

Université de Montréal

Étude du rôle de PGC-1 β dans l'inflammation, l'immunosuppression et la réponse au stress cellulaire; implication dans le traitement du mélanome

Par
Katherine Coutu-Beaudry

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc)
En sciences pharmaceutiques
Option pharmacologie

Mars 2022

© Katherine Coutu-Beaudry, 2022

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**Étude du rôle de PGC-1 β dans l'inflammation, l'immunosuppression et la réponse
au stress cellulaire; implication dans le traitement du mélanome**

Présenté par
Katherine Coutu-Beaudry

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marc Servant
Président-rapporteur

Simon-Pierre Gravel
Directeur de recherche

Stéphane Richard
Membre du jury

Résumé

Le mélanome est caractérisé par un remodelage métabolique important, participant à la métastase et à la résistance aux traitements. Les coactivateurs 1 du récepteur activé par le proliférateur du peroxisome (PPAR γ), ou PGC-1s, constituent une famille de coactivateurs qui potentialisent la transcription de gènes du métabolisme et de la biogenèse mitochondriale, participant ainsi à la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses. Les différents cancers de la peau expriment des niveaux variables de PGC-1s et les tumeurs qui expriment fortement les PGC-1s présentent un profil pro-inflammatoire et immunosuppresseur favorisant l'évasion immunitaire. Ceci suggère un rôle des PGC-1s dans la réponse à l'immunothérapie. Nous montrons d'abord que la déplétion en PGC-1 β diminue la prolifération de lignées cellulaires de mélanome en plus d'induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de transcrits immunosuppresseurs. À ce jour, les mécanismes permettant de réguler l'expression et l'activité des PGC-1s demeurent inconnus. Nous montrons que différents stress cellulaires affectant des procédés métaboliques, épigénétiques ou la traduction diminuent l'expression des PGC-1s et la viabilité de lignées cellulaires de mélanome. Nous montrons également un mécanisme de régulation de PGC-1 β par une protéine de liaison à l'ARN soutenant le rôle de PGC-1 β dans la réponse à différents stress et la survie des cellules de mélanome. Cette régulation serait importante pour l'immunosuppression du mélanome et dicterait la réponse à l'immunothérapie. En conclusion, ces travaux illustrent bien le rôle de PGC-1 β dans la reprogrammation métabolique et la réponse au stress du mélanome, ces processus pouvant influencer l'inflammation et l'immunosuppression du microenvironnement afin d'assurer la progression tumorale.

Mots clés : mélanome, mitochondrie, métabolisme, inflammation, microenvironnement, stress cellulaires, métastase, résistance, immunosuppression, transcription

Abstract

Melanoma is characterized by a significant metabolic remodeling, which contributes to metastasis and treatment resistance. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) coactivators 1, or PGC-1s, are a family of coactivators that potentiate the transcription of genes involved in metabolism and mitochondrial biogenesis, thus participating in the metabolic reprogramming of cancer cells. Different skin cancers express varying levels of PGC-1s and tumors that strongly express PGC-1s exhibit a proinflammatory and immunosuppressive profile that favors immune evasion. This suggests that PGC-1s play a role in melanoma response to immunotherapy. We first show that PGC-1 β knockdown decreases the proliferation of melanoma cell lines. Moreover, it induces the expression of proinflammatory cytokines and immunosuppressive transcripts. To date, the mechanisms that regulate the expression and activity of PGC-1s remain unknown. We show that different cellular stresses affecting metabolic and epigenetic processes or translation decrease PGC-1s expression and the viability of melanoma cell lines. We also show a mechanism of regulation of PGC-1 β by an RNA-binding protein enhancing the role of PGC-1 β in the response to different stresses and the survival of melanoma cells. This regulation could contribute to melanoma immunosuppression and determine the tumor's response to immunotherapy. In conclusion, this work illustrates well the role of PGC-1 β in melanoma metabolic reprogramming and stress response, processes that regulate inflammation and create an immunosuppressive tumor microenvironment in order to ensure tumor progression.

