (CAC) afin de produire l'ATP. Le CAC génère 3 molécules de NADH et 1 molécule de FADH₂ qui vont générer le gradient de proton nécessaire au fonctionnement de la chaîne de transport des électrons. Au total, la combinaison de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative produit 32 molécules d'ATP en présence d'oxygène comparé à seulement 2 molécules d'ATP par la fermentation du lactate résultant de la glycolyse seule en absence d'oxygène. Dans un contexte de cancer, les cellules tumorales utilisent majoritairement la glycolyse pour produire leur énergie malgré la présence d'oxygène. La glycolyse aérobie, aussi connue sous le nom d'effet Warburg permet aux cellules cancéreuses de produire des métabolites nécessaires à leur division cellulaire à partir de macromolécules autres que le glucose. Par exemple, la glutamine est utilisée pour générer l' α -cétoglutarate qui, en inversant le CAC, permet la production d'acétyl-CoA à partir du citrate et la synthèse de lipides. Les intermédiaires de la glycolyse sont aussi impliqués dans génération des métabolites qui seront utilisés par les cellules cancéreuses. Par exemple, le glucose-6-phosphate sera utilisé dans la voie des pentoses phosphates pour générer des acides nucléiques alors que le 3-phosphoglycérate sera métabolisé en sérine. **B.** La chaîne de transport des électrons est indispensable à la phosphorylation oxydative. Celle-ci est située dans la matrice mitochondriale et est composée des complexes I à IV ainsi que du cytochrome c. Les différents complexes font circuler les électrons obtenus des molécules de NADH et FADH₂ pour générer un gradient de proton. Ce gradient sera ensuite utilisé par l'ATP synthase, une enzyme qui permet la conversion de l'ADP en ATP. **DHAP** : Dihydroxyacétone phosphate. **GA3P** : Glycéradehyde-3-phosphate. Figure créée à l'aide de Biorender : www.biorender.com

Malgré la présence de mitochondries fonctionnelles dans le mélanome, la majorité des lignées cellulaires de mélanome favorisent plutôt l'utilisation de la glycolyse pour produire la plus grande part de leur énergie. Dans les cellules normales, la glycolyse est utilisée comme voie de production énergétique alternative à l'O₂PHOS lorsque l'oxygène n'est pas disponible. Dans cette voie métabolique, le pyruvate n'entre pas dans le CAC et est simplement réduit en lactate pour produire une quantité moindre d'ATP. Le mélanome, comme la plupart des cancers, possède la capacité de reprogrammer le métabolisme du glucose pour favoriser la glycolyse même en présence d'oxygène. Cette reprogrammation métabolique, connue sous le nom de l'effet Warburg, permet au mélanome de répondre à ses besoins énergétiques et de maintenir son rythme de prolifération (124). La reprogrammation du métabolisme du glucose est partiellement attribuable aux mutations des voies de signalisation MAPKs et PI3K-AKT qu'on observe dans le mélanome (**Figure 2**). L'activation constitutive de la voie MAPKs provoquée par les mutations de BRAF, NRAS ou NF1, entraîne une augmentation de la traduction des gènes *MYC* (125) et *hypoxia inducible factor 1 alpha* (HIF1 α) via l'activation de mTOR et la phosphorylation subséquente du *eukaryotic translation initiation factor E4-binding protein 1* (EIF4EBP1)

(126). HIF1 α est un joueur clé de la glycolyse; en condition d'hypoxie, son expression est régulée à la hausse afin de favoriser la production d'énergie par la glycolyse. Pour que ce changement métabolique soit possible, HIF1 α régule à la hausse des enzymes nécessaires à la glycolyse telles que l'enolase et l'aldolase et régule à la baisse la pyruvate déshydrogénase qui favorise plutôt l'utilisation du CAC en convertissant le pyruvate en acetyl CoA (127, 128). De plus, l'augmentation du transporteur du glucose *GLUT1*, dont l'expression est régulée positivement par HIF1 α , contribue à l'utilisation continue de la glycolyse (129).

Le CAC et la glycolyse ne sont pas les seules voies métaboliques qui sont altérées ou reprogrammées dans le mélanome. La voie de la synthèse de la proline y est aussi affectée. Contrairement à d'autres types de cancer où la synthèse de la proline peut se faire à partir de l'arginine et de la glutamine, la synthèse de proline dans le mélanome est dépendante de la glutamine. Le mélanome surexprime 2 des 3 isoformes de la pyrroline-5-carboxylate réductase (PYCR), l'enzyme limitante dans la synthèse de la proline. La surexpression de PYCR1 et PYCR2, mais pas PYCRL, la troisième isoforme, confère des avantages évolutifs au mélanome puisque la production de proline permet de produire des protéines composants la matrice extracellulaire qui sont utiles à la progression tumorale (130, 131). La synthèse de proline dans le mélanome serait aussi essentielle au maintien de l'équilibre d'oxydoréduction (redox) des cellules du mélanome (132).

Une conséquence importante de l'utilisation massive de la glycolyse est la production accrue de lactate. Sa présence dans le microenvironnement cellulaire contribue à l'altération des fonctions biologiques normales et à la suppression de la réponse immunitaire contre le mélanome. La surexpression de HIF α , causée par l'environnement hypoxique du mélanome, contribue à la sécrétion du lactate (133). La sécrétion de lactate dans cet environnement s'accompagne d'une diminution du pH extracellulaire (134). L'acidification de l'environnement tumoral du mélanome facilite la métastase car le faible pH favorise les interactions collagène-intégrine, deux protéines de la matrice extracellulaire (ECM) connues pour leur rôle dans l'adhésion cellulaire. Cette acidification induit aussi l'expression de métalloprotéinases (MMPs), des enzymes qui peuvent dégrader

les protéines de la ECM, ce qui facilite la métastase du mélanome (135). Le lactate exerce aussi un effet important sur les cellules immunitaires présentes dans la région tumorale. La concentration élevée de lactate dans l'environnement cellulaire inhibe la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques et participe l'évasion immunitaire du mélanome (136). La présence de lactate provoque aussi un changement phénotypique du macrophage. Le macrophage peut être polarisé de 2 façons différentes : le phénotype M1 possède un effet antitumoral et utilise la glycolyse pour produire son ATP alors que le phénotype M2 joue un rôle dans la réparation des tissus et produit son énergie grâce à l'OXPPOS. La présence de lactate agit comme signal pour convertir les macrophages de type M1 en macrophage de type M2, ce qui favorise la progression du mélanome en empêchant le macrophage M1 d'exercer son activité antitumorale (137).

Le remodelage métabolique effectué par le mélanome affecte non seulement son propre développement, mais aussi les fonctions des cellules saines environnantes. Comme mentionné précédemment, les cellules associées à la réponse immunitaire innée tel que les macrophages sont grandement affectés par les changements dans le microenvironnement entourant les cellules du mélanome. Ces changements auront un impact direct sur l'efficacité des différents éléments du système immunitaire à freiner la progression du mélanome ainsi que sur l'évolution de la tumeur.

1.4.2 La réponse immunitaire et son influence sur le microenvironnement tumoral

La réponse immunitaire et l'inflammation sont des mécanismes cellulaires essentiels à la défense de l'organisme. La réponse immunitaire habituelle consiste en une phase d'initiation, où une variété de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires sont sécrétées pour recruter des cellules immunitaires telles que les neutrophiles et les macrophages, et une phase de résolution, où des cytokines anti-inflammatoires sont sécrétées afin de résoudre la réponse initiale (138). L'activation de la réponse immunitaire innée est médiée par des voies de signalisation dont les plus connues sont la voie impliquant le *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) et la voie des interférons (IFN) incluant la voie janus kinase (JAK)-*signal transducer and activator of transcription* (STAT) et l'*interferon*

regulatory factor 3 (IRF3). Un débalancement de la production des différentes cytokines pro- et anti-inflammatoires empêche la résolution de l'inflammation et entraîne un état d'inflammation chronique. Dans les cancers, les cellules tumorales produisent constamment des cytokines pro-inflammatoires qui activent la réponse immunitaire sans résolution de l'inflammation (139, 140) et permettent l'établissement d'une inflammation chronique qui participe activement à la mise en place d'un microenvironnement propice à la croissance tumorale.

NF- κ B est une famille de protéine essentielle à l'activation de la transcription de gènes pro-inflammatoires qui vont aider à monter une réponse immunitaire. Cette famille est composée de 5 membres, p50, p52, RelA (aussi connu sous le nom de p65), RelB et c-Rel, qui peuvent s'associer en homo ou hétérodimère afin de cibler des gènes codant pour des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires. L'activation classique de NF- κ B débute lors de la liaison d'une cytokine telle que l'interleukine 1 (IL-1) à son récepteur. Cette liaison entraîne l'activation du complexe I κ B kinase (IKK). Ce complexe est composé des sous-unités IKK- α (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha), IKK- β et NEMO (NF-kappa-B essential modulator). Une fois activé, ce complexe permet la phosphorylation de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B α , et entraîne sa dégradation par le protéasome. La dégradation de I κ B α permet la translocation du dimère NF- κ B (p.ex p50/RelA ou p50/c-Rel) au noyau pour initier la transcription de cytokines et d'autres facteurs qui vont promouvoir la survie cellulaire (141-143) (**Figure 4**). Dans le mélanome, plusieurs mutations abordées précédemment participent à l'augmentation de l'activité de la voie NF- κ B. Les mutations de PTEN, *BRAF* ou *NRAS* agissent en activant le complexe IKK et augmentent l'activité de NF- κ B. Le gène *p16INK4A* agit normalement comme inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B en se liant à la sous-unité p65. Dans le mélanome, une mutation de gène empêche la liaison p16INK4A-p65 et provoque une augmentation de l'activité de NF- κ B(144).

La voie IFN est impliquée dans la régulation transcriptionnelle d'un large éventail de gènes qui vont réguler la réponse immunitaire innée. La voie IFN est activée par les IFN de type I (IFN α et IFN β), les IFN de type II (IFN γ) ainsi que plusieurs cytokines pro- ou

anti-inflammatoires (IL-6, IL-10). La liaison des IFNs à leur récepteur permet l'activation de JAK et la tyrosine kinase 2 (TYK2). Cette activation permet la phosphorylation subséquente des STATs, une famille de facteur de transcription importante de la voie des IFNs. Lorsqu'ils sont activés, les STATs formeront un homodimère ou un hétérodimère pour ensuite se transloquer au noyau et activer la transcription de gènes sensibles aux IFNs (**Figure 4**). La voie de signalisation des IFNs est connue pour empêcher la réplication virale et promouvoir la réponse antivirale des lymphocytes T (145). Dans un contexte de cancer, la voie IFN, via STAT1, joue un rôle antitumoral en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et augmentant l'efficacité de reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T. Dans le mélanome, l'activation de STAT1 est impliquée dans la résistance aux thérapies anticancéreuses telles que la radiothérapie et l'immunothérapie (146, 147).

Les facteurs de transcriptions de la famille des IRFs sont essentiels dans la mise en place d'une défense immunitaire. L'activation des IRFs survient habituellement en réponse à une infection. Par exemple, la liaison d'un *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) à un *Toll-like receptor* (TLR) permet l'activation du complexe *Tank binding kinase 1*(TBK1)-IKK ϵ et la phosphorylation subséquente d'IRF3. Ceci permettra ensuite sa dimérisation et sa translocation vers le noyau pour activer la transcription de gènes associés à la réponse interféron tel qu'IFN α , IFN β et de gènes pro-inflammatoires (RANTES, IP-10) (148) (**Figure 4**). L'activation spécifique de IRF3 agit comme suppresseur de tumeurs en favorisant l'activité anticancéreuse de la réponse immunitaire adaptative (149, 150). Cependant, il a aussi été montré qu'une suractivation des IRFs est associée à la progression tumorale (151).

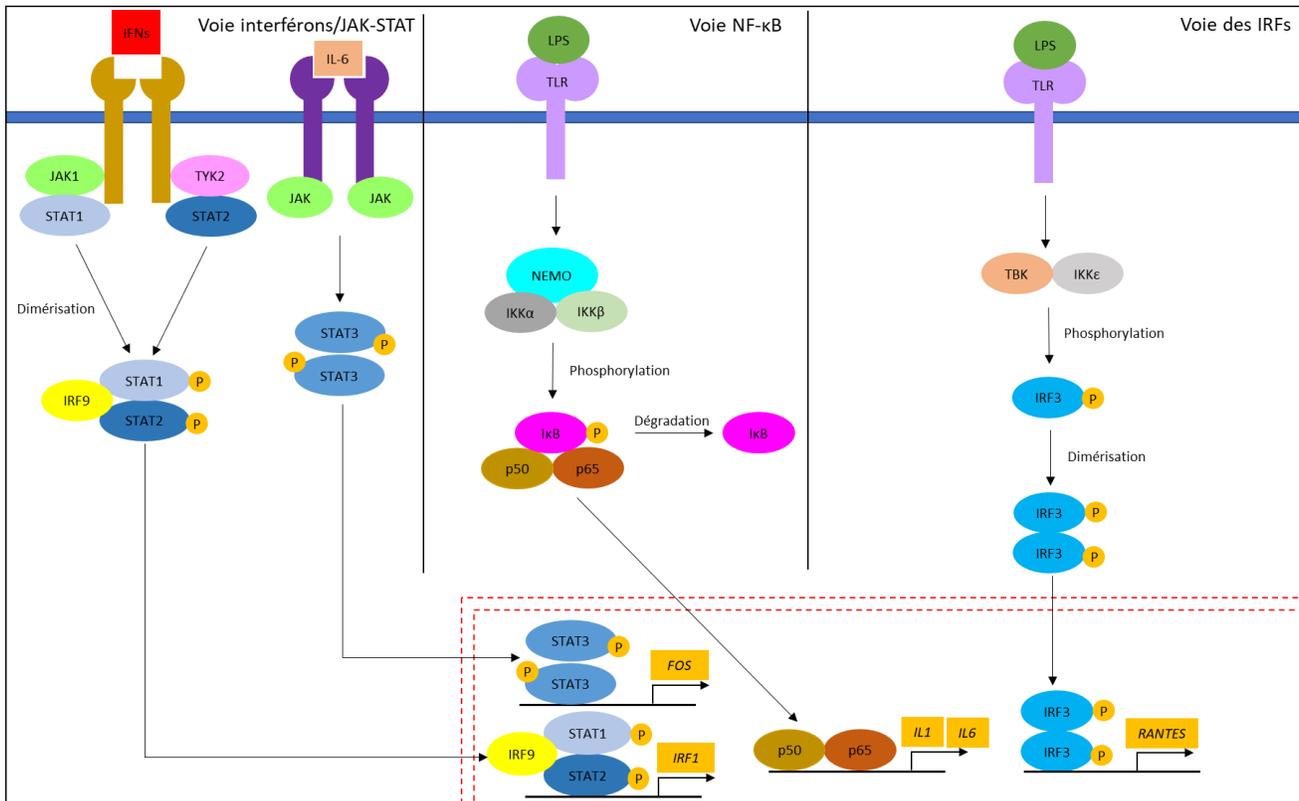


Figure 4 : Principales voies de signalisation de l'immunité innée (143, 145, 152-159). A. Dans le mélanome, la voie des IFNs/Jak-STAT est considérée comme antitumorale. Cependant, la signalisation par IL-6 permet l'activation de STAT3, qui joue un rôle important dans la progression tumorale en favorisant le remodelage du microenvironnement tumoral via la production de cytokines immunosuppressives qui empêche l'activité antitumorale des lymphocytes cytotoxiques. B. La voie de signalisation NF-κB est importante dans le mélanome puisque les cellules tumorales ont la capacité de sécréter des cytokines pro-inflammatoires qui activent cette voie. NF-κB va, à son tour, induire la transcription de cytokines et chimiokines qui vont renforcer l'état inflammatoire du microenvironnement du mélanome. L'augmentation de l'expression d'IL-6 due à l'activité transcriptionnelle de NF-κB peut ensuite la voie JAK-STAT et promouvoir l'immunosuppression via STAT3. C. IRF3 peut être activé par un large éventail de *pattern recognition receptors* (PPRs) incluant *acid-inducible gene-1* (RIG-I), *cGMP-AMP synthase* (cGAS) et *stimulator of IFN gene* (STING) pour induire l'expression de cytokines et de gènes de la réponse interféron de type I. Dans le cancer, l'activation de la voie des IRFs peut avoir autant des effets protumoraux que des effets antitumoraux dépendamment des IRFs impliqués. L'expression d'IRF3 en particulier est augmentée dans le cancer du poumon.

L'environnement dans lequel les cellules tumorales évoluent, aussi appelé le microenvironnement tumoral (TME), est composé de différentes cellules non tumorales telles que les cellules immunitaires et les fibroblastes, mais aussi des éléments qui composent la matrice extracellulaire et des produits sécrétés par les cellules avoisinantes. Cet amalgame de cellules et de produits dérivés de l'activité cellulaire forme un environnement compact qui limite l'apport en oxygène et en nutriment aux cellules du

mélanome (160). Afin de survivre, le mélanome doit développer une flexibilité métabolique qui lui permet de combler ses besoins énergétiques pour soutenir sa croissance. Tel que mentionné précédemment, les altérations métaboliques du mélanome permettent le recrutement de cellules immunitaires, plus particulièrement les macrophages. Les macrophages associés à la tumeur (TAM) qui les a recrutée sécrètent une variété de cytokines, de protéases et de facteurs de croissance favorisant la prolifération du mélanome. Parmi les éléments sécrétés par les macrophages, on retrouve une variété de cytokines dont le *transforming growth factor beta* (TGF- β), le *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), l'interleukine 10 (IL-10) et l'interleukine 1 alpha (IL-1 α) (161). Le TNF α est une cytokine importante dans l'activation des mécanismes Les macrophages associés à la tumeur (TAM) qui les a recrutée d'inflammation et de prolifération et de survie cellulaire. Via ses récepteurs TNFR1 et TNFR2, Le TNF α active la voie des MAPKs et le complexe IKK permettant la translocation de NF- κ B au noyau (162). TGF- β est une cytokine qui possède des rôles opposés dans le développement du mélanome. Dans les stades précoces du mélanome, la sécrétion du TGF- β est associée à une inhibition de la croissance cellulaire. Cependant, durant la progression tumorale, la combinaison du développement d'une résistance à l'effet antiprolifératif du TGF- β dans le mélanome et l'augmentation de son expression dans le TME est associé à un mélanome plus agressif qui s'accompagne d'une immunosuppression, d'angiogenèse et d'une augmentation de la survie cellulaire (163, 164). IL-10 est, quant à elle, une cytokine jouant un rôle majeur dans la survie du mélanome puisque sa présence dans le TME empêche l'activité antitumorale des lymphocytes T cytotoxiques présents dans la tumeur (140). La sécrétion de ces cytokines par les macrophages permet la sécrétion subséquente de l'interleukine 8 (IL-8) et du *Vascular Endothelial Growth factor* (VEGF) par les cellules du mélanome et les fibroblastes associés au cancer (CAFs). La présence de VEGF et d'IL-8 dans le TME est un autre facteur qui favorise l'évolution du mélanome vers une forme plus agressive et un phénotype métastatique (165) puisque le VEGF et l'IL-8 sont directement responsables de l'angiogenèse, phénomène par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés pour soutenir la croissance de la tumeur via l'apport en oxygène et en nutriments.

Le TME ne fait pas qu'alimenter le mélanome en nutriment et en oxygène; les molécules et cellules qui s'y trouvent permettent aussi de caractériser le type de tumeur selon l'infiltration lymphocytaire et de prédire la réponse de la tumeur aux traitements. La capacité d'infiltration de la tumeur par les cellules immunitaires permet de classifier les tumeurs en deux catégories : les tumeurs froides et les tumeurs chaudes (166). Les tumeurs froides sont définies par la faible présence ou l'absence complète de lymphocytes T cytotoxiques dans la tumeur. Ce type de tumeur est associé à un faible taux de réponse aux thérapies et au développement de la résistance (167). En contrepartie, les tumeurs chaudes sont des tumeurs activement infiltrées par des lymphocytes T. Ces tumeurs sont habituellement associées à un meilleur pronostic puisque celles-ci répondent bien à l'utilisation des immunothérapies (168). La capacité des cellules tumorales à s'adapter à l'environnement dans lequel elles évoluent confère la possibilité aux tumeurs chaudes de devenir des tumeurs froides à l'aide de divers mécanismes. Un de ces mécanismes consiste à surexprimer des molécules du point de contrôle immunitaire. L'interaction entre les molécules du point de contrôle à la surface du mélanome et leur ligand à la surface des cellules immunitaires les empêche de reconnaître et détruire le mélanome. Parmi les molécules du point de contrôle, les plus connues sont PD-1/PD-2 et CTLA-4, mais il en existe d'autres. Plusieurs de ces molécules sont exprimées à la surface des cellules composant la tumeur et inhibent l'action des cellules immunitaires par différents mécanismes. Par exemple, l'augmentation de l'expression de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) dans le TME due à la présence d'interféron entraîne la tolérance (ou anergie) des lymphocytes T du TME envers les cellules tumorales en inhibant l'activité du *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) par l'épuisement du tryptophane de l'environnement cellulaire (169). Le récepteur ecto-5'-nucleotidase (CD73), quant à lui, permet de dicter la composition du TME en convertissant l'adénosine monophosphate (AMP) en adénosine (170). L'adénosine agit ensuite via ses récepteurs A2A et A2B à la surface des cellules immunitaires présentes dans le TME pour promouvoir la production de métalloprotéases, de VEGF et de cytokines favorisant un environnement immunosuppresseur (171) avantageux à la survie du mélanome. La molécule du point de contrôle immunitaire *V-domain Ig suppressor of T cell activation* (VISTA) est exprimée de façon hétérogène à la surface du mélanome. Son interaction avec les lymphocytes T

régulateurs diminue la réponse immunitaire alors que son interaction avec les TAM mène à une hausse de l'expression de PD-L1 (172-174). L'activité anti-inflammatoire exercée par VISTA suggère qu'il pourrait permettre au mélanome de contourner l'inhibition des voies PD-L1 et CTLA-4 et favoriser l'immunosuppression et la résistance au traitement. Galectine-9 (*LGALS9*) est un autre joueur majeur du développement de la résistance au traitement et la détermination de la composition du TME (175). Il participe notamment à l'épuisement immunitaire en provoquant l'apoptose des lymphocytes T auxiliaires (CD4+) via son interaction avec le récepteur *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing-3* (TIM-3) présent à la surface de ces cellules (176, 177).

La contribution des différentes voies inflammatoires dans le développement du mélanome est non négligeable. De plus, l'habileté du mélanome à exploiter le lien étroit entre la composition du TME et l'activité antitumorale des cellules immunitaires est un élément crucial de l'évasion immunitaire. Ces deux aspects peuvent être dépendants du métabolisme cellulaire puisque, d'une part les voies inflammatoires s'activent lors de la reprogrammation métabolique observée dans le mélanome et, d'autre part, l'augmentation de l'expression des molécules du point de contrôle immunitaire peut entraîner des modifications dans le TME qui vont favoriser la prolifération du mélanome. Une stratégie pour traiter le mélanome serait donc de rétablir le métabolisme cellulaire ou d'inhiber les voies métaboliques spécifiques au mélanome. En ce sens, les *peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1* (PGC-1) sont une famille de gènes dont l'implication dans le métabolisme cellulaire pourrait grandement dicter la croissance et la progression du mélanome.

1.5 La famille des PGC-1s

1.5.1 Structure et domaines fonctionnels

Les coactivateurs PGC-1s sont des maîtres régulateurs de la transcription de gènes liés aux métabolisme cellulaire, à la biogenèse mitochondriale, à la détoxification des ROS et à l'inflammation. Une homologie de séquence existe entre les gènes *PPARGC1A* (PGC-

1 α), *PPARGC1B* (PGC-1 β) et *PPRC1* (PRC), les 3 membres de cette famille de coactivateurs (**Figure 5**). Ceux-ci sont pourvus de domaines fonctionnels dont plusieurs sont conservés entre les différents membres. Ils possèdent un domaine activateur du côté N-terminal qui leur permet de lier des histones acétyl transférase (HAT) tel que le *CREB binding protein* (CBP/p300) et *steroid receptor coactivator-1* (SRC-1) lorsqu'ils interagissent avec le peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) (178). Ceci leur confère une capacité exceptionnelle pour activer la transcription génique puisque les HAT qu'ils recrutent vont acétyler les histones et dérouler la chromatine pour faciliter l'accès à l'ADN. Les PGC-1s possèdent aussi plusieurs motifs LXXLL et LLXXL qui sont des motifs connus pour lier des récepteurs nucléaires (178, 179). La région C-terminale de PGC-1 α et PRC a un domaine riche en arginine et en sérine ainsi qu'un domaine de liaison à l'ARN, contrairement à PGC-1 β qui ne possède que le domaine de liaison à l'ARN. La liaison des PGC-1s à un promoteur permet à ces domaines de s'associer à des protéines impliquées dans le contrôle de l'épissage de l'ARN messenger et de la transcription de l'ARN. PGC-1 α est notamment connu pour recruter le complexe du médiateur, un complexe protéique qui interagit avec la machinerie transcriptionnelle, en interagissant avec le *mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1* (TRAP220), une sous-unité composant ce complexe (180). Afin d'augmenter la transcription génique, PGC-1 α est capable de déplacer des répresseurs, tels que les histones désacétylases, présents sur les gènes ciblés par PGC-1 α (178). Les PGC-1s possèdent aussi le térapeptide DHDY, connu comme site de liaison du *host cell factor* (HCF) (181).