Key Words: melanoma, mitochondria, metabolism, inflammation, microenvironment, cellular stress, metastasis, resistance, immunosuppression, transcription

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Liste des abréviations	ix
Remerciements	xvi
Chapitre 1 : Introduction	2
1.1. Organisation de la peau	2
1.1.1. Description des différentes couches cutanées.....	2
1.1.2. Le mélanocyte.....	6
1.1.2.1. Origine du mélanocyte.....	6
1.1.2.2. Localisation et fonction.....	7
1.2. Particularités des différentes formes de cancer de la peau non mélanocytaire	8
1.2.1. Carcinomes basocellulaires.....	8
1.2.2. Les carcinomes spinocellulaires.....	10
1.3. Pathophysiologie du mélanome	11
1.3.1. Incidence.....	11
1.3.2. Facteurs de risques.....	12
1.3.3. Transition du mélanocyte vers un mélanome.....	15
1.3.4. Description des différents stades du mélanome.....	17
1.3.5. Signalisation des MAPK.....	19
1.3.6. Mutations fréquemment observées dans le mélanome.....	24
1.3.7. Traitements actuels du mélanome.....	26
1.3.7.1. Chimiothérapie.....	26
1.3.7.2. Thérapies ciblées.....	28
1.3.7.3. Immunothérapie.....	33
1.3.8. Défis du traitement du mélanome.....	36
1.3.8.1. Détection précoce.....	36
1.3.8.2. Métastase.....	36
1.3.8.3. Résistance aux traitements.....	37
1.3.9. Hétérogénéité du mélanome.....	38
1.4. Reprogrammation métabolique dans le mélanome	39
1.4.1. Remodelage métabolique et effet Warburg.....	39
1.4.2. Stress issu du microenvironnement modifiant le métabolisme.....	43
1.4.2.1. Les fibroblastes associés au cancer.....	43
1.4.2.2. L'hypoxie.....	44
1.4.2.3. Déprivation de nutriments.....	45
1.4.3. Stress du RE et réponse UPR.....	46
1.4.3.1. Activation et signalisation.....	46
1.4.3.2. Double rôle du stress du RE dans la survie et la mort cellulaire.....	47
1.5. Immunité du mélanome	50

1.5.1.	Polarisation des tumeurs chaudes ou froides et impact du TME	51
1.5.2.	Immunoédition du cancer et son interaction avec le microenvironnement	54
1.5.3.	Rôle de l'inflammation dans le mélanome	55
1.6.	Description des principales voies métaboliques des cellules cancéreuses.....	59
1.7.	Rôle de la mitochondrie dans la réponse immunitaire.....	63
1.8.	La famille des coactivateurs 1 du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (PGC-1s).....	64
1.8.1.	Découverte des PGC-1s	64
1.8.2.	Structure et domaines des PGC-1s	66
1.8.3.	Facteurs de transcription et récepteurs nucléaires interagissant avec les PGC-1s	67
1.8.4.	Fonctions des PGC-1s	68
1.8.4.1.	Biogenèse mitochondriale	68
1.8.4.2.	Régulation du métabolisme	69
1.8.4.3.	Mécanisme de production de ROS par la mitochondrie	71
1.8.4.4.	Implication de PGC-1 α dans la gestion du stress oxydatif	73
1.8.4.5.	Réponse inflammatoire.....	75
1.8.5.	Régulation post-traductionnelle des PGC-1s	76
1.8.5.1.	Phosphorylation par AMPK	76
1.8.5.2.	SUMOylation et ubiquitination	77
1.8.5.3.	Désacétylation par les Sirtuines	78
1.8.6.	Régulation par le microenvironnement	79
1.8.7.	Rôle de PGC-1 α dans le cancer	83
1.8.8.	Composés modulant l'expression des PGC-1s.....	83
1.9.	Hypothèse et objectifs de recherche	86
Chapitre II : Articles scientifiques		90
2.1.	Préambule	90
2.2.	Article #1: PGC-1β and mitochondrial biogenesis control MEK and IRF1-dependent pro-inflammatory and immunosuppressive gene expression	92
2.2.1.	Abstract	94
2.2.2.	Introduction.....	95
2.2.3.	Materials and methods	97
2.2.4.	Results	104
2.2.5.	Discussion	108
2.2.6.	Figure legends	112
2.3.	Article #2: LARP1 is regulated by endoplasmic reticulum stress and exerts immunometabolic functions in melanoma.....	128
2.3.1.	Abstract	130
2.3.2.	Introduction.....	131
2.3.3.	Materials and methods	133
2.3.4.	Results	144
2.3.5.	Discussion	150
2.3.6.	Figure legends	154
Chapitre III : Discussion		166
Conclusion		191
Références :		193

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de Fitzpatrick pour les différents types de peaux et risque associé de développer un mélanome

Tableau 2 : Description des différents stades de progression du mélanome

Liste des figures

- Figure 1 : Description des différentes couches cutanées et des structures qui les composent
- Figure 2 : Description des différents stades de progression du mélanome.
- Figure 3 : Signalisation des MAPK
- Figure 4 : Mutations les plus communes de la signalisation des MAPK dans le mélanome et thérapies ciblant les récepteurs ou protéines constitutivement activées
- Figure 5 : Dualité entre la glycolyse et un métabolisme oxydatif dans la reprogrammation métabolique du mélanome
- Figure 6 : Voies métaboliques principales soutenant la synthèse de pyruvate et la production mitochondriale d'ATP
- Figure 7 : Domaines fonctionnels des PGC-1s
- Figure 8 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques pouvant réguler l'expression et l'activité des PGC-1s
- Figure 9 : Low expression of mitochondrial biogenesis factors in human melanoma tumors is associated with increased expression of pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts.
- Figure 10 : Low expression of mitochondrial biogenesis factors in human melanoma cell lines is associated with increased expression of pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts

- Figure 11 : PGC-1 β knockdown induces an immunosuppressive and pro-inflammatory gene expression program in human melanoma cells
- Figure 12 : PGC-1 β knockdown has growth suppressive effects in human melanoma cell lines
- Figure 13 : The mitochondrial protein HSPA9 mediates part of the immunometabolic effects associated with PGC-1 β depletion in human melanoma cells
- Figure 14 : Identification of kinases that mediate the immune response associated with PGC-1 β depletion in melanoma cells
- Figure 15 : Identification of transcription factors that mediate the immune response associated with PGC-1 β depletion in melanoma cells
- Figure 16 : Model of the immunometabolic switch in melanoma
- Figure 17 : The expression of PGC-1s transcripts correlates with multiple stress response pathways in human cutaneous melanoma
- Figure 18 : Endoplasmic reticulum stress represses the expression of PGC-1s in melanoma cell lines
- Figure 19 : LARP1 expression is altered by endoplasmic reticulum stress in melanoma
- Figure 20 : LARP1 expression level is linked to a mitochondrial immunometabolic switch in human and murine melanoma
- Figure 21: LARP1 knockdown impacts on mitochondrial respiration and innate immune transcriptional response in melanoma cell lines

Figure 22 : LARP1 ectopic expression provides minor advantages in melanoma cells under stressful conditons