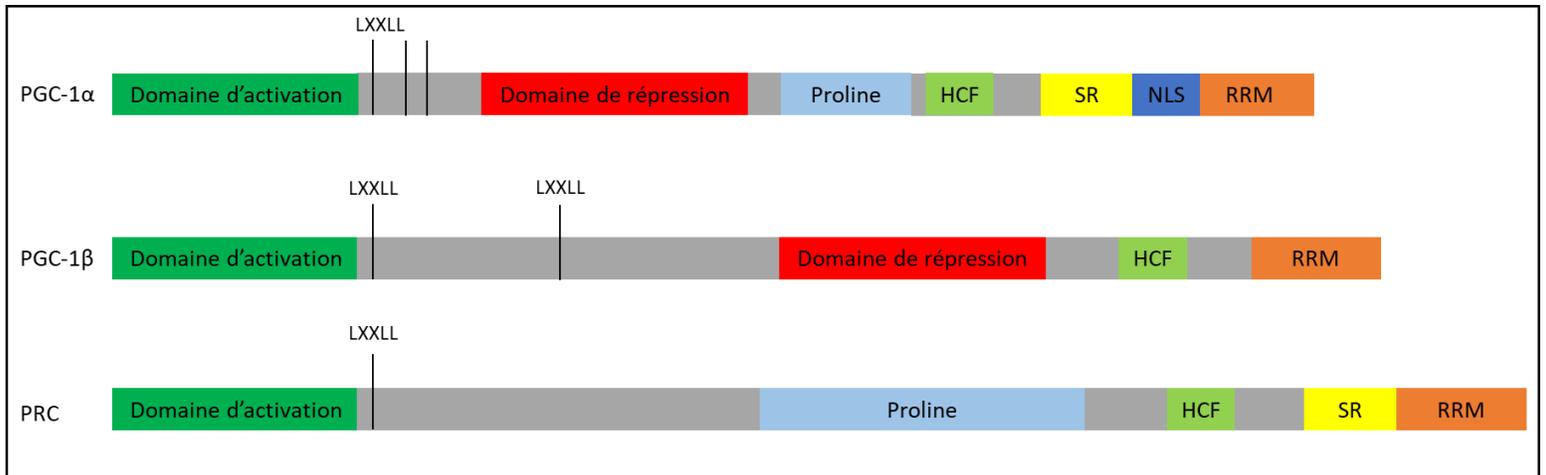


Figure 5 : Domaines fonctionnels des PGC-1s ^(178, 182-184). Tous les PGC-1s contiennent un domaine d'activation (Vert), un domaine de liaison au HCF (vert pâle), un motif de reconnaissance de l'ARM (RRM, orange) ainsi qu'un ou plusieurs motif LXXLL (ligne noire). PGC-1 α et PGC-1 β possèdent aussi un domaine de répression (rouge) sujet à des modifications post-traductionnelles qui vont moduler leur activité (voir section 1.5.5). PGC-1 α et PRC sont pourvus d'une région riche en proline (bleu pâle) dont la fonction n'a pas été caractérisé mais pourrait jouer un rôle dans la liaison au NRF1. PGC-1 α contient aussi une séquence de localisation nucléaire (NLS, bleu foncé).

1.5.2 Facteurs de transcriptions et récepteurs nucléaires ciblés par les PGC-1s

L'habileté des PGC-1s à interagir avec une grande variété de facteur de transcription et de récepteurs nucléaires leur permet d'activer plusieurs programmes biologiques distincts. PGC-1 α peut notamment coactiver des gènes associés à la fonction mitochondriale telle que les *nuclear respiratory factor* (NRFs) et les *estrogen-related receptor* (ERRs) (185). Les NRFs sont des facteurs de transcription connus pour induire la transcription de gènes mitochondriaux (*TFAM*, *TFB1M*, *TFB2M*) (186), de la croissance cellulaire (*E2F4*, *P130*) (187) et de gènes nucléaires nécessaires à la genèse des complexes respiratoires (188). Les ERRs sont aussi des facteurs de transcription qui, en plus de stimuler la biogenèse mitochondriale, jouent un rôle dans la gluconéogenèse, la synthèse des acides gras et le CAC. PGC-1 α coactive aussi les *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) qui sont impliqués dans la différenciation cellulaire et le métabolisme cellulaire, plus particulièrement l'oxydation des acides gras. Finalement, PGC-1 α peut lier différents récepteurs nucléaires et facteurs de transcription qui régulent la gluconéogenèse incluant le *glucocorticoid receptor* (GR), *forkhead box protein O1* (FOXO1) et *hepatic*

nuclear factor-4 α (HNF4 α) (189). Le rôle de chacun des PGC-1s sera abordé plus en détails dans la section suivante.

1.5.3 Fonctions classiques et mécanismes d'activation

Les PGC-1s sont classiquement connus pour leur implication dans la régulation énergétique et la biogenèse mitochondriale. PGC-1 α , le membre le plus étudié de cette famille de corégulateurs transcriptionnels, a initialement été découvert dans le tissu adipeux brun où il contribue à la thermogenèse, phénomène où l'organisme produit de la chaleur en augmentant son métabolisme cellulaire, après une exposition au froid (190). L'activation de PGC-1 α lors de cette exposition se fait via la voie β 3-adrénergique, où l'interaction entre la norépinéphrine et les récepteurs β -adrénergiques provoque l'augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) pour ensuite activer la transcription de PGC-1 α . L'expression de PGC-1 β dans le tissu adipeux brun n'est pas induite par l'exposition au froid. Il a cependant été montré que PGC-1 β est essentiel au maintien du métabolisme oxydatif élevé nécessaire à la production de chaleur. Son absence dans les souris PGC-1 β knockout (KO) s'accompagne d'une sensibilité extrême au froid (191). Les PGC-1s sont fortement exprimés dans les muscles squelettiques où ils jouent un rôle dans l'adaptation des fibres musculaires puisque leur expression est augmentée en réponse à l'exercice physique (192). Afin de permettre l'adaptation des fibres musculaires squelettiques, le calcium et l'ATP relâchés lors de l'activité physique mènent à l'activation de PGC-1 α qui s'associera ensuite à des facteurs de transcription induisant la biogenèse mitochondriale. Contrairement à PGC-1 α , l'expression de PGC-1 β diminue dans le muscle squelettique en réponse à l'activité physique suggérant qu'il joue plutôt un rôle de maintien des fonctions musculaires. Dans les muscles squelettiques, les PGC-1s régulent négativement l'expression de cytokines pro-inflammatoire en réprimant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (193). Les PGC-1s sont aussi connus pour être présents dans le cœur où la diminution de l'expression de PGC-1 α ou de PGC-1 β est associée à des défaillances cardiaques (194, 195). La présence des PGC-1s dans le foie indique qu'ils jouent un rôle dans la régulation du glucose hépatique et la lipogenèse. En plus d'être un puissant activateur des gènes mitochondriaux hépatiques, PGC-1 α contrôle la

gluconéogenèse qui prend place dans les cellules hépatiques du foie via son association avec FOXO1 et HNF4 α (196). L'inhabileté de PGC-1 β à interagir avec les gènes de la gluconéogenèse indique qu'il possède des fonctions distinctes de PGC-1 α dans le foie. Au même titre que PGC-1 α , PGC-1 β active les gènes mitochondriaux hépatiques. Cependant, PGC-1 β régule la lipogenèse grâce à ses interactions spécifiques avec le *sterol regulatory element binding factor 1c* (SREBP-1c), le *liver x receptor α* (LXR α) et le *carbohydrate response element binding protein* (chREBP). Via son interaction avec *forkhead box protein A2* (FOXA2), PGC-1 β régule aussi la synthèse et le transport des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) (189). Tel que mentionné précédemment, les PGC-1s sont impliqués dans la respiration cellulaire en liant les NRFs (voir section 1.5.2). Notamment, PRC joue un rôle dans la croissance cellulaire en liant NRF1 et le *C-AMP response binding protein* (CREB) (184). De plus, PRC peut lier le HCF afin de permettre la progression du cycle cellulaire (197). Due à leur habileté à induire l'expression de gènes mitochondriaux, les PGC-1s sont aussi impliqués dans la détoxification du stress oxydatif. Ils augmentent notamment l'expression de la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathione peroxydase, deux enzymes qui permettent de détoxifier les ROS en les réduisant en eau (198). PGC-1 α et PGC-1 β peuvent aussi augmenter l'expression des *mitochondrial uncoupling protein 2* et *3* (UCP2 et UCP3), deux protéines qui permettent de découpler la phosphorylation oxydative de l'ATP synthase pour disperser le potentiel membranaire mitochondrial sous forme de chaleur et ainsi contribuer à diminuer la production de ROS (198). Afin d'exercer les multiples processus biologiques dans lesquels les PGC-1s sont impliqués, ceux-ci nécessitent une fine régulation au niveau transcriptionnel (section 1.5.4) et au niveau post-traductionnel (section 1.5.5).

1.5.4 Régulation transcriptionnelle

L'éventail de processus biologiques modulés par les PGC-1s nécessite qu'ils soient régulés par différents mécanismes. Classiquement, la transcription de PGC-1 α dans le tissu adipeux brun est fortement augmentée lors de l'exposition au froid (voir section 1.5.3) contrairement à PGC-1 β dont la transcription dans ce tissu n'est pas affecté par le froid et PRC qui est très peu induit lors de cette exposition (181, 197). PGC-1 α possède un site de

liaison sur son promoteur pour lier le facteur de transcription CREB, qui permet d'intégrer différentes voies de signalisation. Au niveau des muscles squelettiques, ceci se traduit par une augmentation de la transcription de PGC-1 α lorsqu'il y a une augmentation de la production d'ATP causée par l'exercice physique (199). La transcription de PGC-1 α dans le muscle est aussi régulé par le facteur de transcription *myocyte enhancer factor-2* (MEF2). Lorsque MEF2 est activé par une augmentation du calcium intracellulaire provoqué par l'exercice physique, il permet une boucle d'autorégulation positive où PGC-1 α augmente sa propre activité transcriptionnelle en coactivant MEF2 (199).

L'implication des PGC-1s dans différents processus métaboliques suggère que leur transcription peut être régulée par la disponibilité des nutriments dans l'organisme. Au niveau du foie, il a été montré que la transcription de PGC-1 α est régulé par le glucagon lors de l'état de jeûne (200). Inversement, la réalimentation diminue sa transcription. Contrairement à PGC-1 α , l'expression de PGC-1 β est régulée par une diète riche en gras via un mécanisme non caractérisé (201). La transcription de PRC est, quant à elle, induite par la présence de sérum dans les fibroblastes *in vitro* et son expression est maximale lors de la transition entre les phases G₀ et G₁ du cycle cellulaire (197).

Au-delà de l'alimentation, l'indisponibilité d'éléments essentiels à l'activité et à la survie cellulaire régule aussi l'expression des PGC-1s. Sans surprise, la déprivation en oxygène et la déplétion de l'ATP dans les cellules régulent à la hausse l'expression de PGC-1 α afin de déclencher des mécanismes compensatoires qui vont stimuler la biogenèse mitochondriale et la production d'ATP pour rétablir l'homéostasie cellulaire (189). Finalement, le rôle de PGC-1 α dans la détoxification des ROS via son interaction avec FOXO3, impliqué dans la production d'enzymes antioxydantes, et PPAR α , responsable de l'augmentation des peroxysomes (un organelle cellulaire), sous-entend que son expression est régulée à la hausse par la présence de ROS dans l'organisme (202).

Dans les kératinocytes, la transcription de PGC-1 α est induite lorsque la α -MSH se lie au récepteur MC1R et active l'AMPc (voir section 1.3.1) alors que l'expression de PGC-1 β reste inchangée (203). Les 2 PGC-1s ont cependant la capacité d'induire l'expression de

MITF (203) et pourraient donc jouer un rôle dans le développement du mélanome (voir section 1.3.6). La régulation de la transcription de PRC par la α -MSH dans les kératinocytes reste inexplorée à ce jour.

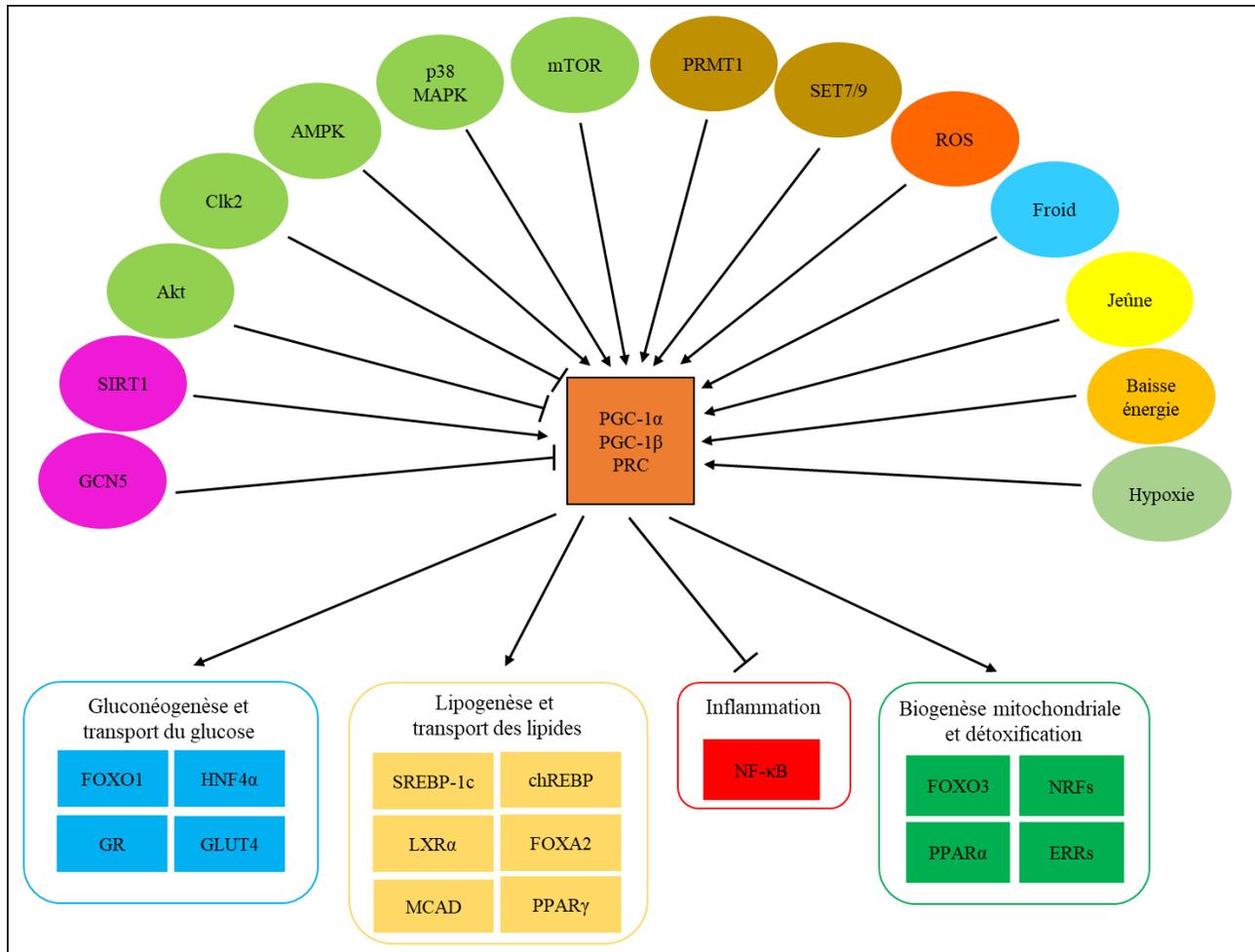


Figure 6 : Principaux régulateurs et voies métaboliques impliquant les PGC-1s. Le rôle des PGC-1s dans les différentes voies métaboliques nécessite qu'ils soient régulés de multiples façons. La modulation de l'acétylation (en rose), de la phosphorylation (en vert pâle) et de la méthylation (en brun) est nécessaire pour activer ou inhiber l'activité des PGC-1s. Lorsqu'ils sont activés, ceux-ci jouent un rôle essentiel dans l'inflammation (en rouge) ainsi que dans la régulation de plusieurs voies métaboliques telles que la gluconéogenèse (en bleu pâle), la lipogenèse (en jaune) et la biogenèse mitochondriale (en vert).

1.5.5 Régulation post-traductionnelle et composés chimiques affectant les PGC-1s

En plus d'être régulés au niveau transcriptionnel, les PGC-1s sont modulés au niveau post-traductionnel dans le cadre des fonctions biologiques normales, mais peuvent aussi être ciblés par de petites molécules chimiques. Parmi les modifications post-

traductionnelles, les PGC-1s peuvent notamment être acétylés, phosphorylés, méthylés ou ubiquitinés. L'acétylation de PGC-1 α par les HAT, dont l'interaction avec la *general control nonrepressed protein 5* (GCN5) est la mieux caractérisée, est connue pour inhiber l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α (204). La désacétylation de PGC-1 α par la sirtuine SIRT1, quant à elle, entraîne une régulation à la hausse de son activité s'accompagnant d'une augmentation générale de l'O₂PHOS et de la biogenèse mitochondriale (204). Comme PGC-1 α , l'activité de PGC-1 β est aussi régulée par l'acétylation et la désacétylation. GCN5 réprime aussi l'activité de PGC-1 β en acétylant plusieurs lysines présentes dans la protéine PGC-1 β et empêche l'expression de gènes cibles comme le *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase* (MCAD) et le *glucose transporter type 4* (GLUT4) (205). SIRT1 peut aussi désacétyler PGC-1 β . L'acétylation et la désacétylation des PGC-1s sont aussi modulées par de petites molécules chimiques. Le composé SR-18292, un inhibiteur de PGC-1 α , augmente son acétylation en favorisant l'interaction entre PGC-1 α et GCN5 (206). Le resvératrol, une molécule connue pour son impact sur la fonction mitochondriale et le métabolisme cellulaire, agit en activant SIRT1 et ainsi augmenter l'activité transcriptionnelle des PGC-1s (207).

La phosphorylation, autre modification post-traductionnelle importante dans la régulation de l'activité des PGC-1s peut contribuer autant à l'augmentation qu'à la diminution de leur activité transcriptionnelle. La phosphorylation de PGC-1 α par la kinase Akt empêche l'association de PGC-1 α avec des gènes clés de l'oxydation des acides gras et de la gluconéogenèse (208). Le métabolisme des lipides est aussi diminué lorsque PGC-1 α est phosphorylé par *CDC like kinase 2* (Clk2) (209). Parmi les kinases qui augmentent l'activité des PGC-1s, on retrouve AMPK (AMP-activated protein kinase) et p38 MAPK. Alors que la phosphorylation de PGC-1 α par AMPK est directement responsable de la régulation à la hausse de la transcription de gènes liés au métabolisme du glucose, la phosphorylation par p38 MAPK participe plutôt à la stabilisation de la protéine PGC-1 α (204). La phosphorylation des PGC-1s peut aussi être modulée grâce à des composés chimiques et des métabolites. Le AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) et la metformine, deux activateurs d'AMPK, sont d'ailleurs connus pour moduler l'activité de PGC-1 α . Il a été montré que AICAR augmente la transcription de

PGC-1 α en activant l'AMPK (210, 211) mais peut aussi diminuer sa transcription via un mécanisme indépendant de l'AMPK (212, 213). Outre le fait que la metformine régule à la hausse l'expression de l'ARNm et de la protéine PGC-1 α , celle-ci interfère avec la transcription de gènes de la gluconéogenèse médiée par PGC-1 α (214). Concernant les deux autres membres de la famille des PGC-1s, le rôle de la phosphorylation ne sont pas connus à ce jour.

La méthylation fait aussi partie des modifications post-traductionnelles connues pour réguler l'activité des PGC-1s dans l'organisme. PGC-1 α interagit notamment avec les méthyltransférases PRMT1 (Protein arginine N-methyltransferase 1) et SET7/9. La méthylation par PRMT1 serait directement responsable de l'augmentation de la transcription par PGC-1 α de gènes jouant un rôle dans la biogenèse et la fonction mitochondriale. Les modifications post-traductionnelles effectuées par SET7/9 seraient plutôt impliquées dans la promotion de programmes liés au stress métabolique (204). À ce jour, les rôles de la méthylation dans la régulation de PGC-1 β et PRC sont encore inconnus.

L'ubiquitination fait aussi partie des modifications post-traductionnelles possibles sur les PGC-1s. Comme plusieurs autres protéines, l'ubiquitination de PGC-1 α entraîne sa dégradation via son adressage au protéasome. Indirectement, le MG-132, un composé qui inhibe le protéasome, affecte l'activité des PGC-1s en empêchant leur dégradation (215). D'autres petites molécules provenant d'une banque de composés sont connues pour induire l'activation ou la stabilisation des PGC-1s (216). Cependant les mécanismes d'action de ces composés menant à l'activation ou à la stabilisation de l'activité des PGC-1s n'ont pas été caractérisés. D'autres composés pouvant activer ou inhiber l'activité des HAT, des méthyltransférases et des kinases pourraient potentiellement moduler l'activité transcriptionnelle des PGC-1s.

1.5.6 Rôles émergents des PGC-1s

Outre les rôles connus des PGC-1s dans la biogenèse mitochondriale et la régulation du métabolisme énergétique, leur implication dans différentes maladies métaboliques commence à être reconnue. Parmi les maladies présentant une composante métabolique non négligeable, on retrouve le diabète, l'obésité et, plus récemment, le cancer. Les rôles essentiels des PGC-1s dans la régulation du métabolisme mitochondrial, dans la gluconéogenèse et dans la régulation de la lipogenèse sous-entendent qu'un dysfonctionnement des PGC-1s pourrait avoir de graves conséquences sur la gestion du métabolisme cellulaire et que le rétablissement de ces aspects du métabolisme cellulaire permettrait le retour des fonctions biologiques normales. Dans le diabète de type 2, il a été montré que la diminution de PGC-1 α contribue au développement de la résistance à l'insuline dans les muscles squelettiques (207). Le rôle des PGC-1s dans le cancer est encore à l'étude. Il a été montré que la diminution de l'expression des PGC-1s autant que leur augmentation peut être responsable du remodelage métabolique observé dans le cancer, la croissance tumorale ou encore la métastase de certains cancers (115).

1.6 Implications du métabolisme cellulaire et des PGC-1s dans le développement du mélanome

1.6.1 Les mitochondries et l'immunogénicité du mélanome

Comme expliqué plus tôt, l'immunogénicité du mélanome est multifactorielle (voir section 1.3.5 et 1.3.6). La modification du métabolisme cellulaire provoquée par l'adaptation du mélanome amène un changement du microenvironnement cellulaire et permet l'engagement des voies de signalisation de la réponse immunitaire innée. Un déterminant important du métabolisme cellulaire et du contrôle de la réponse immunitaire innée est la mitochondrie. Il a été montré qu'une dysfonction mitochondriale provoque une relâche de l'ADN mitochondrial (ADNmt) dans le cytosol (217). L'ADNmt peut être reconnu par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaire (ou PRRs) et activer les voies de signalisation de l'immunité innée. Le complexe *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS)-*stimulator of interferon genes* (STING) est un PRR qui active les voies NF- κ B et IRF-3 lors de la reconnaissance d'ADNmt (218). Le senseur Rig-i/MAV, un autre PRR

essentiel à l'activation de l'immunité innée, permet plutôt la phosphorylation de STAT1 et la mise en branle de la voie des IFNs (219). D'autres mécanismes liés à la dysfonction mitochondriale peuvent aussi activer les voies de signalisation de l'immunité innée. Par exemple, la production de ROS ou encore un déséquilibre énergétique peuvent activer ces voies de signalisation (220, 221) et induire l'expression de molécule du point de contrôle immunitaire tel que PD-L1 (146, 222, 223). L'implication des mitochondries dans l'activation des voies de signalisation de l'immunité innée, la mise en branle de l'inflammation et l'expression des molécules du point de contrôle immunitaire montre que le métabolisme cellulaire joue un rôle essentiel dans la mise en place des mécanismes servant à la survie et la résistance du mélanome.

Les relations existantes entre le métabolisme cellulaire et la réponse immunitaire indiquent que les PGC-1s pourraient aussi être impliqués dans le contrôle de l'inflammation. Il a été montré que l'expression de PGC-1 α régule l'activation de NF- κ B via divers mécanismes. Tout d'abord, PGC-1 α agit comme répresseur de la production de cytokines pro-inflammatoires en liant la sous-unité p65 de NF- κ B et en empêchant son activité transcriptionnelle (224). En état inflammatoire, l'expression de PGC-1 α est réprimée par le TNF- α et l'IL1- β via l'activation de NF- κ B et p38 MAPK (225). La diminution de PGC-1 α provoque aussi une augmentation du stress oxydant (voir section 1.5.4), qui peut, à son tour, activer NF- κ B (226). L'habileté des PGC-1s à coactiver les PPARs pourrait aussi participer à la modulation de l'inflammation, puisque les PPARs agissent via la transrépression de NF- κ B, un mécanisme par lequel un facteur de transcription lié à une autre protéine sera incapable d'augmenter la transcription de gènes cibles (227, 228). Similaire à PGC-1 α , PGC-1 β joue aussi un rôle dans l'inflammation en soutenant la biogenèse mitochondriale dans le macrophage et en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires (229). Alors que le rôle des PGC-1s dans l'inflammation a été extensivement étudié dans des maladies ayant une composante métabolique comme l'obésité, le diabète et même les maladies cardiovasculaires, aucune caractérisation des rôles immunitaire et inflammatoire des PGC-1s n'ont été effectués dans les cancers.

1.6.2 Modifications métaboliques impliquant les PGC-1s

Les nombreux rôles que possèdent les PGC-1s dans la régulation de processus métaboliques tels que la gluconéogenèse et le métabolisme oxydatif suggèrent que des maladies utilisant le métabolisme cellulaire à leur avantage pourraient impliquer les PGC-1s. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que le cancer, et plus particulièrement le mélanome, reprogramme le métabolisme énergétique cellulaire afin de soutenir leur croissance et de développer une résistance aux traitements anticancéreux ((115)). Tel que mentionné précédemment (voir section 1.4.1), le remodelage métabolique causé par les cellules cancéreuses amène un stress cellulaire important et influence le microenvironnement tumoral. Afin de survivre à la déplétion en nutriments et à l'hypoxie, ces cellules cancéreuses doivent être capables d'adapter rapidement leur métabolisme à l'environnement dans lequel elles se trouvent. En tant que maître régulateur de la transcription de gènes de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme oxydatif, les PGC-1s émergent comme collaborateurs de la prolifération et la survie du cancer. L'activation des PGC-1s via mTORC1 joue un rôle central dans le déclenchement de la sénescence, état où les cellules ne se divisent plus, mais gardent leur fonction métabolique. Le contrôle de la gluconéogenèse et de la lipogenèse exercé par PGC-1 α pourrait permettre aux cellules sénescents de retrouver un phénotype prolifératif (230) et contribuer à la tumorigenèse. Il a d'ailleurs été montré que PGC-1 α promeut la croissance tumorale dans le foie en régulant à la hausse des gènes associés à la synthèse des acides gras (231). Au niveau du mélanome, l'expression de PGC-1 α est directement liée à la modulation de programmes métaboliques responsables de la survie tumorale et du potentiel métastatique du mélanome. Par exemple, un niveau élevé de PGC-1 α dans certaines tumeurs de mélanome a été associé à une augmentation du métabolisme mitochondrial et à une résistance accrue au stress oxydatif (232, 233). D'autre part, une faible expression de PGC-1 α est liée à un phénotype glycolytique qui favoriserait la croissance tumorale tout en permettant une sensibilisation aux ROS. L'implication de PGC-1 α dans la progression des métastases est encore incertaine puisque sa surexpression bloque la formation de métastases dans plusieurs types de cancer incluant le mélanome (179, 234) mais la favorise dans le cancer du sein (232).

1.6.3 Rôle des PGC-1s dans le cycle cellulaire lent (*Slow cycling*) et la dédifférenciation cellulaire

En plus de leur implication dans les processus métaboliques profitant au mélanome, les PGC-1s participent aussi au phénomène de cycle cellulaire lent, un mécanisme utilisé par le mélanome pour développer leur résistance aux traitements anticancéreux. Le cycle cellulaire lent correspond à un état où les cellules apparaissent sénescents, mais possèdent un cycle de division cellulaire très lent et un métabolisme actif. Les sous-types de mélanome ayant un cycle de division lent peuvent représenter une fraction de la population cellulaire composant une tumeur. Suivant une thérapie anticancéreuse, cette sous-population de mélanome est généralement enrichie puisque leur phénotype, similaire à la sénescence, leur confère une résistance au stress cellulaire causé par le traitement. Le cycle cellulaire lent du mélanome est dicté par le niveau d'expression de MITF, où son expression anormale (forte ou faible) est associée à une augmentation de la phosphorylation oxydative et à une résistance au traitement (235). Les PGC-1s pourraient donc participer activement au développement du cycle cellulaire lent et de la résistance aux traitements puisque ceux-ci peuvent moduler l'expression de MITF (voir section 1.5.4).

Les PGC-1s pourraient aussi participer à la dédifférenciation cellulaire, un mécanisme par lequel les cellules du mélanome acquièrent des marqueurs cellulaires qui ne sont habituellement pas retrouvés dans les mélanocytes ordinaires. La dédifférenciation est importante dans le développement du mélanome puisqu'elle participe à la plasticité cellulaire (capacité des cellules à s'adapter) et au développement de la résistance aux immunothérapies (voir section 1.3.4) (236). La dédifférenciation du mélanome est caractérisée par quatre sous-types de différenciation où les cellules du mélanome passent d'un type cellulaire hautement différencié comparable au mélanocyte (ou type mélanocytaire) à un type transitoire, suivi d'une forme similaire aux cellules de la crête neurale pour finalement devenir des cellules non différenciées (112). Ces différents états de différenciation présentent un enrichissement des gènes ciblés par MITF pour les états différenciés (c-à-d mélanocytaire et transitoire) alors que les états non différenciés (c-à-d crête neurale et non différenciés) expriment faiblement MITF (112). Ce lien entre le niveau d'expression de MITF et la dédifférenciation du mélanome sous-entend que les PGC-1s

pourraient être impliqués dans le niveau de différenciation du mélanome et le développement de la résistance aux thérapies anticancéreuses.

1.7 Hypothèse et objectifs de recherche

Les travaux de notre laboratoire visent à comprendre l'impact du métabolisme sur la réponse immunitaire et les différentes maladies ayant une composante immunitaire importante. Ce projet consistait plus précisément à établir la fonction de PGC-1 β dans un contexte de mélanome. Plusieurs laboratoires de recherche ont déjà montré que l'homologue de PGC-1 β , PGC-1 α , avait des rôles contradictoires dans le développement des cancers et plus particulièrement dans le mélanome. Bien que ces deux membres de la même famille possèdent plusieurs fonctions redondantes, il a été montré que PGC-1 β est impliqué dans des programmes métaboliques distincts de PGC-1 α (voir section 1.5.3) (178). Alors que les rôles de PGC-1 α au niveau de l'inflammation, de la progression tumorale et de la métastase sont conflictuels et encore étudiés, les rôles de PGC-1 β dans ces phénomènes sont tout à fait inconnus.

Les rôles métaboliques des PGC-1s ont été largement étudiés dans les tissus ayant une activité métabolique et enrichissement mitochondrial important tels que le cœur, les muscles squelettiques, les tissus adipeux et le foie. Cependant, l'impact des PGC-1s sur le métabolisme de cellules ayant une activité métabolique plus faible, tel que les cellules de la peau, est totalement inconnu. Le domaine de liaison au HCF présent sur les PGC-1s suggère que PGC-1 β pourrait jouer un rôle dans la prolifération cellulaire alors que la coactivation des PPARs par PGC-1 β via son domaine d'activation sous-entend qu'il pourrait réguler la réponse immunitaire innée et l'inflammation.

En considérant les rôles connus des PGC-1s, nous émettons l'hypothèse que PGC-1 β contrôle la prolifération, l'inflammation et la réponse immunitaire au sein du mélanome. Notre principal objectif de recherche est de caractériser l'effet d'une déplétion de PGC-1 β sur l'inflammation et sur la prolifération des cellules de mélanome. Pour y parvenir, nous allons effectuer des analyses bioinformatiques à partir de données RNA-seq en réalisant des analyses statistiques sur l'expression de l'ARNm de différentes lignées de mélanome

et sur des groupes de tumeurs classés selon leur niveau d'expression des PGC-1s. Nous allons aussi caractériser l'impact de la déplétion en PGC-1 β sur le cycle cellulaire par comptage cellulaire et par cytométrie en flux. L'effet transcriptionnel d'une déplétion de PGC-1 β sur l'expression de gènes de l'inflammation, du métabolisme cellulaire, de l'immunosuppression et de l'immunité innée sera caractérisé par RT-qPCR dans différentes lignées de mélanome. Finalement, nous allons caractériser le mécanisme par lequel la déplétion en PGC-1 β module la réponse immunitaire en évaluant l'activation de différentes voies du stress et de l'immunité innée incluant la voie NF- κ B par des essais luciférase. Une banque de composés chimiques sera aussi utilisée pour évaluer les voies de signalisations régulées par PGC-1 β .

Chapitre II Article scientifique

2. Chapitre II Article scientifique

Cette section présente l'article en préparation dans lequel Karl Laurin figure comme premier auteur dû à la contribution majeure qu'il a apportée dans la génération des résultats obtenus et à sa participation à la rédaction de ce manuscrit. Katherine Coutu-Beaudry figure comme second auteur grâce à sa contribution pour obtenir les répétitions nécessaires à plusieurs des expériences présentées dans l'article.

Nos collaboratrices, Émilie Legault et Janelle Drouin, Ouellette ont apporté un support essentiel à la réalisation des expériences de microscopie à fluorescence en fournissant le matériel et l'expertise nécessaire à l'obtention de ces résultats. Une assistance de leur part a aussi été fournie pour mener à bien l'analyse des données obtenues.

Simon-Pierre Gravel a effectué des analyses bio-informatiques, dirigé l'étude, effectué plusieurs expériences et des analyses statistiques retrouvées dans le manuscrit et rédigé le présent manuscrit

Title:

The PGC-1 coactivators control pro-inflammatory and immunosuppressive gene expression programs in melanoma

Authors

Laurin K¹, Coutu-Beaudry K¹, Legault E¹, Drouin-Ouellet J¹, Gravel SP^{1,†}

Running title

PGC-1s control the immune response of melanoma cells

Affiliations

¹Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Québec, Canada

† **Corresponding author:** sp.gravel@umontreal.ca (S.P.G.)

Lead contact present address

Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal

Pavillon Jean-Coutu

2940, chemin de la Polytechnique

Bureau 3196

Montreal, QC, H3T 1J4, Canada

Research Highlights

- PGC-1 β expression inversely correlates with pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts in human melanoma tumors
- PGC-1 β depletion is growth suppressive and linked to cell cycle arrest through a mortalin-p21 pathway
- PGC-1 β depletion induces the expression of pro-inflammatory cytokines and cell surface immunosuppressive molecules in melanoma cell lines
- MEK inhibitors suppress the pro-inflammatory and immunosuppressive effects associated with PGC-1 β depletion
- Specific transcription factors of the STAT, IRF, and NF- κ B family control a switch between mitochondrial and immune gene expression program in melanoma

Abstract

Mitochondria are specialized metabolic and immune organelles that have important roles in tumor progression, metastasis, and response to chemotherapy and immunotherapy. Mitochondrial biogenesis and function are under de control of the peroxisome-proliferator activated receptor gamma family of transcriptional coactivators (PGC-1). Recent research unveiled the role of PGC-1 α in bolstering mitochondrial oxidative functions and in the suppression of metastasis in melanoma. The role of the other PGC-1s, PGC-1 β and PRC, remains elusive in melanoma, and the role of PGC-1s in the regulation of mitochondrial dysfunction and associated immune response has so far been largely overlooked in cancer. Herein, we show that low PGC-1s expression is associated with increased expression of a repertoire of immunosuppressive (CD73, PD-L2, Galectin-9) and pro-inflammatory (IL-8, TNF, IL-1 β) transcripts in human melanoma tumors, and that experimental depletion of PGC-1 β recapitulates this signature in human melanoma cell lines. The depletion of PGC-1 β impairs mitochondrial activity and leads to p21 induction and cell cycle arrest in melanoma cells through a mortalin-dependent and reactive oxygen species (ROS)-independent mechanism. Through the use of kinase inhibitors that target signaling pathways linked to immune processes, we show that MEK and IKK differentially regulate the expression of immunosuppressive and pro-inflammatory genes in PGC-1 β -depleted melanoma cells. We further show that a set of transcription factors of the STAT, IRF, and NF- κ B families act as switches that oppose mitochondrial genesis and immune response gene expression in melanoma. Overall, this research shows that PGC-1s have important immune functions in melanoma, and suggests that these functions could impact of tumor progression, immune evasion, and response to therapeutics.

Keywords

Melanoma, PGC-1, Mitochondrial dysfunction, Transcription, Immunosuppression, Inflammation, Proliferation, Signaling pathways

Introduction

Melanoma is the deadliest form of skin cancer, and melanoma cases have increased dramatically over the past 30 years. Advanced stage melanoma is a fatal disease that presents a significant therapeutic challenge due to the capacity of melanoma cells to develop resistance to treatments and to evade the immune system. Metabolic reprogramming is now recognized as a hallmark of cancer that can contribute to various processes such as tumor growth, metastasis, and therapeutic resistance(132, 237, 238).

Immune checkpoint inhibitors have revolutionized the treatment of advanced melanoma. Immunotherapies based on monoclonal antibodies directed against the immune checkpoints such as programmed death 1 (PD-1; nivolumab) or the cytotoxic T-lymphocyte-associated 4 (CTLA-4; ipilimumab) have significantly improved the survival of metastatic melanoma patients(239, 240). The principle of immunotherapy is to release the inhibitory interactions between T lymphocytes and antigen-presenting cells or cancer cells, ensuring the elimination of the latter(241). Immune checkpoint therapy remains unfortunately ineffective in a large portion of patients due to primary or acquired resistance, with objective response rates ranging between 19 and 58%(242). Also, precise predictive biomarkers allowing the discrimination between immune checkpoint therapy responders and non-responders are missing(243, 244). A better understanding of the mechanisms by which melanoma cells can modulate T cell functions should bolster the design of new therapeutic approaches to increase clinical efficacy of immune checkpoint therapy. T cell dysfunction and upregulation of compensatory immune checkpoint proteins can lead to immune checkpoint therapy resistance in melanoma(245). Evading melanoma cells can release immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF β) or express cell surface proteins such as PD-L1/2 that bind to inhibitory checkpoint proteins (PD-1) on T cells to suppress their proliferation and activity(246, 247). It is now recognized that the way melanoma cells metabolize nutrients can also have a major impact on T cell activity. Melanoma cells can compete for glucose or amino acids that are essential to bolster T cell functions(246-248), and tumor glycolytic activity was shown to suppress T cell activities(249, 250). Melanoma cells can also increase the expression of cell surface

enzymes such as indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and CD73 that catalyze the generation of immunosuppressive metabolites (kynurenine and adenosine, respectively)(169, 251). The capacity of melanoma cells to mount an efficient immunosuppressive response is thus dependent on metabolic reprogramming and specific gene expression programs. How these processes are coordinated and support resistance to immunotherapy in melanoma remains elusive.

Metabolic reprogramming has been shown to support tumor growth and survival, metastasis, and chemoresistance in melanoma(115, 125, 252, 253). A well-documented example of metabolic reprogramming is the ability of melanoma cells to alternate between glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) to support their bioenergetic needs. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators (PGC-1s) are master transcriptional regulators of mitochondrial biogenesis, oxidative phosphorylation, and oxidative stress detoxification(184, 254). PGC-1 α , PGC-1 β , and PRC exert their functions through coactivation of transcription factors such as the estrogen-related receptor (ERR) α and nuclear respiratory factors (NRFs) that support the transcription of mitochondrial processes such as OXPHOS, citric acid cycle, lipid oxidation, and mtDNA replication. PGC-1 α has been by far the most studied PGC-1 in cancer because of its highly variable expression levels which correlate positively with mitochondrial functions, and therefore its potential role as a marker of cancer subtypes and indicator of disease progression. While PGC-1 α expression levels in melanoma cells have an impact on several aspects of tumor progression and response to chemotherapy (reviewed in (255)), its role and those of the less characterized family members, PGC-1 β and PRC, in mitochondrial dysfunction, tumor immunology and response to immunotherapy is currently unknown.

Herein, we have found that the expression levels of the 3 PGC-1s in human melanoma tumors correlate negatively with a signature of immunosuppressive cell surface molecules and cytokines, as well as pro-inflammatory mediators. This signature is increased in low PGC-1s-expressing tumors, while mitochondrial genes are reduced, which suggests that the immunosuppressive program results from impaired mitochondrial biogenesis and

functions. Furthermore, we have found that PGC-1 β silencing in a panel of melanoma cells recapitulates the immune signature, and have cumulated evidence on the mechanisms that could mediate these hitherto uncharacterized roles of PGC-1s.

Results

The PGC-1 coactivator transcripts expression positively correlates with distinct and overlapping sets of mitochondrial protein transcripts in human melanoma tumors.

While increased PGC-1 α expression has been linked to a global increase in mitochondrial functions in melanoma(233), it is currently unknown if the other PGC-1s, PGC-1 β and PRC share similar functions. To examine the correlation between the expression of individual PGC-1s-associated transcripts with mitochondrial protein transcripts, we interrogated the Skin Cutaneous Melanoma (SKCM) RNA-seq dataset from The Cancer Genome Atlas (TCGA, PanCancer Atlas)(256) that is freely available on cBioPortal(257, 258). This dataset contains a total of 448 samples from human tumors, mainly from metastatic origin (81.9%), and are derived from both male and female patients (61.9% and 38.1%, respectively). We found that the expression level of PGC-1 α transcript (*PPARGC1A*) is highly variable in this dataset, as expected for this inducible and labile coactivator (**Fig.7A**). Surprisingly, both PGC-1 β transcripts (*PPARGC1B*) and PRC transcripts (*PPRC1*) show an important variability in expression, with PGC-1 β being more variable (Coefficient of correlation (CV)_{*PPARGC1A*}: 148.5, CV_{*PPARGC1B*}: 100.2, CV_{*PPRC1*}: 39.9). We also examined the expression level of PGC-1s transcripts in 48 melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE, Broad, 2019)(259), where the transcripts show strikingly similar expression profiles compared tumors from the SKCM dataset (**Fig.7B**), (CV_{*PPARGC1A*}: 143.9, CV_{*PPARGC1B*}: 52.6, CV_{*PPRC1*}: 31.0). This suggests that PGC-1s expression in melanoma cells and tumors may correlate with mitochondrial proteins, in line with their canonical functions in mitochondrial biogenesis. To determine the correlation between individual PGC-1s transcripts and mitochondrial protein transcripts, we determined the significant Spearman correlations ($q < 0.05$) between PGC-1s transcripts and 1158 proteins that are localized in human mitochondria (human MitoCarta2.0)(260), and determined overlapping and distinct gene sets between PGC-1s

(Fig.7C). The relatively few mitochondrial protein transcripts were shared between the 3 PGC-1s (36/587, 6.1%) contained citric acid cycle (CAC) enzymes (*ACO2*, *CS*, *MDH2*), proteins that support mitochondrial respiration (*CYCI*, *SFXN4*) or participates to mitochondrial translation (*AARS2*, *GUF1*, *MARS2*, *MRPL2*, *PTCD1*, *VAR2*), transporters (*SLC25A3/5/13/25*), metabolic enzymes (*CKMT1B*, *GPI*, *LDHB*, *HADHA*, *PAICS*), chaperones (*HSPD1*, *TRAP1*), signaling components (*AKAP1*, *VAR2*, *WDR81*), translocase components (*TIMM50*, *TIMM8A*), and detoxification enzymes (*BPHL*, *RDH13*, *TXNRD2*). In addition, 181/587 (30.8%) transcripts were exclusively shared between 2 PGC-1s, and 370/587 (63.0%) transcripts were unique to individual PGC-1s. To further characterize the transcripts that differentially correlate with PGC-1s, we generated a dataset comprising the shared genes from the SKCM dataset that significantly correlate, positively or negatively, with the 3 PGC-1s, and performed gene functional classification with the DAVID Bioinformatics software(261) (Fig.7D). These analyses reveal that PGC-1s positively correlate numerous processes linked to mitochondrial translation, mitochondrial respiration, and transcription (Fig.7D, upper panel). Strikingly, these analyses also revealed that PGC-1s negatively correlate with several processes linked to immune response, including TNF signaling, pathogen recognition, chemokines, and matrix metalloproteinases (Fig.7D, lower panel). Overall, these analyses reveal a hitherto uncharacterized dichotomous correlation between PGC-1s, mitochondrial, and immune transcripts level in melanoma tumors.

Low PGC-1-expressing melanoma tumors exhibit a pro-inflammatory and immunosuppressive signature.

Our previous analyses suggest that low PGC-1s-expressing tumors could have a pro-inflammatory phenotype, which could have important roles in tumor progression. As the immunosuppressive functions of melanoma cells can also regulate tumor progression and response to therapeutics, we examined the correlation between PGC-1s transcript levels and a set of 10 immunosuppressive molecules, including cytokines (*IL10* (IL-10), *TGFBI* (TGF- β 1)), metabolic enzymes (*NT5E* (CD73), *IDO1* (IDO), *CYBB* (NOX2)), immune regulatory receptors (*VSIR* (VISTA)) and ligands (*CD274* (PD-L1), *PDCD1LG2* (PD-L2), *LGALS9* (Galectin-9)), and costimulatory molecules (*CD276* (B7-H3)). Our data show that

all the PGC-1s show inverse correlation patterns with the selected immunosuppressive proteins and a set of 7 mitochondrial proteins (**Fig.7E**). The 3 PGC-1s negatively correlate with most of the immunosuppressive transcripts, and correlations between global PGC-1 expression (i.e. sum of ranked expression of the 3 PGC-1s) are even stronger. We next examined the relative expression level of PGC-1s, immune, and mitochondrial genes in 6 human melanoma cell lines from the CCLE data that were selected for very distinct PGC-1s expression patterns. These analyses show that high PGC-1s-expressing cells have low expression of an 8-transcript immune signature, while low PGC-1s-expressing cells have high expression of the same signature (**Fig.7F**). We next generated expression datasets consisting of low and high PGC-1s expressing tumors (lowest and highest quartiles of summed ranks, respectively). Using this dataset, we found that low PGC-1s expression in melanoma tumors is associated with increased expression of several pro-inflammatory and immunosuppressive genes (**Fig.7G**), which nicely complements the correlation analyses. Overall, these analyses suggest that low PGC-1s expression is linked to reduced expression of key mitochondrial proteins and increased expression of a complex repertoire of immune genes. We propose that a reduction in PGC-1s expression will lead to mitochondrial dysfunction or altered metabolic and bioenergetic states that will trigger the activation of signaling pathways that drive pro-inflammatory and immunosuppressive gene expression programs in melanoma cells (**Fig.7H**).

PGC-1 β knockdown blocks the proliferation of human melanoma cell lines.

To determine the roles of PGC-1s in the control of mitochondrial and immune gene expression in melanoma, we opted for RNA interference (RNAi) against PGC-1 β , as this coactivator shows intermediate variability in transcript expression (**Fig.7A,B**), strong correlations with mitochondrial and immune genes (**Fig. 7E**), and is the only PGC-1 family member that correlates positively and significantly with the 2 other PGC-1s (with *PPARGC1A*, Spearman correlation 0.160, q-Value = 6.682e-3; with *PPRC1*, Spearman correlation 0.133, q-Value = 0.0182). RNAi was chosen over CRISPR/Cas9 because of the known essentiality of this gene (DepMap), and that no tumor show absence of the *PPARGC1B* transcript. We performed siRNA-mediated RNAi for PGC-1 β in 2 metastatic (lymph nodes) human cell lines, SK-MEL-5 and MeWo, and 2 human cell lines A375, and

SK-MEL-28. While knockdown (KD) efficiency was variable among cell lines (**Fig.8A**), this approach led to a reduction in the expression of the PGC-1 β protein (**Fig.8B**), and reduced the proliferation of all the tested cell lines, compared to cells transfected with non-targeting control siRNA (**Fig.8C**). We further our assays with the MeWo cell lines, as this cell line showed the strongest dichotomy between immune and mitochondrial genes (**Fig.8F**). The impact of PGC-1 β KD on the cell proliferation of MeWo cells was marked 3 days post-transfection and was sustained for up to 8 days (**Fig.8D**). To determine if PGC-1 β KD affected cell cycle composition of MeWo melanoma cells, we studied propidium iodide staining by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Our analyses show that PGC-1 β KD reduces cells in the G0/G1 states and lead to an accumulation of cells in G2/M compared to control cells, and that there is a non-significant increase in subG1 cells remnants under these conditions, which suggests that a small fraction of cells are ongoing apoptosis (**Fig.8E,F**). This suggests that PGC-1 β KD may block MeWo cells at the G2/M checkpoint, which could be caused by DNA damage. We show that PGC-1 β KD induces the p21 cell cycle inhibitor in MeWo cells, and that p21 is also induced in this cell line following treatment with bleomycin and doxorubicin (**Fig. 8G**). Overall, these results show that the reduction in PGC-1 β expression in melanoma cells leads to p21 induction, cell cycle arrest, and thus limits the proliferative capacities of melanoma cells *in vitro*.

PGC-1 β knockdown alters mitochondrial functions in melanoma cells.

The observed reduction in cell proliferation in melanoma cells with PGC-1 β depletion could be linked to alteration in mitochondrial functions. Since mitochondrial reactive oxygen species (ROS) can induce DNA damage, we measured mitochondrial (mt)ROS in MeWo cells with the MitoSOX red dye. Our data do not support this hypothesis, as we show that PGC-1 β KD does not lead to an increase in mtROS compared to control cells (**Fig.8H**). In addition, PGC-1 β KD led to a non-significant reduction in mitochondrial cytochrome c, which again supports a small fraction of cells that undergo apoptosis (**Fig.8H**). Since apoptosis is not known to drive a pro-inflammatory phenotype, this suggests that the impact of PGC-1 β KD on inflammation and apoptosis may be stoichiometric, with cells having the strongest PGC-1 β reduction being apoptotic, while the

cells showing moderate reduction being pro-inflammatory. To determine which mitochondrial protein(s) could be downregulated upon PGC-1 β KD in melanoma cells, we interrogated the SKCM RNA-seq dataset (same as in Fig. 5A,C,D,E,G) to identify the 10 mitochondrial protein transcripts that positively correlates the most with PGC-1 β transcripts. We then analyze the expression of these proteins in MeWo cells treated with siRNA against PGC-1 β . We found that about the half of transcripts were downregulated upon PGC-1 β KD, with 2 mitochondrial protein transcripts that were significantly downregulated compared to controls (**Fig. 8I**). The remaining transcripts were unaffected, induced, or too weakly expressed for proper analyses in this cell line (*OBSBPL1*, not shown). The 2 significantly affected transcripts were *HSPA9*, a chaperone involved in iron-sulfur cluster biosynthesis and proliferation, and *AFG3L2* (AFG3 like matrix AAA peptidase subunit 2), a protease with important roles in the maturation of mitochondrial proteins and protection against mitochondrial dysfunction. Overall, this suggests that PGC-1 β knockdown has complex impact on mitochondrial functions and cellular bioenergetics in MeWo cells.