Liste des abréviations

2-DG :	2-Deoxy-D-Glucose
4EBP1 :	Protéine 1 se liant au facteur 4E d'initiation de la traduction
Acc :	Acétyl-CoA carboxylase
AcCoA :	Acétyl-coenzyme A
ACD:	Homologue de la protéine de la dysplasie adrénocorticale
ADP :	Adénosine diphosphate
α -KG :	Alpha cétooglutarate
AK :	Kératose actinique
Akt :	Protéine kinase B
AMP :	Adénosine monophosphate
AMPK :	Protéine kinase dépendante de l'AMP
APC :	Cellules présentatrices d'antigènes
APR-2 :	Apoptosis related protein
ARN :	Acide ribonucléique
Arg :	Arginase
ARNm :	ARN messenger
ARNT :	Récepteur nucléaire du récepteur des hydrocarbures aromatiques
ASK1 :	Kinase 1 de régulation de signaux apoptotiques
ATF2 :	Facteur de transcription activant 2
ATP :	Adénosine triphosphate
BAP1:	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase
BATF3 :	Facteur de transcription à glissière à leucine apparenté à ATF3
BER :	Réparation par excision de base (BER)
CAC :	Cycle de l'acide citrique
CaMKII :	Kinase II dépendante de Ca^{2+} /calmoduline
CBC :	Carcinome basocellulaire
CBP/p300 :	Protéine de liaison à CREB
CDK4:	Kinase dépendante des cyclines 4
CDKN2A:	Inhibiteur de kinase cycline dépendante 2A

CHOP :	Protéine homologue aux protéines liant les séquences stimulatrices de type CAAT
CIDEA :	Effecteur A induisant la mort cellulaire de type DFFA (facteur de fragmentation de l'ADN)
CK1 :	Caséine kinase 1
CLK2 :	Kinase Cdc2-like
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CO ₂ :	dioxyde de carbone
CoQ :	Ubiquinone (Coenzyme Q)
COX :	Cyclooxygénases
CREB :	Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMP cyclique
CSP :	Carcinome spinocellulaire
DAMP :	Motif moléculaire associé aux danger
DCT :	Dopachrome tautomérase
DRP-1 :	Protéine 1 apparentée à la dynamine
<i>DUX</i> :	<i>Double Homebox</i>
ECSIT :	Intermédiaire de la signalisation Toll conservé au cours de l'évolution (ECSIT).
eEF2K :	Facteur d'élongation eucaryote 2K
EGFR :	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ER α :	Récepteur alpha des œstrogènes
ERK :	Kinase régulée par des signaux extracellulaires
ERR α :	Récepteur alpha lié aux œstrogènes
ETC :	Chaine de transport des électrons
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FADH ₂ :	Forme réduite de la flavine adénine dinucléotide
FAS :	Acide gras synthase
FOXO1 :	Facteur de transcription Forkhead de type O1
FT :	Farnésyltransférase
FXR :	Récepteur farnésoïde X
Gcl :	Ligase glutamate-cystéine
G6P :	Glucose-6-phosphate
G6Pase :	Glucose-6-phosphatase

GLUT1 :	Transporteur de glucose de classe 1
GNAQ :	Sous-unité alpha de la protéine de liaison de la guanine (Gq)
GPCR :	Récepteur couplé aux protéines G
GVHD :	Maladie du greffon contre l'hôte
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HAT :	Histone acétyltransférase
HGF :	Facteur de croissance des hépatocytes
HIF :	Facteur induit par l'hypoxie
HIF-1 α :	Facteur 1-alpha induit par l'hypoxie
HK :	Hexokinase
HMB :	Anticorps 45 marqueur du mélanome
HMGB1 :	Groupe de haute mobilité 1
HNF4 α :	Facteur nucléaire hépatocytaire 4
HSP :	Protéines de choc thermique
IDO :	Idoleamine 2,3-désoxygénase
IGF-1 :	Facteur de croissance analogue à l'insuline
IGF1R :	Récepteur du facteur de croissance analogue à l'insuline de type 1
I κ B :	Inhibiteur de NF κ B
IKK :	Complexe de la kinase I κ B
IKK- α :	Sous-unité alpha de l'inhibiteur de la kinase du facteur nucléaire kappa-B
IKK- β :	Sous-unité beta de l'inhibiteur de la kinase du facteur nucléaire kappa-B
IKK- β :	Sous-unité beta du facteur nucléaire kappa-B
INF γ :	Interféron gamma
IRF3 :	Facteur 3 de régulation de l'interféron
LDH :	Lactate déshydrogénase
LDHA :	Lactate déshydrogénase A
LPS :	Lipopolysaccharides
LXRs :	Récepteur des oxystérols
MAGE :	<i>Melanoma associated antigen</i>)
MART-1:	<i>Melanoma-associated antigen recognized by T cells</i>
MAPK :	Protéines kinases activées par les mitogènes