PGC-1 β knockdown induces the expression of immune transcripts in human melanoma cell lines.

To determine if PGC-1 β KD can recapitulate the immune signature associated with low PGC-1s expression in human melanoma tumors (**Fig. 7E,G**), we examined the expression of 7 immunosuppressive (*LGALS9*, *NT5E*, *PDCD1LG2*) and pro-inflammatory (*IL6*, *CXCL8*, *TNF*, *IL1B*) transcripts in SK-MEL-5, MeWo, A375, and SK-MEL-28 melanoma cell lines. PGC-1 β KD efficiently lead to a reduction in PGC-1 β and lead to a differential induction of immune transcripts among these cell lines (**Fig. 9A**). PGC-1 β KD MeWo cells showed significant increase in the expression of 7/7 immune transcripts compared to control cells, while SK-MEK-28, A375, and SK-MEK-5 showed significant increase in 6/7, 4/7, and 2/7 transcripts, respectively. MeWo cells, which were previously characterized as high PGC-1 α -expressing cells(233), were globally the most response cells, suggesting that cells with high mitochondrial activity might be more sensitive to PGC-1 β depletion. We show that PGC-1 β KD dose-dependently increases the expression

of *CXCL8* and *LGALS9* transcripts in MeWo cells (**Fig.9B**), which supports the stoichiometric role of PGC-1 β stated in the previous section. We validated the specificity of the approach with 2 distinct RNAi approaches, dicer-substrate siRNA (DsiRNA) (**Fig.9C**) and doxycycline inducible short-hairpin RNA (shRNA) (**Fig.9D**), which both used different targeting sequences than the ones used with siRNA. We further show that PGC-1 β KD in MeWo cells used to generate spheroids lead to the induction of *LGALS9*, *CXCL8*, and *IL1B* (**Fig.9E**), which suggests that the pro-immune transcriptome associated with PGC-1 β depletion may be preserved *in vivo*. To determine if changes in gene expression upon PGC-1 β KD could be associated with changes in protein expression, we performed cytokine analyses of conditioned media from siRNA-PGC-1beta and control siRNA MeWo cells. These analyses show that PGC-1 β KD leads to a strong release in pro-inflammatory and immunosuppressive cytokines such as IL-8 (*CXCL8*) and IL-10 (*IL10*) (**Fig.9F**). We also show that PGC-1 β KD leads to a strong induction in Galectin-9 (*LGALS9*) protein expression in MeWo cells (**Fig.9G**). It is noteworthy that this immune receptor ligand is virtually absent of MeWo cells under basal conditions, either at the mRNA (Ct > 35) or at the protein level. Thus, PGC-1 β KD appears to turn on this immunosuppressive molecule. Overall, these analyses reveal that PGC-1 β KD can efficiently induce a complex immune response expression program that is likely functional since translated into cytokines and cell surface molecules.

A small-scale targeted compound screening reveals modulators of the PGC-1 β immune program.

To investigate the signaling pathways that mediate the pro-inflammatory and immunosuppressive effects associated with PGC-1 β depletion in melanoma cells, we selected 15 compounds to inhibit major kinases or signaling components that drive these effects: the I κ B kinase (IKK β), the IKK-related kinase Tank-binding kinase 1 (TBK1), the mitogen-activated protein (MAP) kinase kinases 1/2 (MEK1/2), the MAP kinases JNK1/2/3 and p38 α , the mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR), the Janus kinases (JAKs), the proto-oncogenes B-Raf and c-Src, the phosphoinositide 3-kinase (Pi3K), protein kinase B (AKT), and the NLRP3 inflammasome. 48h after transfection

with PGC-1 β or control siRNAs, MeWo cells were treated with DMSO or the indicated inhibitors for 24h. Our analyses show that MEK1/2 inhibition with trametinib and AZD6244 repress the induction of both *CXCL8* and *LGALS9* transcripts (**Fig.10A,B**). Other compounds targeting JNK1/2/3 (JNK inhibitor XVI), IKK β (BI605906), and p38 α (VX745) reduced *CXCL8* expression, but had no effect on *LGALS9*. Interestingly, pharmacological inhibition of mTOR with rapamycin and PP242, as well as TBK1 (MRT67307), Pi3K (GDC-0941), AKT (MK2206), and BRAF (PLX4032/vemurafenib) enhanced the induction of *CXCL8* by PGC-1 β KD (**Fig.10A**). We confirmed the gene-specific effects of MEK1/2 and IKK β inhibition on other genes such as *NT5E* and *IL1B* (**Fig.10C**). Overall, these analyses suggest MEK inhibition will block the induction of both immunosuppressive and pro-inflammatory genes in PGC-1 β -depleted MeWo cells, while IKK β inhibition appears to be limited to pro-inflammatory genes.

Identification of transcription factors that control the switch between mitochondrial biogenesis and immune response programs in melanoma cells.

To determine the transcription factors that mediate the induction of immune transcripts in melanoma cells in which PGC-1 β has been depleted, we characterized the over-representation of transcription factor binding sites (TFBS) at the proximal promoter (-950 to +50) of 5 immunosuppressive and 4 pro-inflammatory genes that compose the immune signature of melanoma cells and tumors (**Fig.7E-G and Fig. 8A**). These analyses show that TFBS for the STAT1::STAT2 heterodimer is significantly over-represented in both sets of genes, while each set is associated with distinct over-represented TFBS (**Fig.10D**). The immunosuppressive genes are linked to the enrichment of interferon regulatory factors (IRFs) and STAT4, while the pro-inflammatory genes are linked to the enrichment of NF- κ B subunits (p65/*RELA* and C-Rel/*REL*) and CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs). We next interrogated the SKCM RNA-seq dataset (same as in Fig.5A,C,D,E,G) to identify the correlation between all the transcription factors of the STATs, NF- κ Bs, IRFs, and AP-1(FOS, JUN) families and a set composed of 14 immunosuppressive and pro-inflammatory genes and 14 genes that encode mitochondrial proteins that significantly correlate with the 3 PGC-1s (**Fig.7C**). Strikingly, hierarchical clustering of Spearman correlation coefficients revealed subsets of transcription factors have clear opposite

correlation coefficient between the 2 sets of genes (**Fig.10E**), which suggests that they could mediate or antagonize the immune and metabolic effects associated with PGC-1 β depletion. To further determine the transcription factors that function as a switch between these gene expression programs, we calculated the Mito-Immune Switch (MMS-Score) for each gene, defined as the difference of the sum of Spearman's correlations between the 2 sets of genes (**Fig.10F**). Both analyses reveal that the expression of STAT1, STAT4, IRF-1, IRF-2, and IRF-8 is associated with the overall strongest expression of immune transcripts, while being associated with the lowest expression of mitochondrial proteins, as well as PGC-1s. Interesting, the expression of IRF-4, STAT6, and RELA is linked to the opposite pattern, suggesting that these factors could reverse the switch towards mitochondrial functions. As the studied immunosuppressive and pro-inflammatory genes show enrichment for IRFs and NF- κ B TFBS, respectively, we determined the impact of PGC-1 β depletion in gene reporter assays. We found that PGC-1 β KD induced the expression of luciferase under the control of NF- κ B response elements and using the physiological *CXCL8* promoter (-274 to +1) in HEK293T cells (**Fig.10G**). PGC-1 β KD had no impact on the interferon-sensitive response elements (ISRE), which suggests it does not trigger IRF-3, IRF-7, or type I interferon-induced ISGF3 in HEK293T cells. We could not detect IRF-3 phosphorylation, dimerization, and induction of IFN β in MeWo cells with PGC-1 β KD (data not shown). Interestingly, the expression level of *IRF1* and *IRF4* were induced upon PGC-1 β KD (**Fig.10H**), but were unable to detect transcripts for IRF-5-8 in MeWo cells. We further show that PGC-1 β KD induces nuclear translocation of the NF- κ B subunit p65, STAT1, and phosphorylated STAT1 in MeWo cells (**Fig.10I**). To identify which transcription factors are important in induction of immune genes upon PGC-1 β KD, we cotransfected MeWo cells with DsiRNAs against a small set of IRFs, STATs, AP-1s, and NF- κ B family members. These analyses show that all the tested transcription factors bolster the induction of immune gene, but at variable extent (**Fig.10J**). Knockdown of p65/RELA was the most efficient at suppressing *CXCL8*, even under control conditions. PGC-1 β KD efficiency was globally unaffected by co-transfection, except for a trend towards a reduction in KD efficiency with p65/RELA and FOS KD. Overall, these analyses suggest that PGC-1 β depletion in melanoma cells lead to the activation of MEK and IKK

that differentially control the expression of pro-inflammatory and immunosuppressive genes through NF- κ B and diverse sets of transcription factors that likely act in cooperation and likely in a context-dependent manner.

Discussion

Recent studies revealed that the engagement of innate immune signalling pathways can drive the expression of diverse immunosuppressive cell surface proteins in melanoma. Cytokines, hypoxic microenvironments, and UV exposure can induce the expression of PD-L1 and other immunosuppressive ligands through the activation of NF- κ B, STAT1, IRF-3, and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α (219, 222, 223, 262-265). Furthermore, type I/II interferons (IFNs) were shown to induce a multigenic resistance program through STAT1 activation in melanoma, which is characterized by the induction of inhibitory receptor ligands (PD-L1, Galectin-9, HVEM, CD86)(219). While cancer cell-intrinsic mechanisms such as activation of oncogenes and loss of tumor suppressors can also activate these transcription factors and likely modulate immunosuppressive programs(266), the role of metabolic reprogramming in bolstering these processes remains unknown.

Recent evidence suggests that mitochondria, which are organelles endowed with the unique ability to decide cell fate by controlling both the metabolism and the immune response, are important modulators of the response to immunotherapy. First, immunotherapy responders have increased mitochondrial activity in tumors, which increases melanoma immunogenicity and increases sensitivity to T cell-mediated killing(267). Second, mitochondria dysfunction can induce mtDNA release in the cytosol, which is sensed by the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferons (STING) system that promotes IRF-3 and NF- κ B activation(217, 268). Importantly, STING agonists have recently emerged as modulators of the response to immunotherapy through their capacity to engage IFN signalling and to promote the expression of PD-L1(269). Very recently, it has been shown that mtDNA damage (dsDNA breaks) exposes mtRNAs to the cytosolic sensors Rig-I/MAVS, which leads to STAT-1 phosphorylation and IFN response(270). A variety of mechanisms could also link mitochondrial dysfunction to the activation of innate

immune signalling pathways, such as the production of reactive oxygen species (ROS)(271, 272), the alteration of cellular bioenergetics (nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)⁺/NADH ratio)(273-275), and the production of immunomodulatory metabolites(276-278). Overall, this suggests that mitochondrial dysfunction could modulate the transcription of immunosuppressive programs to bolster immune evasion in melanoma.

We here show that the expression level of PGC-1s is important to support mitochondrial functions, and that melanoma cells with low expression of these coactivators will mount an immune response with both immunosuppressive and pro-inflammatory components. While PGC-1 α has been shown to be important to bolster mitochondrial functions and inhibit metastasis in melanoma(233, 234), the role of the other PGC-1 coactivators in melanoma progression remains unknown. A recent study suggested that all the 3 PGC-1s, as well as other factors involved in mitochondrial biogenesis could be targeted to overcome the resistance to MAPK inhibitors(279), which suggests that these factors could also modulate the resistance to other therapies such as immune checkpoint inhibitors. Several studies in non-cancer models have shown that enforced expression of PGC-1 α or PGC-1 β can potently inhibit NF- κ B and IRF-1/3, while PGC-1 α / β depletion conversely promotes the activation of these transcription factors(229, 280-285). This role of PGC-1 in the control of an immune response in cancer has been hitherto largely overseen, and represents a caveat for the studies aimed at specific targeting of metabolic pathways or mitochondrial functions. Indeed, the physiological impact of metabolic gene deletion or depletion could be indirect and due in part to the modulation of immune signaling pathways. Herein, we have found that the expression levels of the 3 PGC-1s in human melanoma tumors correlate negatively with a signature of immunosuppressive cell surface molecules and cytokines. This signature is increased in low PGC-1s-expressing tumors, while mitochondrial genes are reduced, which suggests that the immunosuppressive program results from impaired mitochondrial biogenesis and functions.

Our analyses do not support the engagement of cGAS/STING or Rig-I/MAVS pathways in MeWo cells treated with siRNA against PGC-1 β , as we were unable to detect IRF-3

phosphorylation, dimerization, nuclear translocation, or IFN- β induction (data not shown). Also, the mechanism does not seem to involve ROS induction (**Fig.8H**). In line with the role of PGC-1s in bolstering mitochondrial biogenesis and function, we found that acute PGC-1 β KD significantly reduces the expression of *HSPA9*, and *AFG3L2* (**Fig.8I**). It has been shown that the depletion of *HSPA9*, which encodes for the mitochondrial heat-chock protein mortalin (GRP75), induces p21^{CIP}, growth arrest and cell death in a MEK/ERK-dependent fashion in melanoma cell lines(286). As PGC-1 β KD also induces p21 in MeWo cells (**Fig.8G**) and cell cycle arrest (**Fig.8E,F**) in MeWo cells, it is likely that the growth suppressive effects of PGC-1 β are driven by mortalin depletion. *AFG3L2* encodes for an essential component of the mitochondrial *m*-AAA protease that is important for the quality control of matrix proteins, respiratory complexes, and mitochondrial translation. It is perhaps not surprising that *AFG3L2* depletion leads to a reduction in ATP synthesis, in the assembly of OXPHOS complexes, and to mitochondrial fragmentation(287). It is thus likely that PGC-1 β KD will lead to mitochondrial dysfunction and alteration in cellular bioenergetics that will trigger innate immune signaling pathways. From the 10 top transcripts encoding for mitochondrial proteins that correlate with PGC-1 β transcript in human melanoma tumors, only 2, *HSPA9* and *AFG3L2* showed significant reduction with PGC-1 β KD. This can be interpreted in two different ways. First, positive correlations in RNA-seq datasets do not mean that there is a cause and effect relationship between the correlated genes. Second, the 3 PGC-1s appears to share overlapping functions in mitochondrial biogenesis. This suggests that the loss of one PGC-1 may lead to a compensation by the others. PGC-1 β KD did not significantly induced PGC-1 α in the four tested melanoma cell lines (**Fig.8A**), and neither PRC (data not shown), which does not support compensation by means of transcript induction. On the other hand, the activity of PGC-1 α can be modulated by a variety of post-transcriptional modification that have not been assessed in our models. This overall suggests that the impact of PGC-1 β KD on mitochondrial functions and immune response is likely highly dependent on cellular context and relative activities of several signaling pathways.

Our analyses revealed that PGC-1 β -depleted in melanoma cells or low PGC-1-increasing tumors have increased expression of both pro-inflammatory and immunosuppressive component, which is, to our knowledge, the first report on this dichotomy. The induction of inflammation through cytokine, chemokine and MMP release (**Fig.7D, 7F**) may have an important role in tumor progression by recruiting and activating immune cells, and by remodelling the tumor microenvironment to bolster angiogenesis and invasion. These mechanisms could thus contribute to the anti-metastatic role of PGC-1 α in melanoma(234), and should be taken into consideration in future studies. The induction of a repertoire of immunosuppressive molecules, on the other hand, will likely help tumor cells to evade T cell-mediated cell death. It will be important to assess the impact of PGC-1s modulation *in vivo* in immunocompetent models to determine the role of inflammation and immunosuppression in tumor progression and response to therapeutics such as immune checkpoint inhibitors.

We have found that MEK is upstream of the regulation of both pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts, but that the role of IKK β seems more limited to pro-inflammatory gene expression (**Fig.10A,B**). As BRAF and MEK inhibitors have shown beneficial effects in combination with immunotherapy in melanoma(288, 289), it will be of interest to determine how these treatments impact on the expression of pro-inflammatory and immunosuppressive markers *in vivo*. While our data suggests that PGC-1 β depletion lead to the activation of several immune signaling pathways and transcription factors (**Fig.10G-J**), a striking correlation exists between immune transcription factors, mitochondrial protein genes, and immune response genes in human melanoma tumors (**Fig. 10E**). This allowed us to identify subsets of transcription factors involved in a switch between mitochondrial functions and immune response (**Fig.10F**). It is unlikely that PGC-1 β KD leads to changes in the expression levels of most of these transcription factors, except for IRF-1 and 4 (**Fig.10H**), but instead participate into their activation or inhibition. Nevertheless, these data provide supportive data for the characterization of new mechanisms that control the mitochondrial-immune switch in melanoma. The immune role associated with PGC-1 β depletion also appears to be potentiated in the context of inhibition of the Pi3K-AKT-mTOR-TBK1 pathway (**Fig.10A**). TBK1 inhibition is well known to

induce the activation of the IKK complex(290), which further confirm the specific effect of the IKK pathway on pro-inflammatory genes and not immunosuppressive genes such as *NT5E* and *LGALS9* (**Fig.10B**). Pi3K-AKT-mTOR inhibition, on the other hand, can exert both pro-inflammatory and anti-inflammatory effects depending on the cell type under study(291, 292). Since the mTOR pathway can promote mitochondrial function and PGC-1 α induction in cancer cells(293, 294), it is likely that its inhibition can exert pro-inflammatory effects in a context-dependent fashion.

This research unveils new roles for the PGC-1 coactivators in the control of inflammation and immunosuppression in melanoma. Mitochondrial dysfunction has been linked to aging, pro-inflammatory conditions, and cancer where PGC-1s likely take center stage by controlling key aspects of mitochondrial biogenesis. Future work will indicate if treatments that target their expression or function can impact on tumor progression and response to immunotherapy.

Acknowledgements

This research was financed by Start-up funds from the Faculty of pharmacy of Université de Montréal and kind donations to the Faculty of pharmacy to support the work of young investigators during the COVID-19 pandemic (to S.P.G.).

Author Contributions

K.L., K.C.B, and S.P.G performed and analyzed experiments

E.L. and J.D.O. designed, performed and analyzed mitochondrial imaging experiments

K.L. and S.P.G. wrote the manuscript

S.P.G. designed, managed, and lead the study

Figure legends

Figure 7. Low PGC-1s expression is associated with an increase in immune response transcripts in human melanoma tumors and cell lines.

Data analyses from publicly-available RNA-seq datasets hosted on cBioPortal. **A.** PGC-1s transcript expression in the 443 tumors samples from the human cutaneous melanoma dataset (TCGA PanCancer Atlas). Expression is shown as Log2 values of RSEM, batch normalized from Illumina HiSeq_RNASeqV2 (considered as arbitrary units, a.u.). Each dot represents a sample. Mean and +/- SEM are indicated. **B.** PGC-1s transcript expression in 48 melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia (Broad, 2019), expressed as Log2 values of RNA Seq RPKM (Reads Per Kilobase of transcript, per Million mapped reads). **C.** Venn diagram of positive correlations between PGC-1s transcripts from the cutaneous melanoma dataset in A (q-value threshold 0.05) and the 1158 mitochondrial proteins from the MitoCarta2.0 study. **D.** Shared positive (upper panel) and negative (lower panel) significant Spearman's correlations ($q < 0.05$) between the 4 PGC-1s. Enrichment scores from DAVID bioinformatics are associated with functional classes. Blue and red arrows indicate metabolic/translation and immune response transcripts, respectively. **E.** Heatmap of Spearman's correlations between PGC-1s and selected transcripts in human melanoma tumors described in A. For global PGC-1s, tumors were ranked for individual PGC-1s expression and further sorted according to the sum of individual ranks. **F.** Heatmap of relative transcript expression among selected cell lines described in B. **G.** Relative expression of selected transcripts in low and high PGC-1s expressing human melanoma tumors, described in A and E. *, **, **: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively, unpaired, two-tailed Student's *t*-test. Each dot represents a sample. Mean and +/- SEM are indicated. **H.** Working hypothesis. Low PGC-1s in melanoma tumors lead to mitochondrial dysfunction and subsequent activation of immune signaling pathways that control the transcription of T cell immunosuppression and pro-inflammatory gene, which can modulate various aspects of tumor progression and response to therapeutics. *PPARGC1A*, *PPARGC1B*, and *PPRC1* are gene symbols that stand for PGC-1 α , PGC-1 β , and PRC, respectively.

Figure 8. PGC-1 β knockdown has growth suppressive effects in human melanoma cell lines.

A. Transcripts encoding for PGC-1 β (*PPARGC1B*) are reduced by siRNA-mediated RNA interference against PGC-1 β in four human melanoma cell lines (SK-MEK-5, MeWo, A375, SK-MEL-28). Transcripts encoding for PGC-1 α (*PPARGC1A*) are not significantly affected. Cells were analyzed 72 h post-transfection. Data is shown as mean + SEM. Group comparison is done between control non-targeting siRNA and pooled PGC-1 β siRNAs. * $p < 0.05$, paired two-tailed Student's *t*-test (N=3 independent experiments). **B.** Immunoblotting for PGC-1 β in MeWo cells transfected with individual and pooled siRNA against PGC-1 β . Cells were analyzed 72 h post-transfection. β -actin serves as loading control. **C.** Fold change in cell counts in melanoma cells treated as in A. Data is shown as mean + SEM. * $p < 0.05$, # $p < 0.10$, paired two-tailed Student's *t*-test (N=3 independent experiments). **D.** Proliferation of MeWo cells treated as in A over a 8-day time course. Transfection was done on day 0. Data is shown as mean + SEM. Group comparison is done between control non-targeting siRNA and pooled PGC-1 β siRNAs for individual days. * $p < 0.05$, paired two-tailed Student's *t*-test (N=3 independent experiments). **E.** Representative cell cycle tracing from FACs analyses of MeWo cells treated as in A. Colored areas and gating are automatically generated by the FlowJoe software. PE-A: Propidium iodide area. **F.** Cell cycle organization of MeWo cells from 3 independent experiments and analyzed as in E. Data is shown as mean + SEM for individual cell cycle phases (G0/G1, S, and G2M). SubG1 represent fragmented cells. * $p < 0.05$, # $p < 0.10$, paired two-tailed Student's *t*-test (N=3 independent experiments). **G.** immunoblotting for p21 in MeWo cells treated with control non-targeting or PGC-1 β siRNA for 3 days or treated with cytotoxic drugs. β -actin serves as loading control. Doxo: doxorubicin (100 nM); Bleo: bleomycin (1 μ M). Data is representative of 3 independent experiments. **H.** Quantification of mitochondrial reactive oxygen species (MitoSox Red dye) and Cytochrome c in MeWo cells treated as in A. Acquisition of fluorescence signals done by fluorescence microscopy. Individual cells were delimited by vimentin staining. Average signal intensity is the mean of pixels for a given staining inside single cells. Data is shown as mean + SEM. * $p < 0.05$, paired two-tailed Student's *t*-test (N=3 independent experiments). **I.** Gene expression of the top mitochondrial genes that correlate positively

with *PPARGC1B* in the SKCM RNA-seq dataset (TCGA, PanCancer Atlas). Data is shown as mean of Log₂ fold change versus control non-targeting conditions + SEM. * $p < 0.05$, # $p < 0.10$, paired two-tailed Student's *t*-test (N=3 independent experiments)

Figure 9. PGC-1 β knockdown induces an immunosuppressive and pro-inflammatory gene expression program in human melanoma cells.

A. Gene expression in PGC-1 β siRNA-transfected human melanoma cells (SK-MEL-5, MeWo, A375, SK-MEL-28) expressed as Log₂ fold change versus non-targeting control siRNA. Cells were analyzed 72h post-transfection. Data is shown as mean + SEM. Group comparison is done between control non-targeting siRNA and pooled PGC-1 β siRNAs. * $p < 0.05$, paired two-tailed Student's *t*-test (N=3 independent experiments). **B.** Gene expression MeWo cells transfected with different doses of non-targeting control and PGC-1 β siRNA. Cells were analyzed 72 h post-transfection. Data is expressed as fold change (Log₂) versus the respective non-targeting control siRNA treatment for each concentration. Data is shown as mean + SEM. Group comparison is done between control non-targeting siRNA and pooled PGC-1 β siRNAs. * $p < 0.05$, paired two-tailed Student's *t*-test (N=3 independent experiments). **C.** Gene expression in PGC-1 β dicer substrate (DsiRNA)-transfected MeWo cells expressed as Log₂ fold change versus non-targeting control DsiRNA. Cells were analyzed 72 h post-transfection. Data is shown as mean + SEM. Group comparison is done between control non-targeting siRNA and pooled PGC-1 β siRNAs. * $p < 0.05$, paired two-tailed Student's *t*-test (N=3 independent experiments). **D.** Gene expression in control and PGC-1 β shRNA MeWo cell clones stably expressing the Tet repressor and treated with 100 ng/mL Doxycycline (Dox) for 72 h. Data is shown as mean + SD for a representative experiment. **E.** Gene expression in MeWo spheroids. Cells were analyzed 96 h post-transfection and 72 h after the initiation of spheroid formation. Data is shown as mean + SEM. Group comparison is done between control non-targeting siRNA and pooled PGC-1 β siRNAs. * $p < 0.05$, paired two-tailed Student's *t*-test (N=3 independent experiments). **F.** (*left panels*) Representative exposures of cytokine array membranes used to probe cytokines in the conditioned media of non-targeting control and PGC-1 β transfected MeWo cells. Boxes correspond to cytokine spots that are shown in the

right panel. (*right panel*) Quantification of cytokine release from cytokine arrays (as in F). Relative cytokine release is normalized for cell counts. Data is shown as mean + SEM, * $p < 0.05$, paired two-tailed Student's *t*-test (N=3 independent experiments). **G.** Immunoblotting for Galectin-9 (*LGALS9*) in MeWo cells treated as in A. β -actin serves as loading control.