MCP :	Facteurs chimio-attracteurs des monocytes
MDSC :	Cellules myéloïdes suppressives
MEF2 :	Facteur 2 de stimulation des myocytes MEF2
MEK:	Kinase activée par un mitogène
Mgl :	Lectines galectines de type C des macrophages
mm :	Millimètre
MITF :	Facteur de transcription associé à la microphthalmie
MLANA :	Antigène de mélanome reconnu par les lymphocytes T
MMP :	Métalloprotéinases matricielles
mTOR :	Cible fonctionnelle de la rapamycine
mTORC1 :	Cible du complexe rapamycine 1 chez le mammifère
mTORC2 :	Cible du complexe rapamycine 2 chez le mammifère
NAC :	N-acétyl-L-cystéine
NAD ⁺ :	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase
NAMPT :	Nicotinamide phosphoribosyltransférase
NEMO :	Régulateur essentiel de NF- κ B
NER :	Réparation par excision de nucléotides
NF- κ B :	Facteur de transcription nucléaire κ B
NK :	Cellules tueuses naturelles
NLR :	Récepteurs de type NOD
NLRP3 :	Cryopyrine
NO :	Oxyde nitrique
NOS :	Oxyde nitrique synthase
Nox :	NADPH oxydase
NOX2 :	Isoforme 2 de la NADPH oxydase
NRFs :	Facteurs de respiration nucléaire
NRF-1 :	Facteur 1 de respiration nucléaire
O ₂ ⁻ :	Ions superoxydes
OGG1 :	Glycosylase 1 de l'oxoguanine 8 de l'ADN

PAMP :	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PARP :	Poly(ADP-ribose) polymérase
PD-1 :	Protéine 1 de mort cellulaire programmée
PDH :	Pyruvate déshydrogénase
PD-L1 :	Ligand de mort cellulaire programmée de type 1
PDK :	Pyruvate déshydrogénase kinase
PEPCK :	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFK1 :	Phosphofructokinase 1
PGC-1 :	Coactivateurs 1 du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes
PGE2 :	Prostaglandine 2
PIP2 :	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2)
PIP3 :	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3)
PK :	Pyruvate kinase
PKA :	Protéine kinase A
Pmk2:	Isoforme 2 de la pyruvate kinase
POT1:	Protéine de protection des télomères
PPAR α :	Récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxysomes (NR1C1)
PPAR γ :	Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes
PPP :	Voie des pentoses phosphates
Prdx- :	Peroxyrédoxines
PRR :	Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PTCH :	Récepteur transmembranaire homologue de <i>Patched</i>
QH \cdot :	Ubisemiquinone
QH $_2$:	Ubiquinol
RB :	Rétinoblastome
RE :	Réticulum endoplasmique
READ :	Dégradation associée au réticulum endoplasmique
Rheb :	Homologue de RAS enrichi dans le cerveau
RLR :	Récepteurs de type gène 1 induits par l'acide rétinoïque
RNS :	Espèces réactives de l'azote
ROS :	Dérivés réactifs de l'oxygène