Figure 10. Identification of signaling pathways and transcription factors that mediate the immune response associated with PGC-1 β depletion in melanoma cells.

A. *CXCL8* (IL-8) gene expression in MeWo cells treated with non-targeting control and PGC-1 β siRNA and further treated with a small panel of pharmacological inhibitors. Cells were treated with 1 μ M inhibitors (0.1% DMSO, v/v) 48 h post-transfection for 24 h. Kinases targeted by inhibitors that show diminution in *CXCL8* expression upon PGC-1 β knockdown are indicated in red. Data is shown as mean of Log2 fold change + SD from a representative experiment performed with biological triplicates. **B.** *LGALS9* (Galectin-9) gene expression in MeWo cells treated and analyzed as in A. **C.** Gene expression in MeWo cells treated with non-targeting control and PGC-1 β siRNA and further treated with an IKK β (1 μ M, 0.1% DMSO v/v) or MEK inhibitor (10 μ M, 0.1% DMSO v/v) 48 h post-transfection for 24 h. Data is shown as mean of Log2 fold change + SEM from 3 independent experiments. **D.** Venn diagram of significantly over-represented transcription factor binding sites (TFBS) in immunosuppressive and pro-inflammatory genes regulated by PGC-1 β in melanoma cells. Selected overlapping and non-overlapping transcription factors are indicated. **E.** Heat map of Spearman's correlations between immune transcription factors transcripts and a selection of pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts, mitochondrial protein transcripts, and mitochondrial biogenesis transcripts. Data was organized by hierarchical clustering (Morpheus). Red boxes indicate positive correlation, blue boxes indicate negative correlation. Analyses prepared from the SKCM RNA-seq dataset (TCGA PanCancer Atlas). **F.** Mito-Immune Switch Score (MIS-Score) for the mitochondrial/immune switch for transcription factors commonly involved in immune responses. The score is calculated as the sum of Spearman's correlation for 14 transcripts from genes that encode mitochondrial proteins that positively correlate with the 3 PGC-1s minus the sum of Spearman's correlations for 14 transcripts from the immune signature.

Analyses prepared from the SKCM RNA-seq dataset from the TCGA PanCancer Atlas. **G.** Reporter assays in HEK293T cells co-transfected with reporter gene luciferase plasmids, control renilla plasmids, and non-targeting control or PGC-1 β siRNA. Cells were analyzed 72h post-transfection. Promoter activation (NF- κ B elements, *CXCL8* physiological promoter, interferon-stimulated response element (ISRE) is normalized to renilla signal (RLU1/RLU2). Data is shown as mean + SEM from 3 independent experiments. * $p < 0.05$, paired two-tailed Student's *t*-test. **H.** Gene expression for different interferon regulatory factors (IRFs) in MeWo cells. Data is shown as mean + SEM from 3 independent experiments. * $p < 0.05$, paired two-tailed Student's *t*-test. **I.** Immunoblot analysis of MeWo cells treated for 3 days with non-targeting control and PGC-1 β siRNA. The same amount of protein extracts was loaded for cytosolic and nuclear extracts. P-STAT1 is phosphorylated on Tyr701. The shown experiment is representative of 3 independent experiments. **J.** Gene expression analysis of *CXCL8*, *LGALS9*, and *PPARG1B* in MeWo cells co-transfected with control non-targeting (-) or PGC-1 β (+) siRNA with dicer-substrate siRNA (Dsi) against a panel of transcription factors. Cells were analyzed 3 days post treatment. Data is shown a mean of Log2 fold change + SD of technical replicates for a representative experiment.

Experimental procedures

Cell lines and treatments

The human melanoma cell lines MeWo, SK-MEL-5, and A375 were kindly provided Ian Watson lab (Rosalind et Morris Goodman Cancer Research Centre, McGill University). SK-MEL-28 were kindly provided by Sonia Del Rincon (Lady Davis Institute, McGill University). Human melanoma cell lines were maintained in culture with RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin (100 U/mL, 100 μ g/mL). HEK293T cells were from ATCC (Manassas, VA, USA) were maintained in high glucose DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin. Normal human epidermal keratinocytes were from a single donor and purchased from PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany) and cultured as recommended by the manufacturer. Cell lines were tested negative for mycoplasma

contamination. All cell lines were cultivated in a humidified 37°C 5% CO₂ incubator. Inhibitors and compound used for cell treatments were resuspended in DMSO (BioShop, Burlington, ON, CA) and dilutions were added to growth medium to obtain a final concentration of 0.1% (v/v) DMSO. All inhibitors were from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA), except Doxorubicin and bleomycin (Abcam Inc., Toronto, ON, Canada).

RNA interference

Cells were seeded in 6-well culture plates at the cell density of 25,000 cells/mL media/well for A375, 40,000 cells/mL media/well for SK-MEL-28, 87,500 cells/mL media/well for SK-MEL-5, and 87,500 cells/mL for MeWo (2mL media per well). Cells were incubated for 16-24h before transfection with siRNA or dsRNA. Allstar negative control siRNA (non-targeting, DS NC1) and siRNA against human PGC-1 β (FlexiTube Gene Solution 133522, 4 siRNA duplexes) were purchased from Qiagen (Hilden, DEU). Control negative (non-targeting) control dicer substrate (DsiRNA) and directed against human PGC-1 β (TriFECTa, hs.Ri.PPARGC1B.13, 3 DisRNA duplexes) and transcription factors were purchased from IDT (Coralville, IA, USA). Cell transfections were done using Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) and Opti-MEM low serum medium (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, CA). SiRNA/DsiRNA final concentrations were 2.4 nM, unless specified in figure legends. Transfections were conducted according to manufacturer's protocol. Media were changed 24h post-transfection and replaced for full media.

Cell counting

For cell counting at the indicated time points, cells grown in 6-well plates were rinsed with PBS1X, dissociated with trypsin/EDTA, and resuspended in 1 mL of 10% FBS-containing media. 20 μ L of resuspension was sampled and mixed with a trypan blue solution (Wisent) for manual cell counting with a phase contrast hemacytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) or with a TC20 automated counting device (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For low cell counts, cell suspensions were centrifuged and resuspended in a smaller volume of culture media. For proliferation curves, media were replaced every day.

Cell partitioning

Cell partitioning was conducted 72 h after cell transfection. Cell plates were placed on ice and rinsed 2 times with 2 mL/well ice-cold PBS 1X. 100 μ L of buffer A (10 mM HEPES-HCl pH 7.40, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA supplemented with protease inhibitors Aprotinin, Pepstatin A, Leupeptine, Pefebloc and phosphatase inhibitors NaF, NaVO₄, all from Abcam Inc., Toronto, ON, Canada) was added to each well. Samples were incubated on ice for 15 min while tube were tapped every 5min. 15 μ L of NP40 10% (v/v) were added after the incubation period. Samples were spun down at 17,000 x g for 8 seconds at 4°C and supernatant was collected for each sample. Pellets were rinsed with 200 μ L of buffer A and pellets were resuspended in 100 μ L Triton-X 100 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 1mM EGTA pH 8.0, 1% Triton-X 100 10% supplemented with protease and phosphatase inhibitors as above). Sample were incubated on ice for 20 min with 3 freeze-thaw cycle using liquid nitrogen and 37°C water bath. Supernatant from raw cytoplasmic fraction and raw nuclear fraction were cleared by centrifugation at 17,000 x g at 4°C.

Gene expression analysis

RNA was isolated using Aurum Total RNA extraction Kit (BioRad, Hercules, CA, USA), according to manufacturer's protocol. RNA concentration was measured with a Varioskan LUX multimode microplate reader (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) using the μ Drop plate. Reverse transcription was performed with iScript reverse transcription supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using manufacturer's protocol. Oligonucleotide primers were designed using PrimerBlast software (NCBI, Bethesda, MD, USA). qRT-PCR was performed with the SSo SYBR green mastermix (BioRad BioRad Hercules, CA, USA) or the LUNA universal qPCR mastermix (NEB, Ipswich, MA, USA) on a QuantStudio 5 Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). cDNA were diluted in 1:8 ratio before loading 4 μ L of each sample in triplicates on a MicroAmp optical 96-well plate (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA, #CAT 4346907). PCR reaction for qRT-PCR was done in a 2 steps reaction manner at 95°C for 3 min followed by 45 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 30 sec. PCR amplification was followed by a

melt curve starting at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min ramping up to 95°C with 0,1°C/s ramping speed. Data was analyzed using Quanstudio Design and analysis software (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) where signal normalization on ROX was removed. Gene fold change was determined using the $\Delta\Delta C_t$ calculation methods where RNA levels were normalized against *TBP* or *POLR2A*. All primers have been validated for linearity and specificity by serial dilutions and melt curve analyses, respectively. The primers used in this study are the following (5'→3'):

Housekeeping transcripts:

POLR2A FWD: TGCCACGCCAGCTTCGGAGA

POLR2A REV: AGACCAGGCAGGGGAGTAAC

TBP FWD: TGCCACGCCAGCTTCGGAGA

TBP REV: ACCGCAGCAAACCGCTTGGG

PGC-1s transcripts:

PPARGC1A FWD: CCTGTGATGCTTTTGCTGCTCTTG

PPARGC1A REV: AA ACTATCAA AATCCAGAGAGTCA

PPARGC1B FWD (set 1): TCTTCCTCAACTATCTCGCTG

PPARGC1B REV (set 1): TACTGGTTGGGTTTCAGTCTC

PPARGC1B FWD (set 2): AGGGAGTGAAGGTTGGGAATAG

PPARGC1B REV (set 2): AGCTGGAAATGGCTTTGACATC

Nucleus-encoded mitochondrial transcripts:

SLC25A13 FWD: GCCGCCAAGGTGGCTTT

SLC25A13 REV: TTGGTCTGATCCACCACTCC

HSPA9 FWD: GGACTATCGCTCCATGCCAA

HSPA9 REV: CTTTACTTGGGGCTCTGCCA

NNT FWD: AGAGAGGACATCACGCTTTG

NNT REV: GCTAAGTAGAGGACACGAGCA

AFG3L2 FWD: ACGTGGCAAAGGACTAGGTT

AFG3L2 REV: TTTCTTCAGAGACTCGACCACC

PI4KA FWD: CAGTGTGATGGAGGCCAACC
PI4KA REV: CACAAAAGAGGTCGGGAGGT
BCL2 FWD: CTTTGAGTTCGGTGGGGTCA
BCL2 REV: GGGCCGTACAGTTCACAAA
NLN FWD: TGATGGAAGCCGGATGATGG
NLN REV: GTAAGTCCTCACCTCGTCGT
NOA1 FWD: ACGCGAGCTTCCTTATGACC
NOA1 REV: AAAACGCTCCTGCATGTCAC
APOOL FWD: ACTTGAGCTTGGCTTTGTCC
APOOL REV: AGCAGTATTAGGAAGCCTGTGT

Pro-inflammatory transcripts:

CXCL8 FWD: TGATTTCTGCAGCTCTGTGT
CXCL8 REV: AAATTCTCCACAACCCTCT
IL6 FWD: CAGAGCTGTGCAGATGAGTA
IL6 REV: GCGCAGAATGAGATGAGTTG
IL1B FWD: GCTCGCCAGTGAAATGATG
IL1B REV: GTAGTGGTGGTCGGAGATTC
TNF FWD: AAGAGAATTGGGGGCTTAGG
TNF REV: GTTTCGAAGTGGTGGTCTTG

Immunosuppressive transcripts:

NT5E FWD: CTCCTCTCAATCATGCCGCT
NT5E REV: AGCCAGGTTCTCCCAGGTAA
LGALS9 FWD: AGTCCAGCTGTCCCCTTTTC
LGALS9 REV: CACACCACGTACCCTCCATC
PDCD1LG2 FWD: AAGAGGGAAGTGAACAGTGCT
PDCD1LG2 REV: GCCAGGTGTTGGCTAGTCTT

Interferon-regulatory factor transcripts:

IRF1 FWD: GCCCTCCACCTCTGAAGCTA

IRF1 REV: TACCCCTTCCCATCCACGTT

IRF2 FWD: TCCTGAGTATGCGGTCCTGA

IRF2 REV: AGATGGGACTGTCCTACAAC

IRF3 FWD: TGAGCTACGTGAGGCATGTG

IRF3 REV: AATGAAGGGCCCCAGGTCAA

IRF4 FWD: CCCGGAAATCCCGTACCAAT

IRF4 REV: AGGTGGGGCACAAGCATAAA

IRF9 FWD: ACCAGGATGCTGCCTTCTTC

IRF9 REV: CCTGGTGGCAGCAACTGATA

shRNA Tet-On cloning

shRNA against *PPARGC1B* were design using GPP web portal shRNA design tool (Broad institute, USA). Restriction sites for EcoRI and AgeI were added to oligos design. Annealing of oligo sequence was done by mixing 1:1 200µM oligo in NEB buffer 2 (NEB, Ipswich, MA, USA) and using SimpliAmp thermocycler (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 95°C for 10 min and ramping down to 25°C at 5°C/min. Cloning vector Tet-pLKO-puro (Addgene, Cambridge, MA, USA) was double digested with EcoRI HF (NEB, Ipswich, MA, USA) and AgeI HF (NEB, Ipswich, MA, USA) enzymes following manufacturer's protocol. Digested vector was migrated on 1% agarose gel and extracted using Qiax II gel extraction kit (Qiagen, Hilden, DEU) following manufacturer's protocol. Ligation between digested vector and annealed oligos was conducted using T4 DNA ligase (NEB, Whitby, ON, CA) according to manufacturer's protocol. Vector was inserted in *E. coli* STBL3 strain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by heat shock (20 min on ice followed by water bath at 42°C for 30 sec and 5 min on ice). Pre-culture of bacteria was performed in 1 mL of LB media for 1h at 37°C and 250 RPM shaking. Positive clones were selected by incubating plated bacteria overnight at 37°C with ampicillin. DNA was extracted using Qiagen plasmid midi kit (Qiagen, Hilden, DEU) following manufacturer's protocol. DNA was sent for sequencing to IRIC genomic platform (Université de Montréal, QC, CA) to confirm construction sequence.

Virus production and stable shRNA Tet-on cell line generation

Virus containing shRNA Tet-On cloned vector were produced by transfecting HEK293T cell with 4 µg of shRNA vector, 2 µg psPAX2 (Marc Servant, Université de Montréal), 2 µg pMD2.G using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Viruses were collected a first time 48 h after transfection and a second time 72 h after transfection. Viruses were filtered using 0.45µm PES filter. MeWo cells were infected in a 6-well cell culture plate with 1 mL of produced viruses and 8 µg/mL fresh polybrene. Media was changed 24h after infection. Cell selection was conducted with 0.4 µg/mL puromycin for 5 days. Clone selection was conducted by passing cells to obtain one cell/100 µL per well in 96-well cell culture plate. Stable shRNA Tet-on MeWo cell lines were treated with 100 ng/mL doxycycline for 72 h.

Luciferase vector construction

Genomic DNA was obtained from primary keratinocyte by resuspending cells in 0.3 mL digestion buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 0.1 mg/mL proteinase K) followed by 12-18 h incubation at 50°C. gDNA samples were extracted using a phenol/chloroform/isoamyl alcohol solution followed by a 10 min centrifugation at 17,000 x g two times. Aqueous layer was transferred to a new tube where 1/10 of total volume was added as 3M NaOAc pH 5.2 and then mixed with 2 volume of 100% ethanol. Samples were left at -20°C to maximize recovery. Pellets were rinsed with 70% ethanol and resuspended in TE buffer and stored at 4°C. *CXCL8* promoter luciferase vector was cloned from primary keratinocyte genomic DNA (gDNA) using *CXCL8* promoter primers designed using sequence obtained from Primer Blast. Gene amplification was done with pHusion DNA polymerase (NEB, Whitby, ON, CA) according to manufacturer's protocol using *CXCL8* minimal promoter (-274 to +1) forward primer: 5'-ACTAGCTAGCAACTTTCGTCATACTCCG-3' (with NheI site) and reverse primer: 5'-GGATCTCGAGGTTTACACACAGTGAGATGG-3' (with XhoI site). *CXCL8* minimal promoter (corresponding to -274 to +1) was cloned into the luciferase vector pGL4.19 luc2CP/Neo purchased from Promega (Madison, WI, USA) using T4 DNA ligase (NEB, Whitby, ON, CA) according to manufacturer's protocol. Vector was inserted into *E. coli*

Stbl3 strain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by heat shock (20min on ice followed by water bath at 42°C for 30 sec and 5 min on ice). Pre-culture of bacteria was performed in 1 mL of LB media for 1 h at 37°C and 250 RPM shaking. Positive clones were selected by incubating plated bacteria overnight at 37°C with ampicillin. DNA was extracted using Qiagen plasmid midi kit (Qiagen, Hilden, DEU) following manufacturer's protocol. DNA was sent for sequencing to IRIC genomic platform (Université de Montréal, QC, CA) to confirm construction sequence. Sequences were aligned using ClustalOmega or BoxShade.

Gene reporter assays

1x10⁶ HEK293T cells were seeded in a 6-well cell culture plate. Transfection was conducted 24 h after seeding with 500 ng pGL4.19 CXCL8 minimal promoter plasmid, 50 ng pRL-TK plasmid and 2,4 nM siPGC-1 β pool or 2.4 nM siCTL Allstar non-targeting siRNA (QIAGEN) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Cells were trypsinized and seeded in a 24-well cell culture plate at a concentration of 100,000 cells/mL 24 h after transfection. Experiment was stopped 72 h after transfection. Sample lysis was conducted with the Dual-Luciferase Reporter assay system (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol before transferring 5 μ L of lysate to a 96-well round bottom white plate. Luciferase assay analysis was performed using the Varioskan LUX multimode microplate reader and SkanIt software (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Assay was preprogrammed to inject 25 μ L of LarII, shake 2 sec and measure luminescence followed by Stop n'Glo injection in the same fashion, one well at the time.

Flow cytometry

MeWo cells were seeded in 6-well culture plates at the cell density of 112,500 cells/mL media/well. 72 h after the transfections, cells were rinsed with 1 mL ice cold PBS and trypsinized. Cells were resuspended in 1 mL ice cold PBS at 1x10⁶ cells/mL. Ice cold ethanol was added dropwise to the samples while vortexing followed by a 30 min incubation on ice for fixation. Cells were then resuspended in 500 μ L propidium iodide (PI)/RNase solution (Cell Signaling Technologies Inc., Whitby, ON, CA) and analyzed for cell cycle with Cytoflex flow cytometer (Beckman-Coulter, Indianapolis, IN, USA) and

CytExpert software using a slow aspiration rate. Data was measured using SSC, FSC and PE lasers with default acquisition parameters for SSC and FSC and acquisition parameter of 225 for PE. Gating was done on FSC-A/SSC-A dot plot graph to select live cells, SSC-H/SSC-A graph to discriminate cell singlets from cell doublets and PE-H/PE-A for cell cycle phases. Results were plotted on count/PE-A histogram to assess cell cycle phases. Data was further processed using FlowJo software for cell cycle and statistical analysis.

Mitochondrial ROS and Cytochrome C fluorescence imaging

Mitochondrial superoxide was detected using MitoSOX red mitochondrial superoxide indicator (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were incubated in RPMI1640 with 5 μ M MitoSOX red for 15 min at 37°C in 5% CO₂ atmosphere protected from light and rinsed one time with PBS before fixation. Cells were fixed in 250 μ L/well 4% paraformaldehyde at room temperature for 10 min protected from light and rinsed two times with PBS. Cells were then permeabilized with Triton X-100 0.1% at room temperature for 10min protected from light. Blocking was realized in 200 μ L/well PBS containing 5% normal donkey serum at room temperature for 30 min and protected from light. Cells were incubated overnight at 4°C protected from light with primary antibodies chicken anti-Vimentin (1:5,000, Sigma-Aldrich, AB5733) and mouse anti-Cytochrome C (1:2,000, Bioscience, 556432) diluted in blocking solution. Cells were rinsed 3 times with PBS and incubated in 250 μ L/well CY5- and CY2- conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted in blocking solution containing DAPI (Sigma-Aldrich, D9542) for 2 h. Mitochondrial ROS were quantified using the CellInsight CX5 HCS platform (ThermoFisher Scientific, Waltham, MI, USA). “Target Activation” program was used to acquire data for 289 fields of view (20x magnification) in a spiral manner starting from outer part of well to exclude the center of the well. Mitochondrial ROS signal was normalized on the Cytochrome C intensity signal for each field.

Western blotting

Cells were lysed in RIPA low SDS buffer (50 mM Tris pH 7.40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM EGTA pH 8.0, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS supplemented with Aprotinin, Pepstatin A, Leupeptin hemisulfate, PMSF and sodium orthovanadate (All from Abcam Inc., Toronto, ON, Canada) with freeze and thaw cycle. Lysates were centrifuged at 17,000 x g for 10 min at 4°C and the protein concentration was determined with the Pierce BCA assay (ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA). Equal amounts of total protein were resolved on 10% polyacrylamide-SDS gels and transferred onto PVDF membrane (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). PVDF membranes were rehydrated in methanol prior to the transfer. Transfer was done using Pierce western blot transfer buffer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MI, USA, #CAT 35040) and Trans-Blot SD semi-dry transfer cell (BioRad, Hercules, CA, USA) at constant 15V, 0.2A for 50 min. Blots were blocked in 5% non-fat dry milk-0.1% TBST (blotto) and then incubated with primary antibodies overnight at 4°C with slow rocking. Anti-Galectin-9 (54330), anti-p21 (2947), phospho-Tyr701-STAT1 (9167), anti-STAT1 (14994), anti-p65 (8242), anti-Grp75 (3593), and anti- β -actin (3700) were from Cell Signaling Technologies Inc. (Whitby, ON, CA). Anti-PGC-1 β was from NOVUS (NBP1-29722). PVDF membranes were washed 3 times for 20 min with TBST before incubation with Goat anti-rabbit (1:10,000 dilution) or goat anti-mouse (1:10,000 dilution) horseradish peroxidase conjugate secondary antibodies (Mandel scientific, Guelph, ON, CA) in blotto at room temperature for 1 h. Membranes were washed 5 times for 5 min after secondary antibody incubation. Western blots were revealed using chemiluminescence ECL solution (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) following manufacturer's protocol and Blu-Lite films (Dutscher, Bernolsheim, FR). Films were developed in a dark room using Mini-Med 90 X-Ray film processor (AFP manufacturing, Peachtree city, GA, USA).

Cytokine array

Conditioned media from siRNA-treated cells was collected 72 h post-transfection, 48 h after media change, and cleared by centrifugation at 17,000 x g for 5 min at 4°C. Cytokine concentration in media were quantified with the Human Cytokine Antibody Array ab133997 (Abcam Inc., Toronto, ON, Canada). Cleared media (1mL) was added to pre-

blocked cytokine array membranes and incubated overnight at 4°C. Washes and subsequent steps were done according to the manufacturer's instructions. Revelation was done in a dark room using autoradiography films and developer. Films were scanned at 300 dpi in gray scale and analyzed with the ImageJ Software (NIH). Densitometry of each cytokine spot was done with a circular elliptical tool and area was maintained constant for all analyses. Spot densitometric values were normalized and corrected for positive and negative controls, respectively, as recommended by the manufacturer. Densitometric values were further corrected for matching cell counts.

Analyses of publicly-available RNA-seq datasets

RNA expression datasets used in this study were obtained from the cBioPortal for Cancer Genomics web site, an open-access and open-source resource(257, 258). The results shown here are in whole or part based upon data generated by the TCGA Research Network: <http://www.cancer.gov/tcga>. The skin cutaneous melanoma dataset (TCGA, Pancancer Atlas) has 443 mRNA expression samples (RSEM, batch normalized from Illumina HiSeq_RNASeqV2). The human melanoma cell line dataset was derived from the Cancer Cell Line Encyclopedia (Broad, 2019)(259) and contained 48 melanoma cell lines (from 1739 samples). Spearman's correlations were retrieved from the cBioPortal online website, and correlation or mRNA expression tables were exported in Microsoft Excel for the sorting of correlation coefficients, p , and q -values. For the generation of low and high PGC-1s-expressing tumor groups, all tumor samples in datasets were ranked for individual PGC-1s expression, and tumors were further sorted according to the summed rank for *PPARGC1A*, *PPARGC1B*, and *PPRC1*. High PGC-1s-expressing tumors were defined as tumors in the upper quartile of distribution (25% top), while the low PGC-1s-expressing tumors were defined as tumors in the lowest quartile of distribution (25% bottom). The list of 1158 mitochondrial proteins was obtained from the Human MitoCarta 2.0 study(260). Significant correlations between PGC-1s and other transcripts had q -values threshold 0.05. Gene functional analyses were done with the DAVID Bioinformatics online portal(261), and stringency setting was set as highest. For heatmap representations, Spearman's coefficients grids or relative mRNA expression levels were colored by conditional formatting in Microsoft Excel. Coefficient of variation (CV) were calculated as standard

deviation divided by average and multiplied by 100. Hierarchical clustering of specific data sets was done with Morpheus: <https://software.broadinstitute.org/morpheus>. For the mitochondrial-immune score (MIS) associated with transcription factors, the sum of Spearman's correlation coefficient of a selection 14 pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts was subtracted from the sum of Spearman's correlation coefficient of a selection of 14 representative transcripts encoding for mitochondrial proteins. Strong negative values for MIS suggest downregulation of mitochondrial protein and upregulation of immune genes. Strong positive values for MIS suggest down regulation of immune genes and upregulation of mitochondrial genes.