RRM :	motif de reconnaissance de l'ARN
RSK :	Kinase ribosomale S6
RXR β :	Récepteur x bêta des rétinoïdes
SAE :	Protéine activatrice de SUMO
Scd1 :	Stéaroyl-CoA désaturase
SCF :	Facteur de croissance des cellules souches
SDH :	Succinate déshydrogénase
SHH :	<i>Sonic Hedgehog</i>
SIRT1 :	Sirtuine 1
SMO :	<i>Smoothened</i>
Sod2 :	Superoxyde dismutase 2
SRC-1 :	Coactivateur des récepteurs des stéroïdes
SRE :	Élément de réponse aux stéroïdes
SREBP :	Protéines de liaison aux éléments régulateurs des stéroïdes (SREBP)
STAT :	Transducteur de signal et activateur de la transcription
SUMO :	Petit modificateur de type ubiquitine
TAM :	Macrophages associés aux tumeurs
TAK1 :	Kinase 1 activée par le facteur de croissance tumoral transformant
TCF :	Facteurs de transcription des cellules T
TCR :	Récepteur des lymphocytes T
TME :	Microenvironnement tumoral
TERF2IP :	Protéine 1 interagissant avec le facteur de liaison télomérique 1
TERT :	Transcriptase inverse de la télomérase
TFAM :	Facteur de transcription mitochondrial ADN grippant A
TFB2M :	Diméthyladénosine transférase mitochondriale 2
TGF :	Facteur de croissance transformant
TNF :	Facteur de nécrose tumorale
TRAF2 :	Facteur 2 associé aux récepteurs de facteurs de nécrose tumorale
TRX :	Thiorédoxine
TSC1 :	Hamartine
TSC2 :	Tubérine

Txn 2 :	Thiorédoxine 2
TXNIP :	Protéine interagissant avec la thiorédoxine
TYR :	Tyrosinase
TYRP1 :	Protéine 1 liée à la tyrosinase
UCP :	Protéines découplantes mitochondriales
ULK1 :	<i>Unc-51-like autophagy activating kinase</i>
UPR :	Réponse aux protéines mal repliées
UV :	Ultraviolet
VEGF:	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VPH :	Virus du papillome humain

Remerciements

Le meilleur conseil que je puisse donner aux étudiants qui envisagent d'entreprendre des études graduées est de bien s'accrocher, car ce sera toute une aventure ! Avoir un bon réseau de soutien fait toute la différence et je souhaite remercier les personnes qui m'ont entourée tout au long de mon parcours.

Merci à mon directeur de recherche, Simon-Pierre Gravel, de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire, pour avoir contribué de façon significative à ma formation scientifique et pour m'avoir transmis une expertise qui restera encrée en moi tout au long de ma carrière. Je remercie également mon collègue, Karl Laurin, de m'avoir initiée à plusieurs techniques de laboratoire, pour m'avoir aiguillée lorsque j'avais besoin de conseils, et pour avoir répondu à mes très nombreuses questions. Je lui souhaite la meilleure des chances pour la suite ! Je tiens aussi à remercier Matthias, sur qui j'ai toujours pu m'appuyer et qui est demeuré à mes côtés dans les bons comme les moins bons moments. Il a su m'écouter et me guider lorsque j'en avais besoin. Merci à Nour pour son soutien dans la réalisation de ce travail, son regard critique et sa bonne humeur contagieuse. Merci aussi à Janelle pour sa bonne humeur toujours contagieuse, pour son retour critique sur ce mémoire et tous ses excellents conseils.

J'ai une pensée particulière pour mes amis et collègues du troisième étage qui m'ont écoutée, encouragée et supportée dans cette folle aventure. Pour certains, je vous ai connu dès mon arrivée à l'université. C'est le cas de Fatéma, Cloé et Sara, dont j'ai fait la connaissance en tant qu'auxiliaires d'enseignement et qui sont rapidement devenues de bonnes amies. Vous m'avez pris sous votre aile et vous m'avez guidée tout au long de mon parcours. Je vous serai toujours reconnaissante pour votre accueil chaleureux, vos encouragements et votre bonne humeur constante. Merci aussi à Stéphanie pour ses critiques constructives, ses bons conseils et pour les éclats de rire. Sachez que je vous porterai toutes toujours dans mon cœur !