Statistical analyses

Statistical analyses were done with the GraphPad Prism software or Microsoft Excel. All experiments shown are either shown as the combination of 3 or more independent experiments, or as single experiments that are representative of 2 or more independent experiments, as indicated in the figure legends.

Figure 7

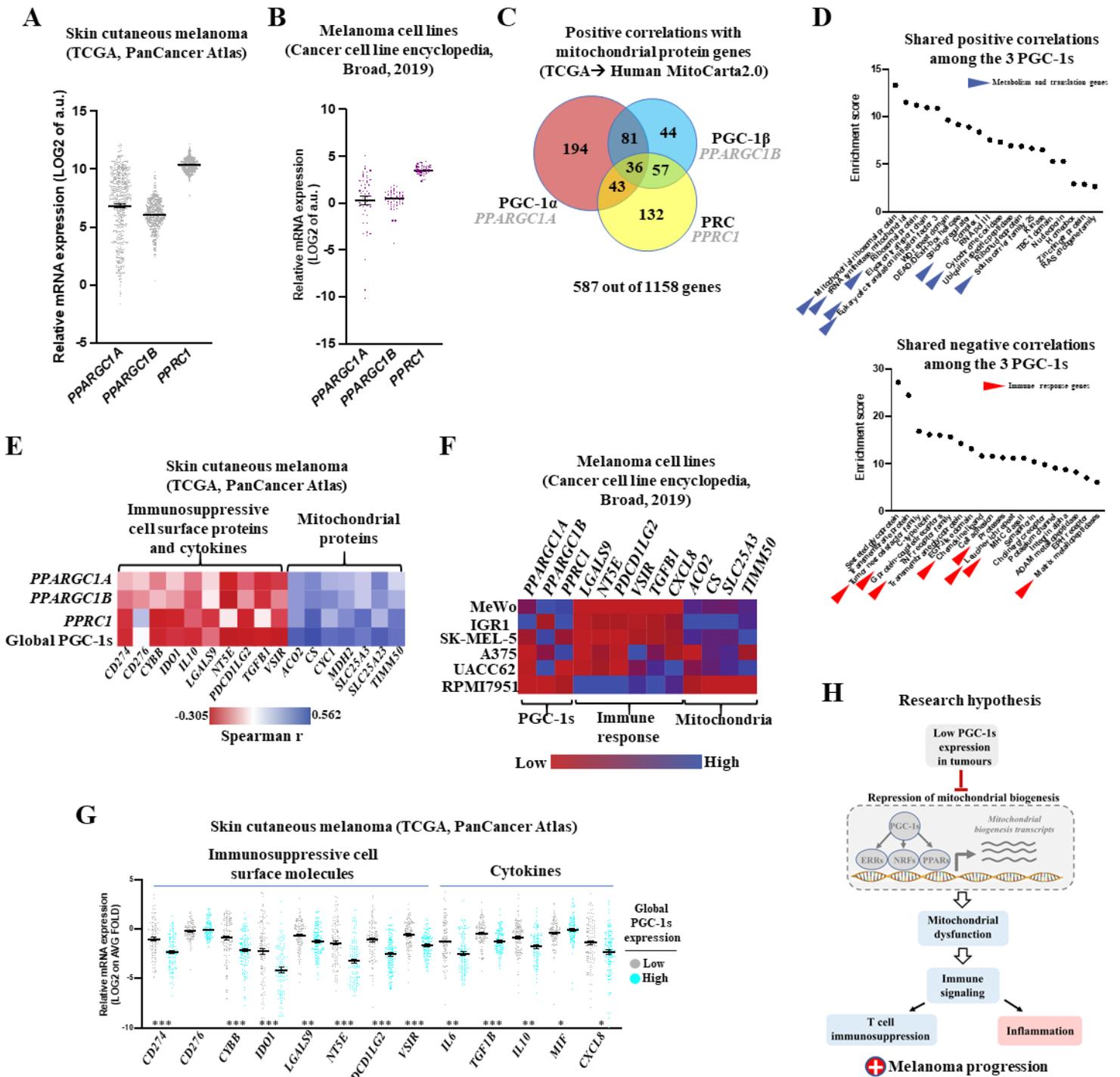


Figure 8

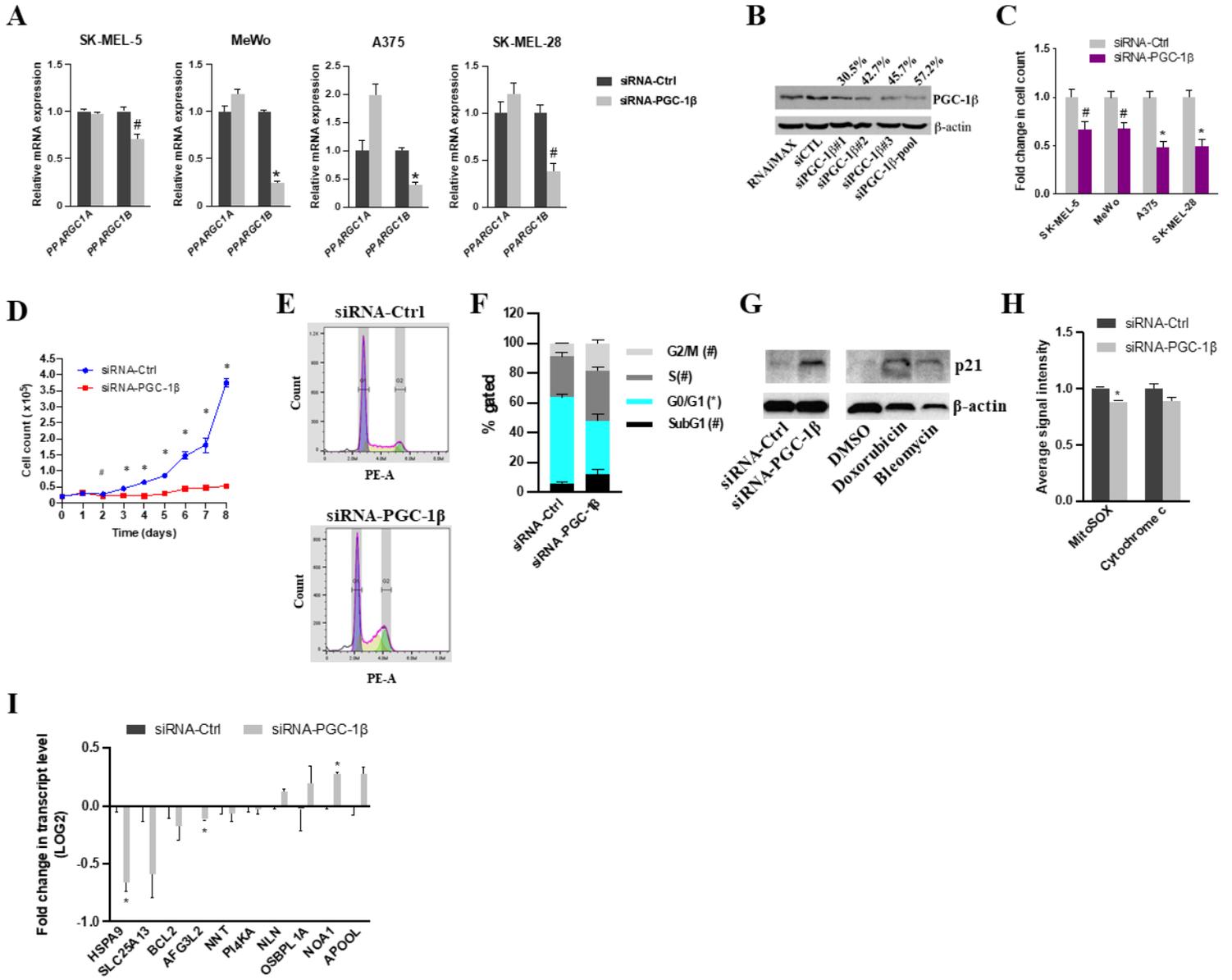


Figure 9

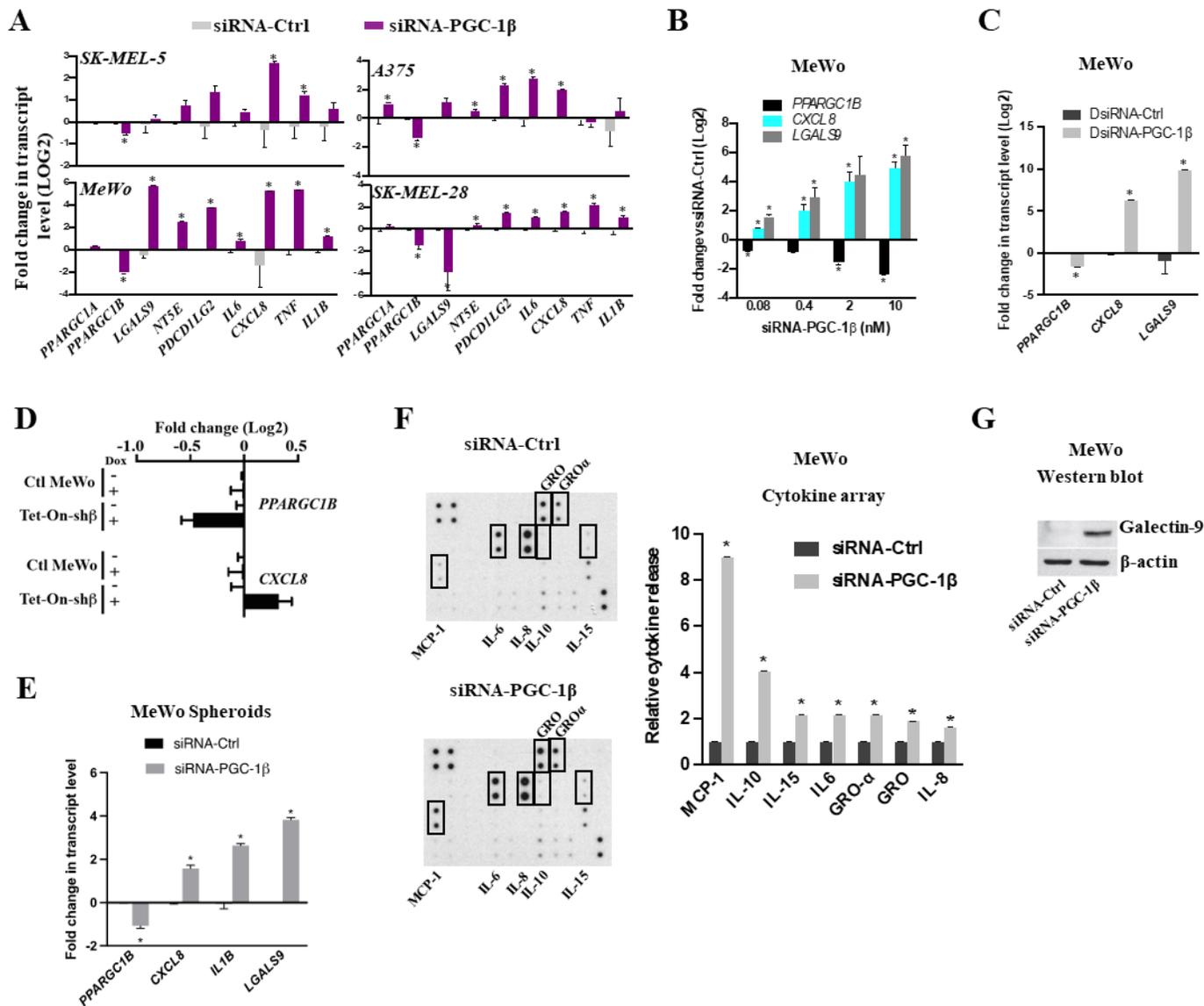
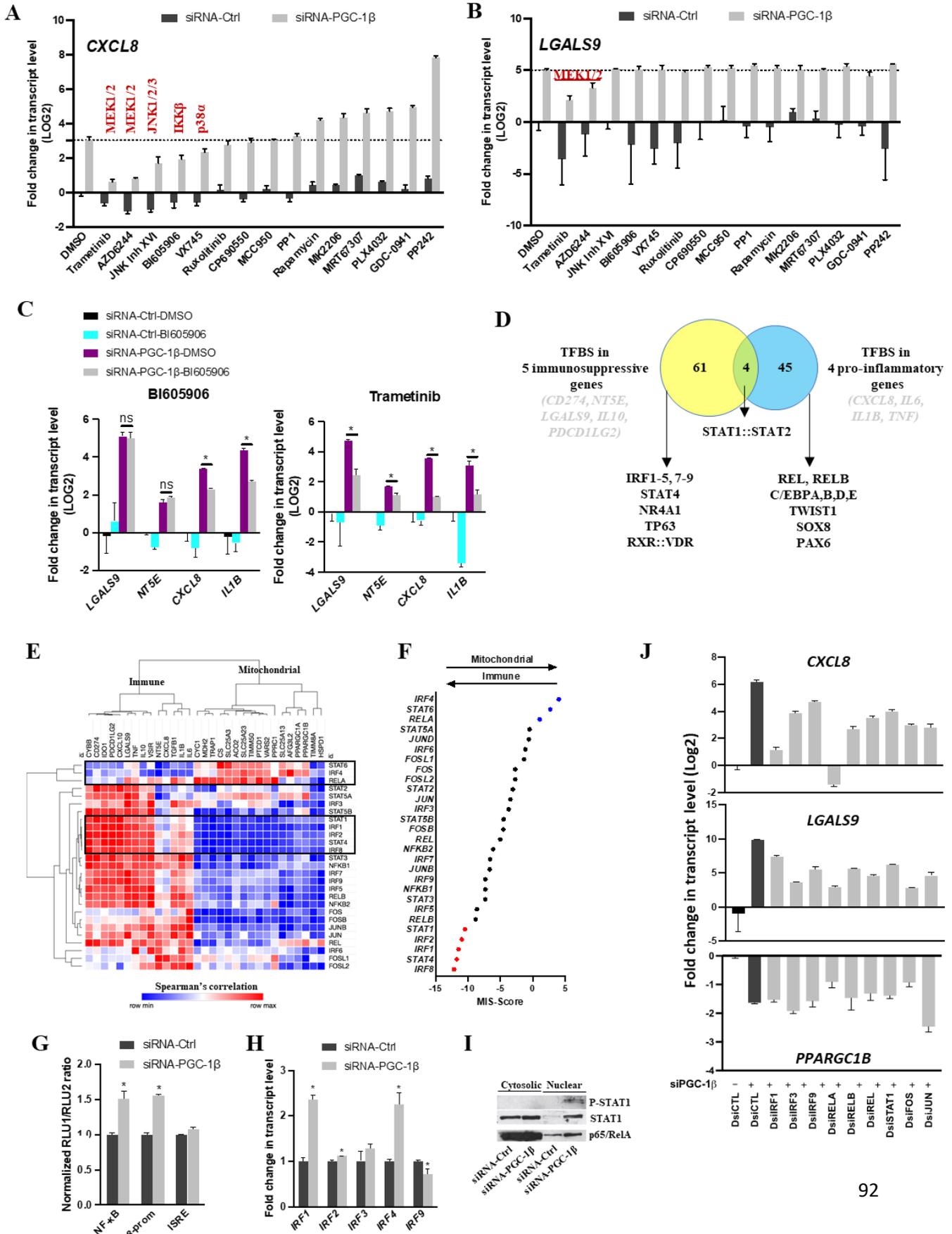


Figure 10



Chapitre III: Discussion

3. Chapitre III: Discussion

3.1 Le rôle des mitochondries dans la progression du mélanome

La mitochondrie joue un rôle important non seulement au niveau du métabolisme cellulaire, mais aussi dans l'activation de la réponse immunitaire innée. Plusieurs études ont montré qu'un dysfonctionnement mitochondrial provoqué par un stress oxydant important active différentes voies de signalisation de l'immunité innée par une variété de mécanismes distincts. Par exemple, une production accrue de ROS est connue pour activer la voie NF- κ B et causer des dommages mitochondriaux (272, 295). Les travaux en cours dans notre laboratoire, effectués par ma collègue Katherine Coutu- Beaudry, s'efforcent d'ailleurs à caractériser l'effet du stress oxydatif sur l'expression de PGC-1 β . De récentes études ont montré que l'activation de la réponse immunitaire innée pouvant induire l'expression de molécules immunosuppressives du mélanome liant ainsi la dysfonction mitochondriale à l'évasion et la résistance aux thérapies dans le mélanome (219, 222, 223, 296). La fonction mitochondriale possède un rôle vital dans la sensibilisation du mélanome aux immunothérapies. Il a été montré que les sous-types de mélanome ayant une activité mitochondriale accrue sont plus sensibles à l'activité cytotoxique des lymphocytes T (233). Ceci suggère qu'une dysfonction mitochondriale pourrait être liée l'expression de molécules immunosuppressive.

Une évidence de la possible implication de la mitochondrie lors de la déplétion de PGC-1 β est l'arrêt du cycle cellulaire (**Fig.8E, F**) ainsi que l'induction de p21 (**Fig.8G**). Le contrôle du cycle cellulaire par les mitochondries est aujourd'hui bien connu. Il a été montré que la dysfonction mitochondriale participe au déclenchement de la sénescence cellulaire en induisant l'expression de p53 et p21. En testant les 10 gènes mitochondriaux dont la corrélation avec les PGC-s est la plus forte, nous avons observé que l'expression des gènes *HSPA9* et *AFG3L2* était significativement diminuée en condition de déplétion de PGC-1 β (**Fig.8I**). La déplétion de *HSPA9*, qui encode pour la protéine de choc thermique *mortalin* (aussi nommé GRP75), est connue pour induire p21^{CIP} et l'arrêt du cycle cellulaire en permettant l'activation de la voie MEK/ERK dans le mélanome (286). Le gène *AFG3L2* code pour une sous-unité importante de la protéase m-AAA qui joue un rôle essentiel dans

la dégradation des protéines mitochondriales mal repliées. Sans surprise, une diminution de l'expression de ce gène peut provoquer la fragmentation des mitochondries et participer à la dysfonction mitochondriale (287).

La diminution de la mortalin pourrait être intéressante au niveau thérapeutique. En effet, l'arrêt de la croissance cellulaire via p21 causé par la diminution de la mortalin pourrait être bénéfique afin de ralentir ou d'arrêter la croissance tumorale. De plus, il a été montré qu'une déplétion en mortalin augmente la sensibilité des cellules cancéreuses aux chimiothérapies via la diminution de la protection contre le stress oxydatif que confère la mortalin (297). Malgré les fonctions communes des différents PGC-1s, l'expression des gènes mitochondriaux étudiés ne semble pas être affectée, lors de la déplétion en PGC-1 β , par une compensation par PGC-1 α (**Fig.8A**) ou PRC (résultats non présentés) puisque l'expression des autres PGC-1s n'est pas significativement induite lors de la déplétion en PGC-1 β . Ceci suggère que les résultats obtenus sont spécifiques à la déplétion en PGC-1 β ou dépend du contexte cellulaire puisque notre modèle cellulaire ne tient pas en compte des modifications post-traductionnelles qui pourraient affecter les autres membres des PGC-1s.

3.2 L'inflammation dans le mélanome : un allié ou un adversaire?

L'inflammation possède un rôle essentiel dans la résolution d'un événement biologique indésirable puisqu'elle est nécessaire à l'activation du système immunitaire. Son rôle dans le mélanome et le cancer en général ne semble pas aussi clair. En plus d'être primordiale dans le recrutement des lymphocytes et des cellules dendritiques pour détruire les cellules cancéreuses, l'inflammation est largement acceptée comme un important contributeur de la tumorigenèse (298-300). Nos travaux de recherche révèlent pour la première fois que les cellules MeWo ayant une faible expression de PGC-1 β surexpriment des molécules pro-inflammatoires et immunosuppressives (**Fig.9C**). Cette découverte suggère que l'activation de la réponse immunitaire innée joue un rôle important dans la progression tumorale. Plusieurs études ont montré que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires joue un rôle déterminant dans le remodelage du TME et l'invasion

cellulaire (301-304). L'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires est non seulement reproductible dans les sphéroïdes (**Fig.9E**) mais, se traduit aussi par une présence durable de ces cytokines dans l'environnement cellulaire (**Fig. 9F**). Ceci suggère que le même phénomène pourrait survenir au niveau des tumeurs *in vivo*. L'impact de la modulation des PGC-1s serait à évaluer à l'aide de modèles immunocompétents *in vivo*.

Il est connu que l'inflammation chronique est un facteur majeur dans le développement du cancer. Or, l'induction de cytokines pro-inflammatoires lors d'une déplétion en PGC-1 β pourrait s'avérer être une piste sur les mécanismes utilisés par le mélanome pour instaurer un état inflammatoire chronique qui favorise son développement. En ce sens, l'augmentation de l'inflammation provoquée par l'absence de PGC-1 β serait un adversaire aux traitements contre le mélanome. Tel que mentionné lors de l'introduction (voir section 1.4.2), l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires lors de l'inflammation active directement plusieurs voies de la réponse immunitaire innée (p.ex. signalisation IL-6 via Jak-STAT, NF- κ B) et contribue à l'établissement d'un TME qui favorise la progression du mélanome. Nos résultats montrent aussi que la déplétion de PGC-1 β s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'une variété de molécules immunosuppressives (**Fig.9A**). Plusieurs études ont montré que l'expression de ces molécules est le principal responsable de l'évasion du mélanome ainsi que le plus grand défi à surmonter pour traiter les tumeurs qui ne répondent pas aux immunothérapies (305-309). Nos travaux montrent que l'expression des cytokines et des molécules immunosuppressives dans les MeWo survient principalement par la voie MEK alors que la voie IKK β semble n'être impliquée que dans l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (**Fig.10A, B**). Alors que l'expression de molécules immunosuppressives est généralement associée à une faible infiltration lymphocytaire dans les tumeurs et à un mauvais pronostic, l'augmentation de l'expression de ces molécules peut s'avérer être un atout dans le traitement du mélanome. En effet, en régulant à la hausse ces molécules, il pourrait être possible de sensibiliser ces tumeurs aux immunothérapies et ainsi favoriser l'infiltration lymphocytaire au sein de tumeurs considérées froides. Il serait donc intéressant de déterminer l'effet des immunothérapies sur des tumeurs déplétées en PGC-1 β *in vivo*.

3.3 PGC-1 β comme cible thérapeutique du métabolisme du mélanome

Nos travaux de recherche ont permis d'établir pour la première fois un lien entre l'expression des PGC-1s et le contrôle de l'inflammation et de l'immunosuppression dans le mélanome. Le métabolisme cellulaire est de plus en plus reconnu comme un joueur clé de plusieurs maladies où la dysfonction mitochondriale semble avoir un rôle prépondérant. Depuis plusieurs années, l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses est connue pour participer activement à la tumorigenèse et au développement de la résistance aux traitements. Le potentiel thérapeutique limité de la chimiothérapie et l'exploitation de multiples voies métaboliques par les cellules cancéreuses comme le mélanome demande l'identification de biomarqueurs afin de cibler plus efficacement les cellules résistantes. En ce sens, cibler des régulateurs du métabolisme cellulaire tel que les PGC-1s pourrait s'avérer être une stratégie prometteuse pour traiter des maladies comme le mélanome où le métabolisme cellulaire est grandement modifié. L'implication des PGC-1s dans les maladies à composante métabolique telles que le diabète a été montrée à maintes reprises (207, 310, 311). Bien que PGC-1 α soit une cible thérapeutique de choix dans ce type de maladie, il a été montré que la réponse n'était pas aussi évidente dans le cas du mélanome. En effet, autant l'augmentation que la diminution de PGC-1 α dans le mélanome semble favoriser soit sa progression ou sa métastase (233, 234, 312). Il a aussi été montré que des mécanismes compensatoires, comme l'augmentation du métabolisme du glucose et de la glutamine, pouvaient être mis en place pour pallier la diminution de PGC-1 α (313). Au contraire, l'implication de PGC-1 β dans la régulation de l'inflammation mérite que ses fonctions soient davantage caractérisées. Les liens entre la dysfonction mitochondriale, la réponse immunitaire innée et l'expression de molécules immunosuppressives établis par nos travaux mérite d'évaluer l'impact des immunothérapies sur des tumeurs déplétées en PGC-1 β .

En tenant compte des fonctions de PGC-1 β dans le métabolisme cellulaire, sa déplétion pourrait s'avérer être un atout important dans le traitement du mélanome cutané. Tout d'abord, une diminution de PGC-1 β pourrait diminuer l'effet Warburg dans le mélanome en limitant non seulement le transport du glucose cellulaire mais, aussi la

gluconéogénèse. Ceci pourrait cependant mener à une augmentation de l'utilisation de la glutamine par le mélanome afin de compenser la perte du glucose. De plus, l'inhibition de PGC-1 β pourrait potentiellement limiter l'utilisation de voies métaboliques comme la lipogénèse qui peut conférer au mélanome des métabolites importants pour sa division cellulaire. Les résultats obtenus en étudiant le cycle cellulaire (**Fig. 8F**) suggèrent qu'une diminution de PGC-1 β pourrait avoir un impact positif sur la progression tumorale et sur la métastase en limitant la division cellulaire. Le profil d'expression des cytokines et des molécules du point de contrôle pourrait être un outil intéressant à utiliser pour augmenter l'efficacité des immunothérapies. Bien que l'inflammation contribue au développement d'un TME favorable à la croissance tumorale, elle peut aussi favoriser l'infiltration des lymphocytes cytotoxiques. La surexpression de *NT5E* (**Fig. 9A**) en particulier pourrait favoriser l'utilisation d'inhibiteurs de CD73 qui sont actuellement en développement pour le traitement du cancer (314). De plus, l'augmentation de l'expression de PD-L1 observée dans les cellules déplétées en PGC-1 β (résultats non montrés) pourrait aussi être bénéfique pour l'utilisation d'anti-PD-L1 tel que le nivolumab.

3.4 Limites de l'étude

Bien que des liens intéressants aient pu être établis entre l'expression de PGC-1 β , l'inflammation et l'expression des molécules du point de contrôle immunitaire, nos travaux présentent tout de même quelques limitations. Tout d'abord, l'ARN interférence a été l'unique méthode utilisée avec succès pour provoquer une déplétion significative en PGC-1 β dans les cellules de mélanome. Le modèle de déplétion par ARN en épingle à cheveux (shRNA) ainsi que le modèle d'extinction par CRISPR-Cas9 ne permettaient pas l'étude du mélanome en condition d'expression diminuée ou d'absence de PGC-1 β . En effet, suite à la sélection de cellules par antibiotique suivant l'infection des cellules de mélanome avec les constructions CRISPR-Cas9 ou shRNA, peu ou pas de diminution de PGC-1 β était observable dans les cellules survivantes (résultats non montrés). Ce phénomène pourrait être expliqué par le rôle joué par PGC-1 β dans le maintien des fonctions et la survie cellulaire. Or, l'ajout d'un agent de sélection comme la puromycine, qui agit en empêchant la traduction de l'ARNm, pourrait empêcher la survie des cellules sous un certain seuil

d'expression de PGC-1 β et favoriser la croissance d'une sous-population qui en exprime une plus grande quantité. Il est important de souligner que l'utilisation d'agent de sélection tels que la puromycine, la blasticidine et la G418 diminuent de façon constitutive l'expression de PGC-1 β , rendant difficile l'identification de cellules où les stratégies CRISPR-Cas9 ou shRNA ont fonctionné (résultats non montrés). Un autre point majeur à soulever concernant l'étude de l'effet de la déplétion en PGC-1 β est qu'aucun essai de reconstitution n'a été effectué lors de nos travaux. Il n'a donc pas été possible d'observer si la supplémentation en PGC-1 β était suffisante pour renverser les effets observés lors de sa déplétion.

Un aspect supplémentaire qui n'a pas été abordé en profondeur lors de nos travaux est l'aspect du métabolisme du mélanome en condition de déplétion de PGC-1 β . Alors que PGC-1 β est un co-activateur transcriptionnel de plusieurs gènes liés au métabolisme, une diminution de son expression doit certainement avoir un impact significatif sur une ou plusieurs voies métaboliques. Cependant, nous n'avons pas évalué l'impact de sa déplétion sur le métabolisme des cellules du mélanome. Il serait donc essentiel d'étudier cet aspect dans des travaux de recherche subséquents en évaluant la respiration cellulaire par Seahorse pour déterminer si la déplétion de PGC-1 β affecte la phosphorylation oxydative. IL serait aussi intéressant de conduire des essais de détection de lactate vérifier l'impact d'une absence en PGC-1 β dans le mélanome sur la glycolyse.

3.5 Perspectives

Les résultats obtenus présentement dans notre laboratoire nous ont permis d'établir de solides bases pour de futurs travaux. En effet, la surexpression des cytokines pro-inflammatoires n'est que le début de la caractérisation de la réponse immunitaire innée impliquant les PGC-1s. Tout d'abord, il serait intéressant de vérifier si la supplémentation en PGC-1 β serait suffisante pour renverser les effets que nous avons observé. De futurs travaux pourraient aussi viser la caractérisation de l'interaction entre les différentes cellules immunitaires, les mélanomes surexprimant des molécules immunosuppressives et l'utilisation d'immunothérapies. Les résultats de cette étude ont été obtenus exclusivement

dans un contexte de déplétion en PGC-1 β et révèlent que des mécanismes de régulation des PGC-1s jusqu'ici inconnus pourraient jouer un rôle dans les réponses moléculaires obtenus. Au moment d'écrire ces lignes, mes collègues au laboratoire Gravel travaillent activement afin de caractériser la régulation de PGC-1 β lors du stress cellulaire. Finalement, la modulation de PGC-1 β pourrait jouer un rôle important dans la sensibilisation des tumeurs aux immunothérapies. Par exemple, des agents de sélections comme la puromycine et la G418 pourrait être utilisés pour diminuer l'expression de PGC-1 β et combiner à des immunothérapies pour traiter des mélanomes résistants. À l'instar de PGC-1 α , PGC-1 β pourrait devenir un biomarqueur pour la sélection d'un traitement antitumoral.

4. Conclusion

En conclusion, nos travaux de recherche nous ont permis d'établir de solides liens entre l'expression de PGC-1 β , l'inflammation et l'expression de molécules du point de contrôle immunitaire. De plus, nous avons pu observer que l'expression de PGC-1 β était impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et ce, d'une manière indépendante des ROS. Nous avons pu, pour la première fois, établir une relation entre une potentielle dysfonction mitochondriale et des mécanismes de l'évasion du mélanome. Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de stipuler que la régulation de PGC-1 β dans le mélanome pourrait présenter un potentiel thérapeutique qui se doit d'être approfondi. Nous proposons d'évaluer si les effets observés *in vitro* sont aussi reproductible *in vivo*

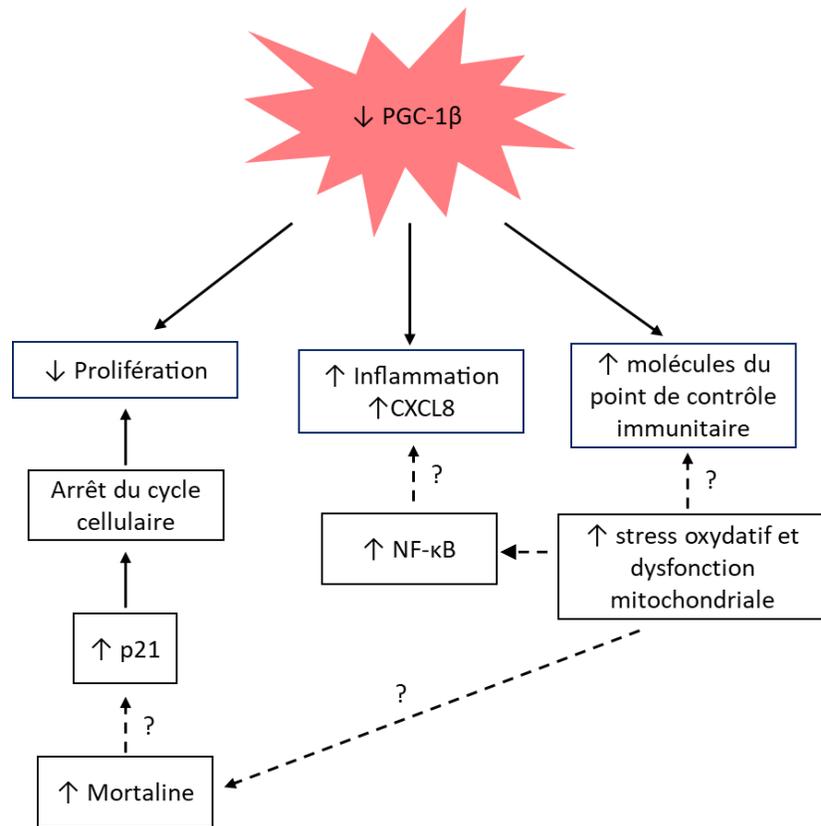


Figure 11 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus.

La diminution de l'expression de PGC-1 β dans les cellules de mélanome est accompagné par une diminution de la prolifération cellulaire, une augmentation de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dont la plus notable est *CXCL8* par une augmentation d'une variété de molécules du point de contrôle immunitaire incluant galectine-9 et CD73 (*NT5E*). La diminution de la prolifération cellulaire est expliqué par un arrêt du cycle cellulaire dépendant de p21 et possiblement induit par une augmentation de l'expression de la mortaline. Les différents aspects observés lors de la déplétion en PGC-1 β pourraient être expliqué par une dysfonction mitochondriale provoquée par une augmentation du stress oxydatif.

Bibliographie

1. Murphy K, Weaver C. Janeway's immunobiology. 9th edition. ed. New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC; 2016. xx, 904 pages p.
2. Yousef H AM, Sharma S. Skin (Integument), Epidermis StatPearls [Internet]2021 [updated 2020 Jul 27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>.
3. Losquadro WD. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2017;25(3):283-9.
4. Muehlbauer P, McGowan C. Skin cancer. Pittsburgh, Pa.: Oncology Nursing Society; 2009. vii, 107 p. p.
5. Clayton K, Vallejo AF, Davies J, Sirvent S, Polak ME. Langerhans Cells- Programmed by the Epidermis. *Front Immunol.* 2017;8:1676.
6. West HC, Bennett CL. Redefining the Role of Langerhans Cells As Immune Regulators within the Skin. *Front Immunol.* 2017;8:1941.
7. NIH. Skin diseases: NIH; 2021 [updated april 2021; cited 2021. Available from: <https://www.niams.nih.gov/health-topics/skin-diseases>.
8. Canada Rm. Qu'est-ce que le mélanome? 2016 [updated 2016; cited 2021 May 5th]. Available from: <https://www.melanomanetwork.ca/fr/quest-ce-que-le-melanome/>.
9. Canada Gd. Cancer de la peau avec présence de mélanome 2019 [updated Decembre 9th, 2019; cited 2021 May 5th]. Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies-chroniques/cancer/cancer-peau-presence-melanome.html>.
10. Lideikaite A, Mozuraitiene J, Letautiene S. Analysis of prognostic factors for melanoma patients. *Acta Med Litu.* 2017;24(1):25-34.
11. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2001;344(13):975-83.
12. Feller L, Khammissa RAG, Kramer B, Altini M, Lemmer J. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face. *Head Face Med.* 2016;12:11.
13. Grachtchouk M, Pero J, Yang SH, Ermilov AN, Michael LE, Wang A, et al. Basal cell carcinomas in mice arise from hair follicle stem cells and multiple epithelial progenitor populations. *J Clin Invest.* 2011;121(5):1768-81.
14. Marzuka AG, Book SE. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale J Biol Med.* 2015;88(2):167-79.
15. Kass Youssef K, Lapouge G, Van Keymeulen A, Blanpain C. [Identification of basal cell carcinoma initiating cells]. *Med Sci (Paris).* 2010;26(12):1020-2.
16. Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2007;157 Suppl 2:47-51.
17. Teh MT, Wong ST, Neill GW, Ghali LR, Philpott MP, Quinn AG. FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res.* 2002;62(16):4773-80.
18. Wierstra I, Alves J. FOXM1, a typical proliferation-associated transcription factor. *Biol Chem.* 2007;388(12):1257-74.
19. Montagna E, Lopes OS. Molecular basis of basal cell carcinoma. *An Bras Dermatol.* 2017;92(4):517-20.

20. Damsky WE, Bosenberg M. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene*. 2017;36(42):5771-92.
21. Proper S. Squamous Cell Carcinoma: A Review of Etiology, Pathogenesis, Treatment, and Variants. *Dermatology Nurses' Association*. 2010;2(1):5.
22. Kaliki S, Shields CL. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer. *Eye (Lond)*. 2017;31(2):241-57.
23. Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C, et al. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010;23(6):763-70.
24. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*. 1969;29(3):705-27.
25. Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(8):775-84.
26. Dickson PV, Gershenwald JE. Staging and prognosis of cutaneous melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2011;20(1):1-17.
27. Van Den Bossche K, Naeyaert JM, Lambert J. The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic*. 2006;7(7):769-78.
28. Riley PA, Borovanský J, Wiley InterScience (Online service). *Melanins and melanosomes : biosynthesis, biogenesis, physiological, and pathological functions*. Weinheim

John Wiley distributor ;: Chichester : Wiley-VCH ;; 2011. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527636150> Accès réservé UdeM

Conditions d'utilisation: https://bib.umontreal.ca/public/bib/conditions-utilisation/conditions-utilisation-fiche_006.pdf.

29. Delevoye C. Melanin transfer: the keratinocytes are more than gluttons. *J Invest Dermatol*. 2014;134(4):877-9.
30. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med*. 1999;340(17):1341-8.
31. Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2019;32(2):224-36.
32. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
33. Streutker CJ, McCready D, Jimbow K, From L. Malignant melanoma in a patient with oculocutaneous albinism. *J Cutan Med Surg*. 2000;4(3):149-52.
34. Gilchrest BA, Eller MS. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1999;4(1):35-40.
35. Abdel-Malek Z, Suzuki I, Tada A, Im S, Akcali C. The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;885:117-33.
36. Scherer D, Kumar R. Genetics of pigmentation in skin cancer--a review. *Mutat Res*. 2010;705(2):141-53.
37. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*. 2005;41(1):45-60.

38. Zaidi MR, Day CP, Merlino G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol.* 2008;128(10):2381-91.
39. de Jager TL, Cockrell AE, Du Plessis SS. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. In: Ahmad SI, editor. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment.* Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 15-23.
40. Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control.* 2001;12(1):69-82.
41. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):12222-48.
42. Karsten AE, Smit JE. Modeling and verification of melanin concentration on human skin type. *Photochem Photobiol.* 2012;88(2):469-74.
43. Purdue MP, From L, Armstrong BK, Krickler A, Gallagher RP, McLaughlin JR, et al. Etiologic and other factors predicting nevus-associated cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(8):2015-22.
44. Shitara D, Tell-Marti G, Badenas C, Enokihara MM, Alos L, Larque AB, et al. Mutational status of naevus-associated melanomas. *Br J Dermatol.* 2015;173(3):671-80.
45. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer.* 2005;41(1):28-44.
46. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer.* 2005;41(14):2040-59.
47. Begg CB, Orlow I, Hummer AJ, Armstrong BK, Krickler A, Marrett LD, et al. Lifetime risk of melanoma in CDKN2A mutation carriers in a population-based sample. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(20):1507-15.
48. Suzuki I, Tada A, Ollmann MM, Barsh GS, Im S, Lamoreux ML, et al. Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. *J Invest Dermatol.* 1997;108(6):838-42.
49. Nasti TH, Timares L. MC1R, eumelanin and pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochem Photobiol.* 2015;91(1):188-200.
50. Kanetsky PA, Swoyer J, Panossian S, Holmes R, Guerry D, Rebbeck TR. A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. *Am J Hum Genet.* 2002;70(3):770-5.
51. Markey AC. Etiology and pathogenesis of squamous cell carcinoma. *Clin Dermatol.* 1995;13(6):537-43.
52. Shamanna RA, Croteau DL, Lee JH, Bohr VA. Recent Advances in Understanding Werner Syndrome. *F1000Res.* 2017;6:1779.
53. Kubica AW, Brewer JD. Melanoma in immunosuppressed patients. *Mayo Clin Proc.* 2012;87(10):991-1003.
54. Olsen CM, Knight LL, Green AC. Risk of melanoma in people with HIV/AIDS in the pre- and post-HAART eras: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *PLoS One.* 2014;9(4):e95096.
55. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 2012;150(2):251-63.

56. Merid SK, Goranskaya D, Alexeyenko A. Distinguishing between driver and passenger mutations in individual cancer genomes by network enrichment analysis. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:308.
57. Reddy BY, Miller DM, Tsao H. Somatic driver mutations in melanoma. *Cancer*. 2017;123(S11):2104-17.
58. Rabbie R, Ferguson P, Molina-Aguilar C, Adams DJ, Robles-Espinoza CD. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *J Pathol*. 2019;247(5):539-51.
59. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, et al. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem*. 2007;282(19):14056-64.
60. Gonskikh Y, Polacek N. Alterations of the translation apparatus during aging and stress response. *Mech Ageing Dev*. 2017;168:30-6.
61. Force T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension*. 1998;31(1 Pt 2):152-61.
62. Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1161-76.
63. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007;26(22):3100-12.
64. Sullivan RJ, Fisher DE. Understanding the biology of melanoma and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014;28(3):437-53.
65. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med*. 2012;10:85.
66. Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KS. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*. 2013;32(25):3009-18.
67. Kiuru M, Busam KJ. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Lab Invest*. 2017;97(2):146-57.
68. Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science*. 1995;269(5222):403-7.
69. Andersson MB, Ketterman AJ, Bogoyevitch MA. Differential regulation of parallel mitogen-activated protein kinases in cardiac myocytes revealed by phosphatase inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251(1):328-33.
70. Monje P, Hernandez-Losa J, Lyons RJ, Castellone MD, Gutkind JS. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35081-4.
71. Jost M, Huggett TM, Kari C, Boise LH, Rodeck U. Epidermal growth factor receptor-dependent control of keratinocyte survival and Bcl-xL expression through a MEK-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2001;276(9):6320-6.
72. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*. 2006;58(11):621-31.
73. Scharl M, Wilde B, Laisney JA, Taniguchi Y, Takeda S, Meierjohann S. A mutated EGFR is sufficient to induce malignant melanoma with genetic background-dependent histopathologies. *J Invest Dermatol*. 2010;130(1):249-58.

74. Easty DJ, Gray SG, O'Byrne KJ, O'Donnell D, Bennett DC. Receptor tyrosine kinases and their activation in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(3):446-61.
75. Gross A, Niemetz-Rahn A, Nonnenmacher A, Tucholski J, Keilholz U, Fusi A. Expression and activity of EGFR in human cutaneous melanoma cell lines and influence of vemurafenib on the EGFR pathway. *Target Oncol.* 2015;10(1):77-84.
76. Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J.* 2012;18(2):142-7.
77. Roux PP, Topisirovic I. Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(11).
78. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol.* 2001;3(3):245-52.
79. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med.* 2002;8(10):1153-60.
80. Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem.* 2005;280(37):32081-9.
81. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene.* 2003;22(20):3113-22.
82. Brandmaier A, Hou SQ, Shen WH. Cell Cycle Control by PTEN. *J Mol Biol.* 2017;429(15):2265-77.
83. Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leukemia Research.* 2001;25(7):571-6.
84. Todd JR, Scurr LL, Becker TM, Kefford RF, Rizos H. The MAPK pathway functions as a redundant survival signal that reinforces the PI3K cascade in c-Kit mutant melanoma. *Oncogene.* 2014;33(2):236-45.
85. Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells.* 2005;23(1):16-43.
86. Slipicevic A, Herlyn M. KIT in melanoma: many shades of gray. *J Invest Dermatol.* 2015;135(2):337-8.
87. Tzen C-Y. Characterization of KIT mutation in melanoma. *Dermatologica Sinica.* 2014;32(1):7-12.
88. Wang H, Boussouar A, Mazelin L, Tauszig-Delamasure S, Sun Y, Goldschneider D, et al. The Proto-oncogene c-Kit Inhibits Tumor Growth by Behaving as a Dependence Receptor. *Mol Cell.* 2018;72(3):413-25 e5.
89. Joyce KM. Surgical Management of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy.* Brisbane (AU)2017.
90. Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin Dermatol.* 2013;31(3):290-7.
91. Institute NC. Radiation Therapy to Treat Cancer [updated January 8, 2019. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>.

92. Cancer ROT. Benefits and Effectiveness 2017 [Available from: <https://www.targetingcancer.com.au/about-radiation-oncology/benefits-and-effectiveness/>].
93. Jin H-T, Ahmed R, Okazaki T. Role of PD-1 in Regulating T-Cell Immunity. In: Ahmed R, Honjo T, editors. Negative Co-Receptors and Ligands. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 17-37.
94. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
95. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018;131(1):58-67.
96. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol*. 2018;8:86.
97. Gilmartin AG, Bleam MR, Groy A, Moss KG, Minthorn EA, Kulkarni SG, et al. GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clin Cancer Res*. 2011;17(5):989-1000.
98. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 2012;367(2):107-14.
99. Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, MacLennan GT, Montironi R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Mod Pathol*. 2018;31(1):24-38.
100. Lorentzen HF. Targeted therapy for malignant melanoma. *Curr Opin Pharmacol*. 2019;46:116-21.
101. Manzano JL, Layos L, Buges C, de Los Llanos Gil M, Vila L, Martinez-Balibrea E, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med*. 2016;4(12):237.
102. Rukhlenko OS, Khorsand F, Krstic A, Rozanc J, Alexopoulos LG, Rauch N, et al. Dissecting RAF Inhibitor Resistance by Structure-based Modeling Reveals Ways to Overcome Oncogenic RAS Signaling. *Cell Syst*. 2018;7(2):161-79 e14.
103. Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*. 2011;480(7377):387-90.
104. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010;468(7326):973-7.
105. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*. 2010;468(7326):968-72.
106. Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol*. 2011;29(22):3085-96.
107. Shen CH, Kim SH, Trousil S, Frederick DT, Piris A, Yuan P, et al. Loss of cohesin complex components STAG2 or STAG3 confers resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Nat Med*. 2016;22(9):1056-61.

108. Xing F, Persaud Y, Pratilas CA, Taylor BS, Janakiraman M, She QB, et al. Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF. *Oncogene*. 2012;31(4):446-57.
109. Grzywa TM, Paskal W, Wlodarski PK. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Transl Oncol*. 2017;10(6):956-75.
110. Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun*. 2014;5:5712.
111. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med*. 2006;12(9):406-14.
112. Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, et al. Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell*. 2018;33(5):890-904 e5.
113. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):685-98.
114. Chang S, Yim S, Park H. The cancer driver genes IDH1/2, JARID1C/ KDM5C, and UTX/ KDM6A: crosstalk between histone demethylation and hypoxic reprogramming in cancer metabolism. *Exp Mol Med*. 2019;51(6):1-17.
115. Fischer GM, Vashisht Gopal YN, McQuade JL, Peng W, DeBerardinis RJ, Davies MA. Metabolic strategies of melanoma cells: Mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018;31(1):11-30.
116. Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen PH, Sullivan LB, Cheng T, et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*. 2011;481(7381):385-8.
117. Al-Khallaf H. Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: biochemical and molecular insight. *Cell Biosci*. 2017;7:37.
118. Scott DA, Richardson AD, Filipp FV, Knutzen CA, Chiang GG, Ronai ZA, et al. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. *J Biol Chem*. 2011;286(49):42626-34.
119. Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Sasajima Y, Yamazaki N. Mutant IDH1 confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation. *Am J Pathol*. 2011;178(3):1395-402.
120. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W. H. Freeman and CO.; 2002. xxxviii, 974, 72 p. p.
121. Zheng J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol Lett*. 2012;4(6):1151-7.
122. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:441-64.
123. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
124. Sun L, Suo C, Li ST, Zhang H, Gao P. Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: Beyond the Warburg Effect. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018;1870(1):51-66.
125. Abildgaard C, Guldborg P. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. *Trends Mol Med*. 2015;21(3):164-71.

126. Shimobayashi M, Hall MN. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):155-62.
127. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996;271(51):32529-37.
128. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006;3(3):177-85.
129. Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, et al. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1alpha under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol.* 2004;183(1):145-54.
130. De Ingeniis J, Ratnikov B, Richardson AD, Scott DA, Aza-Blanc P, De SK, et al. Functional specialization in proline biosynthesis of melanoma. *PLoS One.* 2012;7(9):e45190.
131. Ye Y, Wu Y, Wang J. Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 promotes cell proliferation via inhibiting apoptosis in human malignant melanoma. *Cancer Manag Res.* 2018;10:6399-407.
132. Ratnikov BI, Scott DA, Osterman AL, Smith JW, Ronai ZA. Metabolic rewiring in melanoma. *Oncogene.* 2017;36(2):147-57.
133. Sonveaux P, Vegrán F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(12):3930-42.
134. Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, Sanchez-Garcia FJ. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front Immunol.* 2016;7:52.
135. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghi A, Spandidos DA, McCubrey JA, et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol.* 2018;52(4):1071-80.
136. de la Cruz-Lopez KG, Castro-Munoz LJ, Reyes-Hernandez DO, Garcia-Carranca A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol.* 2019;9:1143.
137. Ohashi T, Aoki M, Tomita H, Akazawa T, Sato K, Kuze B, et al. M2-like macrophage polarization in high lactic acid-producing head and neck cancer. *Cancer Sci.* 2017;108(6):1128-34.
138. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004;18(3):385-405.
139. Sansbury BE, Spite M. Resolution of Acute Inflammation and the Role of Resolvins in Immunity, Thrombosis, and Vascular Biology. *Circ Res.* 2016;119(1):113-30.
140. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-7.
141. Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The Regulation of NF-kappaB Subunits by Phosphorylation. *Cells.* 2016;5(1).
142. Sun SC, Ley SC. New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol.* 2008;29(10):469-78.
143. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2.

144. Ueda Y, Richmond A. NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res.* 2006;19(2):112-24.
145. Owen KL, Brockwell NK, Parker BS. JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers (Basel).* 2019;11(12).
146. Liu S, Imani S, Deng Y, Pathak JL, Wen Q, Chen Y, et al. Targeting IFN/STAT1 Pathway as a Promising Strategy to Overcome Radioresistance. *Onco Targets Ther.* 2020;13:6037-50.
147. Morimoto Y, Kishida T, Kotani SI, Takayama K, Mazda O. Interferon-beta signal may up-regulate PD-L1 expression through IRF9-dependent and independent pathways in lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;507(1-4):330-6.
148. Wang Z, Ji J, Peng D, Ma F, Cheng G, Qin FX. Complex Regulation Pattern of IRF3 Activation Revealed by a Novel Dimerization Reporter System. *J Immunol.* 2016;196(10):4322-30.
149. Duguay D, Mercier F, Stagg J, Martineau D, Bramson J, Servant M, et al. In vivo interferon regulatory factor 3 tumor suppressor activity in B16 melanoma tumors. *Cancer Res.* 2002;62(18):5148-52.
150. Tian M, Wang X, Sun J, Lin W, Chen L, Liu S, et al. IRF3 prevents colorectal tumorigenesis via inhibiting the nuclear translocation of beta-catenin. *Nat Commun.* 2020;11(1):5762.
151. Chien Y, Kim S, Bumeister R, Loo YM, Kwon SW, Johnson CL, et al. RalB GTPase-mediated activation of the IkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell.* 2006;127(1):157-70.
152. Jones LM, Broz ML, Ranger JJ, Ozcelik J, Ahn R, Zuo D, et al. STAT3 Establishes an Immunosuppressive Microenvironment during the Early Stages of Breast Carcinogenesis to Promote Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res.* 2016;76(6):1416-28.
153. Yanai H, Negishi H, Taniguchi T. The IRF family of transcription factors: Inception, impact and implications in oncogenesis. *Oncoimmunology.* 2012;1(8):1376-86.
154. Teijaro JR. Type I interferons in viral control and immune regulation. *Curr Opin Virol.* 2016;16:31-40.
155. Robinson RL, Sharma A, Bai S, Heneidi S, Lee TJ, Kodeboyina SK, et al. Comparative STAT3-Regulated Gene Expression Profile in Renal Cell Carcinoma Subtypes. *Front Oncol.* 2019;9:72.
156. Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene.* 2000;19(21):2619-27.
157. Yanai H, Chiba S, Hangai S, Kometani K, Inoue A, Kimura Y, et al. Revisiting the role of IRF3 in inflammation and immunity by conditional and specifically targeted gene ablation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(20):5253-8.
158. Meissl K, Macho-Maschler S, Muller M, Strobl B. The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. *Cytokine.* 2017;89:12-20.
159. Khodarev NN, Roizman B, Weichselbaum RR. Molecular pathways: interferon/stat1 pathway: role in the tumor resistance to genotoxic stress and aggressive growth. *Clin Cancer Res.* 2012;18(11):3015-21.
160. Gouirand V, Guillaumond F, Vasseur S. Influence of the Tumor Microenvironment on Cancer Cells Metabolic Reprogramming. *Front Oncol.* 2018;8:117.

161. Wahl LM, Kleinman HK. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(21):1583-4.
162. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87-103.
163. Villanueva J, Herlyn M. Melanoma and the tumor microenvironment. *Curr Oncol Rep.* 2008;10(5):439-46.
164. Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(7):506-20.
165. Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, et al. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *Int J Cancer.* 2000;85(2):182-8.
166. Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(3):197-218.
167. Bonaventura P, Shekarian T, Alcazer V, Valladeau-Guilemond J, Valsesia-Wittmann S, Amigorena S, et al. Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10:168.
168. Duan Q, Zhang H, Zheng J, Zhang L. Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer.* 2020;6(7):605-18.
169. Moon YW, Hajjar J, Hwu P, Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer.* 2015;3:51.
170. Gao ZW, Dong K, Zhang HZ. The roles of CD73 in cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:460654.
171. Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rebe C. Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:473712.
172. Rosenbaum SR, Knecht M, Mollae M, Zhong Z, Erkes DA, McCue PA, et al. FOXD3 Regulates VISTA Expression in Melanoma. *Cell Rep.* 2020;30(2):510-24 e6.
173. Huang X, Zhang X, Li E, Zhang G, Wang X, Tang T, et al. VISTA: an immune regulatory protein checking tumor and immune cells in cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):83.
174. Le Mercier I, Chen W, Lines JL, Day M, Li J, Sergent P, et al. VISTA Regulates the Development of Protective Antitumor Immunity. *Cancer Res.* 2014;74(7):1933-44.
175. Zhang CX, Huang DJ, Baloche V, Zhang L, Xu JX, Li BW, et al. Galectin-9 promotes a suppressive microenvironment in human cancer by enhancing STING degradation. *Oncogenesis.* 2020;9(7):65.
176. Enninga EA, Nevala WK, Holtan SG, Leontovich AA, Markovic SN. Galectin-9 modulates immunity by promoting Th2/M2 differentiation and impacts survival in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 2016;26(5):429-41.
177. Yang R, Sun L, Li CF, Wang YH, Yao J, Li H, et al. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat Commun.* 2021;12(1):832.
178. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005;1(6):361-70.
179. Bost F, Kaminski L. The metabolic modulator PGC-1alpha in cancer. *Am J Cancer Res.* 2019;9(2):198-211.

180. Wallberg AE, Yamamura S, Malik S, Spiegelman BM, Roeder RG. Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha. *Mol Cell*. 2003;12(5):1137-49.
181. Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem*. 2002;277(3):1645-8.
182. Miller KN, Clark JP, Anderson RM. Mitochondrial regulator PGC-1a-Modulating the modulator. *Curr Opin Endocr Metab Res*. 2019;5:37-44.
183. Jones AW, Yao Z, Vicencio JM, Karkucinska-Wieckowska A, Szabadkai G. PGC-1 family coactivators and cell fate: roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria-nucleus signalling. *Mitochondrion*. 2012;12(1):86-99.
184. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1269-78.
185. Luo C, Widlund HR, Puigserver P. PGC-1 Coactivators: Shepherding the Mitochondrial Biogenesis of Tumors. *Trends Cancer*. 2016;2(10):619-31.
186. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem*. 2006;97(4):673-83.
187. Cam H, Balciunaite E, Blais A, Spektor A, Scarpulla RC, Young R, et al. A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell*. 2004;16(3):399-411.
188. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*. 2004;18(4):357-68.
189. Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J*. 2015;282(4):647-72.
190. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92(6):829-39.
191. Sonoda J, Mehl IR, Chong LW, Nofsinger RR, Evans RM. PGC-1beta controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):5223-8.
192. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*. 2006;30(4):145-51.
193. Eisele PS, Salatino S, Sobek J, Hottiger MO, Handschin C. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha/beta (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF-kappaB in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2013;288(4):2246-60.
194. Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman BM. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(26):10086-91.
195. Riehle C, Wende AR, Zaha VG, Pires KM, Waymont B, Olsen C, et al. PGC-1beta deficiency accelerates the transition to heart failure in pressure overload hypertrophy. *Circ Res*. 2011;109(7):783-93.
196. Martinez-Redondo V, Pettersson AT, Ruas JL. The hitchhiker's guide to PGC-1alpha isoform structure and biological functions. *Diabetologia*. 2015;58(9):1969-77.

197. Andersson U, Scarpulla RC. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2001;21(11):3738-49.
198. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem.* 2003;278(29):26597-603.
199. Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(12):7111-6.
200. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* 2001;413(6852):179-83.
201. Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, et al. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell.* 2005;120(2):261-73.
202. Rius-Perez S, Torres-Cuevas I, Millan I, Ortega AL, Perez S. PGC-1alpha, Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:1452696.
203. Shoag J, Haq R, Zhang M, Liu L, Rowe GC, Jiang A, et al. PGC-1 coactivators regulate MITF and the tanning response. *Mol Cell.* 2013;49(1):145-57.
204. Luo X, Liao C, Quan J, Cheng C, Zhao X, Bode AM, et al. Posttranslational regulation of PGC-1alpha and its implication in cancer metabolism. *Int J Cancer.* 2019;145(6):1475-83.
205. Kelly TJ, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Puigserver P. GCN5-mediated transcriptional control of the metabolic coactivator PGC-1beta through lysine acetylation. *J Biol Chem.* 2009;284(30):19945-52.
206. Sharabi K, Lin H, Tavares CDJ, Dominy JE, Camporez JP, Perry RJ, et al. Selective Chemical Inhibition of PGC-1alpha Gluconeogenic Activity Ameliorates Type 2 Diabetes. *Cell.* 2017;169(1):148-60 e15.
207. Besseiche A, Riveline JP, Gautier JF, Breant B, Blondeau B. Metabolic roles of PGC-1alpha and its implications for type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2015;41(5):347-57.
208. Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature.* 2007;447(7147):1012-6.
209. Tabata M, Rodgers JT, Hall JA, Lee Y, Jedrychowski MP, Gygi SP, et al. Cdc2-like kinase 2 suppresses hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis through disruption of the PGC-1alpha and MED1 complex. *Diabetes.* 2014;63(5):1519-32.
210. Jorgensen SB, Wojtaszewski JF, Viollet B, Andreelli F, Birk JB, Hellsten Y, et al. Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J.* 2005;19(9):1146-8.
211. Frier BC, Wan Z, Williams DB, Stefanson AL, Wright DC. Epinephrine and AICAR-induced PGC-1alpha mRNA expression is intact in skeletal muscle from rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;302(12):C1772-9.
212. Terada S, Tabata I. Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1alpha protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286(2):E208-16.

213. Wenz T, Wang X, Marini M, Moraes CT. A metabolic shift induced by a PPAR panagonist markedly reduces the effects of pathogenic mitochondrial tRNA mutations. *J Cell Mol Med.* 2011;15(11):2317-25.
214. Aatsinki SM, Buler M, Salomaki H, Koulu M, Pavek P, Hakkola J. Metformin induces PGC-1alpha expression and selectively affects hepatic PGC-1alpha functions. *Br J Pharmacol.* 2014;171(9):2351-63.
215. Adamovich Y, Shlomai A, Tsvetkov P, Umansky KB, Reuven N, Estall JL, et al. The protein level of PGC-1alpha, a key metabolic regulator, is controlled by NADH-NQO1. *Mol Cell Biol.* 2013;33(13):2603-13.
216. Pettersson-Klein AT, Izadi M, Ferreira DMS, Cervenka I, Correia JC, Martinez-Redondo V, et al. Small molecule PGC-1alpha1 protein stabilizers induce adipocyte Ucp1 expression and uncoupled mitochondrial respiration. *Mol Metab.* 2018;9:28-42.
217. Maekawa H, Inoue T, Ouchi H, Jao TM, Inoue R, Nishi H, et al. Mitochondrial Damage Causes Inflammation via cGAS-STING Signaling in Acute Kidney Injury. *Cell Rep.* 2019;29(5):1261-73 e6.
218. Riley JS, Tait SW. Mitochondrial DNA in inflammation and immunity. *EMBO Rep.* 2020;21(4):e49799.
219. Benci JL, Xu B, Qiu Y, Wu TJ, Dada H, Twyman-Saint Victor C, et al. Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell.* 2016;167(6):1540-54 e12.
220. Lopez-Armada MJ, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-Garcia C, Valcarcel-Ares MN. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion.* 2013;13(2):106-18.
221. Lv H, Lv G, Chen C, Zong Q, Jiang G, Ye D, et al. NAD(+) Metabolism Maintains Inducible PD-L1 Expression to Drive Tumor Immune Evasion. *Cell Metab.* 2021;33(1):110-27 e5.
222. Cha JH, Chan LC, Li CW, Hsu JL, Hung MC. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol Cell.* 2019;76(3):359-70.
223. Antonangeli F, Natalini A, Garassino MC, Sica A, Santoni A, Di Rosa F. Regulation of PD-L1 Expression by NF-kappaB in Cancer. *Front Immunol.* 2020;11:584626.
224. Alvarez-Guardia D, Palomer X, Coll T, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, et al. The p65 subunit of NF-kappaB binds to PGC-1alpha, linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovasc Res.* 2010;87(3):449-58.
225. Palomer X, Alvarez-Guardia D, Rodriguez-Calvo R, Coll T, Laguna JC, Davidson MM, et al. TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc Res.* 2009;81(4):703-12.
226. Remels AH, Gosker HR, Bakker J, Guttridge DC, Schols AM, Langen RC. Regulation of skeletal muscle oxidative phenotype by classical NF-kappaB signalling. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(8):1313-25.
227. Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):748-59.
228. Chinenov Y, Gupte R, Rogatsky I. Nuclear receptors in inflammation control: repression by GR and beyond. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;380(1-2):55-64.

229. Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, Zhang L, Smith KL, Morel CR, et al. Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab.* 2006;4(1):13-24.
230. Summer R, Shaghghi H, Schriener D, Roque W, Sales D, Cuevas-Mora K, et al. Activation of the mTORC1/PGC-1 axis promotes mitochondrial biogenesis and induces cellular senescence in the lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2019;316(6):L1049-L60.
231. Bhalla K, Hwang BJ, Dewi RE, Ou L, Twaddel W, Fang HB, et al. PGC1 α promotes tumor growth by inducing gene expression programs supporting lipogenesis. *Cancer Res.* 2011;71(21):6888-98.
232. LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, et al. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol.* 2014;16(10):992-1003, 1-15.
233. Vazquez F, Lim JH, Chim H, Bhalla K, Girnun G, Pierce K, et al. PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell.* 2013;23(3):287-301.
234. Luo C, Lim JH, Lee Y, Granter SR, Thomas A, Vazquez F, et al. A PGC1 α -mediated transcriptional axis suppresses melanoma metastasis. *Nature.* 2016;537(7620):422-6.
235. Ahn A, Chatterjee A, Eccles MR. The Slow Cycling Phenotype: A Growing Problem for Treatment Resistance in Melanoma. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(6):1002-9.
236. Massi D, Mihic-Probst D, Schadendorf D, Dummer R, Mandala M. Dedifferentiated melanomas: Morpho-phenotypic profile, genetic reprogramming and clinical implications. *Cancer Treat Rev.* 2020;88:102060.
237. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 2016;23(1):27-47.
238. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
239. Michielin O, Atkins MB, Koon HB, Dummer R, Ascierto PA. Evolving impact of long-term survival results on metastatic melanoma treatment. *J Immunother Cancer.* 2020;8(2).
240. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015;372(4):320-30.
241. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(11):651-68.
242. Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Cowey CL, et al. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018;19(11):1480-92.
243. Liu D, Schilling B, Liu D, Sucker A, Livingstone E, Jerby-Arnon L, et al. Integrative molecular and clinical modeling of clinical outcomes to PD1 blockade in patients with metastatic melanoma. *Nat Med.* 2019;25(12):1916-27.
244. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(3):133-50.

245. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* 2018;8(9):1069-86.
246. Sun Z, Fourcade J, Pagliano O, Chauvin JM, Sander C, Kirkwood JM, et al. IL10 and PD-1 Cooperate to Limit the Activity of Tumor-Specific CD8+ T Cells. *Cancer Res.* 2015;75(8):1635-44.
247. Gunderson AJ, Yamazaki T, McCarty K, Fox N, Phillips M, Alice A, et al. TGFbeta suppresses CD8(+) T cell expression of CXCR3 and tumor trafficking. *Nat Commun.* 2020;11(1):1749.
248. Cerezo M, Rocchi S. Cancer cell metabolic reprogramming: a keystone for the response to immunotherapy. *Cell Death Dis.* 2020;11(11):964.
249. Cascone T, McKenzie JA, Mbofung RM, Punt S, Wang Z, Xu C, et al. Increased Tumor Glycolysis Characterizes Immune Resistance to Adoptive T Cell Therapy. *Cell Metab.* 2018;27(5):977-87 e4.
250. Calcinotto A, Filipazzi P, Grioni M, Iero M, De Milito A, Ricupito A, et al. Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res.* 2012;72(11):2746-56.
251. Roh M, Wainwright DA, Wu JD, Wan Y, Zhang B. Targeting CD73 to augment cancer immunotherapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2020;53:66-76.
252. Ruocco MR, Avagliano A, Granato G, Vigliar E, Masone S, Montagnani S, et al. Metabolic flexibility in melanoma: A potential therapeutic target. *Semin Cancer Biol.* 2019;59:187-207.
253. Smith LK, Rao AD, McArthur GA. Targeting metabolic reprogramming as a potential therapeutic strategy in melanoma. *Pharmacol Res.* 2016;107:42-7.
254. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 2006;127(2):397-408.
255. Gravel SP. Deciphering the Dichotomous Effects of PGC-1alpha on Tumorigenesis and Metastasis. *Front Oncol.* 2018;8:75.
256. Cancer Genome Atlas N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell.* 2015;161(7):1681-96.
257. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401-4.
258. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):p11.
259. Ghandi M, Huang FW, Jane-Valbuena J, Kryukov GV, Lo CC, McDonald ER, 3rd, et al. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature.* 2019;569(7757):503-8.
260. Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D1251-7.
261. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.
262. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, Graham CH. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res.* 2014;74(3):665-74.

263. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med*. 2014;211(5):781-90.
264. Betzler AC, Theodoraki MN, Schuler PJ, Doscher J, Laban S, Hoffmann TK, et al. NF- κ B and Its Role in Checkpoint Control. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11).
265. Wang W, Chapman NM, Zhang B, Li M, Fan M, Laribee RN, et al. Upregulation of PD-L1 via HMGB1-Activated IRF3 and NF- κ B Contributes to UV Radiation-Induced Immune Suppression. *Cancer Res*. 2019;79(11):2909-22.
266. Wellenstein MD, de Visser KE. Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. *Immunity*. 2018;48(3):399-416.
267. Harel M, Ortenberg R, Varanasi SK, Mangalhara KC, Mardamshina M, Markovits E, et al. Proteomics of Melanoma Response to Immunotherapy Reveals Mitochondrial Dependence. *Cell*. 2019;179(1):236-50 e18.
268. Szczesny B, Marcatti M, Ahmad A, Montalbano M, Brunyanski A, Bibli SI, et al. Mitochondrial DNA damage and subsequent activation of Z-DNA binding protein 1 links oxidative stress to inflammation in epithelial cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):914.
269. Hu M, Zhou M, Bao X, Pan D, Jiao M, Liu X, et al. ATM inhibition enhances cancer immunotherapy by promoting mtDNA leakage and cGAS/STING activation. *J Clin Invest*. 2021;131(3).
270. Tigano M, Vargas DC, Tremblay-Belzile S, Fu Y, Sfeir A. Nuclear sensing of breaks in mitochondrial DNA enhances immune surveillance. *Nature*. 2021;591(7850):477-81.
271. Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pae HO. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct*. 2011;2011:792639.
272. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. 2011;21(1):103-15.
273. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*. 2004;23(12):2369-80.
274. Rothgiesser KM, Erener S, Waibel S, Luscher B, Hottiger MO. SIRT2 regulates NF- κ B dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 24):4251-8.
275. Yuk JM, Kim TS, Kim SY, Lee HM, Han J, Dufour CR, et al. Orphan Nuclear Receptor ERR α Controls Macrophage Metabolic Signaling and A20 Expression to Negatively Regulate TLR-Induced Inflammation. *Immunity*. 2015;43(1):80-91.
276. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*. 2013;496(7444):238-42.
277. Yogev O, Yogev O, Singer E, Shaulian E, Goldberg M, Fox TD, et al. Fumarate: a mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the DNA damage response. *PLoS Biol*. 2010;8(3):e1000328.
278. Martinez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*. 2020;11(1):102.

279. Zhang G, Frederick DT, Wu L, Wei Z, Krepler C, Srinivasan S, et al. Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *J Clin Invest.* 2016;126(5):1834-56.
280. Chen H, Liu Y, Li D, Song J, Xia M. PGC-1beta suppresses saturated fatty acid-induced macrophage inflammation by inhibiting TAK1 activation. *IUBMB Life.* 2016;68(2):145-55.
281. Eisele PS, Furrer R, Beer M, Handschin C. The PGC-1 coactivators promote an anti-inflammatory environment in skeletal muscle in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;464(3):692-7.
282. Sczelecki S, Besse-Patin A, Abboud A, Kleiner S, Laznik-Bogoslavski D, Wrann CD, et al. Loss of Pgc-1alpha expression in aging mouse muscle potentiates glucose intolerance and systemic inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(2):E157-67.
283. Zhou JJ, Ma JD, Mo YQ, Zheng DH, Chen LF, Wei XN, et al. Down-regulating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 beta alleviates the proinflammatory effect of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through inhibiting extracellular signal-regulated kinase, p38 and nuclear factor-kappaB activation. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(5):472.
284. Lu H, Zhu L, Lian L, Chen M, Shi D, Wang K. PGC-1alpha regulates the expression and activity of IRF-1. *IUBMB Life.* 2015;67(4):300-5.
285. He X, Ma S, Tian Y, Wei C, Zhu Y, Li F, et al. ERRalpha negatively regulates type I interferon induction by inhibiting TBK1-IRF3 interaction. *PLoS Pathog.* 2017;13(6):e1006347.
286. Wu PK, Hong SK, Veeranki S, Karkhanis M, Starenki D, Plaza JA, et al. A mortalin/HSPA9-mediated switch in tumor-suppressive signaling of Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase. *Mol Cell Biol.* 2013;33(20):4051-67.
287. Almajian ER, Richter R, Paeger L, Martinelli P, Barth E, Decker T, et al. AFG3L2 supports mitochondrial protein synthesis and Purkinje cell survival. *J Clin Invest.* 2012;122(11):4048-58.
288. Kuske M, Westphal D, Wehner R, Schmitz M, Beissert S, Praetorius C, et al. Immunomodulatory effects of BRAF and MEK inhibitors: Implications for Melanoma therapy. *Pharmacol Res.* 2018;136:151-9.
289. Ribas A, Lawrence D, Atkinson V, Agarwal S, Miller WH, Jr., Carlino MS, et al. Combined BRAF and MEK inhibition with PD-1 blockade immunotherapy in BRAF-mutant melanoma. *Nat Med.* 2019;25(6):936-40.
290. Clark K, Peggie M, Plater L, Sorcek RJ, Young ER, Madwed JB, et al. Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity. *Biochem J.* 2011;434(1):93-104.
291. Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM, et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity.* 2008;29(4):565-77.
292. Weichhart T, Hengstschlager M, Linke M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(10):599-614.
293. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature.* 2007;450(7170):736-40.

294. Morita M, Gravel SP, Chenard V, Sikstrom K, Zheng L, Alain T, et al. mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab.* 2013;18(5):698-711.
295. Guo C, Sun L, Chen X, Zhang D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2013;8(21):2003-14.
296. Cali B, Molon B, Viola A. Tuning cancer fate: the unremitting role of host immunity. *Open Biol.* 2017;7(4).
297. Yun CO, Bhargava P, Na Y, Lee JS, Ryu J, Kaul SC, et al. Relevance of mortalin to cancer cell stemness and cancer therapy. *Sci Rep.* 2017;7:42016.
298. Neagu M, Constantin C, Caruntu C, Dumitru C, Surcel M, Zurac S. Inflammation: A key process in skin tumorigenesis. *Oncol Lett.* 2019;17(5):4068-84.
299. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2018;9(6):7204-18.
300. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
301. Li L, Yu R, Cai T, Chen Z, Lan M, Zou T, et al. Effects of immune cells and cytokines on inflammation and immunosuppression in the tumor microenvironment. *Int Immunopharmacol.* 2020;88:106939.
302. Esquivel-Velazquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J. The role of cytokines in breast cancer development and progression. *J Interferon Cytokine Res.* 2015;35(1):1-16.
303. Mumm JB, Oft M. Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. *Oncogene.* 2008;27(45):5913-9.
304. Martin M, Wei H, Lu T. Targeting microenvironment in cancer therapeutics. *Oncotarget.* 2016;7(32):52575-83.
305. Kuklinski LF, Yan S, Li Z, Fisher JL, Cheng C, Noelle RJ, et al. VISTA expression on tumor-infiltrating inflammatory cells in primary cutaneous melanoma correlates with poor disease-specific survival. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(7):1113-21.
306. Passarelli A, Tucci M, Mannavola F, Felici C, Silvestris F. The metabolic milieu in melanoma: Role of immune suppression by CD73/adenosine. *Tumour Biol.* 2019;42(4):1010428319837138.
307. Mahmoud F, Shields B, Makhoul I, Avaritt N, Wong HK, Hutchins LF, et al. Immune surveillance in melanoma: From immune attack to melanoma escape and even counterattack. *Cancer Biol Ther.* 2017;18(7):451-69.
308. Tucci M, Passarelli A, Mannavola F, Felici C, Stucci LS, Cives M, et al. Immune System Evasion as Hallmark of Melanoma Progression: The Role of Dendritic Cells. *Front Oncol.* 2019;9:1148.
309. Polak ME, Borthwick NJ, Gabriel FG, Johnson P, Higgins B, Hurren J, et al. Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer.* 2007;96(12):1879-87.
310. Soyol S, Krempler F, Oberkofler H, Patsch W. PGC-1alpha: a potent transcriptional cofactor involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2006;49(7):1477-88.
311. Wu H, Deng X, Shi Y, Su Y, Wei J, Duan H. PGC-1alpha, glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol.* 2016;229(3):R99-R115.

312. Tan Z, Luo X, Xiao L, Tang M, Bode AM, Dong Z, et al. The Role of PGC1alpha in Cancer Metabolism and its Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(5):774-82.
313. Lim JH, Luo C, Vazquez F, Puigserver P. Targeting mitochondrial oxidative metabolism in melanoma causes metabolic compensation through glucose and glutamine utilization. *Cancer Res.* 2014;74(13):3535-45.
314. Zhu J, Zeng Y, Li W, Qin H, Lei Z, Shen D, et al. CD73/NT5E is a target of miR-30a-5p and plays an important role in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *Mol Cancer.* 2017;16(1):34.