Un merci tout spécial à l'équipe du laboratoire du Dr Marc Servant, qui a su me conseiller et m'aiguiller au travers de protocoles délicats et parfois complexes. Merci à Mariana pour sa patience extrême, son écoute toujours attentive et ses judicieux conseils. Merci à Florence Dô, vers qui je

pouvais toujours me tourner lorsque j'avais besoin de discuter et qui m'a toujours écoutée et soutenue. Je m'ennuie de toi déjà et je ne t'oublierai pas !

Ce travail n'aurait jamais été possible sans le soutien et l'Amour inconditionnel de mes parents. Je leur serai éternellement reconnaissante de tous les sacrifices qu'ils ont faits et de leur support constant qui m'a permis de me dévouer complètement à mon travail et de mener ce projet à terme.

À vous tous, je tiens à dire MERCI !

Chapitre I : Introduction

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Organisation de la peau

La peau est le plus grand organe du corps humain. Dynamique, elle se régénère continuellement. Elle recouvre tout le corps humain, ce qui représente une surface de deux m², et constitue 15% du poids corporel. Elle agit en tant que barrière physique qui protège nos organes internes des chocs, des brûlures, des infections, des radiations et des produits chimiques tels que les toxines ou les polluants. La peau joue également un rôle majeur dans la régulation de la température corporelle. Les vaisseaux sanguins qu'elle contient (voir Figure 1) se contractent lorsque la température diminue, prévenant ainsi la perte de chaleur. À l'inverse, lorsque la température augmente, ces vaisseaux se dilatent pour augmenter le flux sanguin et permettre d'évacuer le surplus de chaleur. De plus, la peau contient des glandes sudoripares (voir Figure 1) libérant de l'eau sous forme de transpiration qui, en s'évaporant, permet de diminuer la température corporelle. La peau est également le site de production de certaines hormones assurant différentes fonctions dans tout le corps. La peau contient finalement un réseau de cellules nerveuses permettant de percevoir des changements dans l'environnement, certains récepteurs étant spécifiques à la chaleur, au froid au toucher ou à la douleur (1).

1.1.1. Description des différentes couches cutanées

Épiderme : Il s'agit de la couche la plus externe de la peau. L'épiderme est lui-même composé de quelques couches, la plus superficielle étant la couche cornée, suivi de la couche granulée, de la couche épineuse puis de la couche basale (voir Figure 1), la couche la plus profonde de l'épiderme (2). On retrouve, dans l'épiderme, des kératinocytes (voir Figure 1), cellules prédominantes de l'épiderme, liés entre eux par des jonctions serrées. Ces derniers sont empilés au-dessus du derme, uniquement séparés de ce dernier par la couche basale. Les kératinocytes proviennent de la couche basale. Ils produisent la kératine (3) et sont responsables d'assurer la barrière d'hydratation de la peau. On y retrouve également d'autres types cellulaires, tels que les mélanocytes et les cellules de Langerhans. Les mélanocytes (voir Figure 1) sont quant à eux dérivés de la crête neurale et sont situés entre les cellules de la strate basale. Ils produisent la mélanine, qui détermine la couleur de

la peau et lui confère une photoprotection. Leur fonction sera abordée plus en détail à la section 1.1.2 (Le mélanocyte). De leur côté, les cellules de Langerhans (voir Figure 1) sont des cellules dendritiques de la peau participant à la défense immunitaire innée. En effet, elles expriment tant le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I que II et captent les antigènes de la peau pour les présenter aux lymphocytes et ainsi les activer. Finalement, les cellules de Merkel (voir Figure 1), situées dans la couche basale de l'épiderme, sont des mécanorécepteurs qui exercent une fonction sensitive en détectant les touchers légers. On les retrouve surtout au bout des doigts, mais également au niveau des paumes, de la plante des pieds ou au niveau des muqueuses orales et génitales (1).

Derme : Connecté à l'épiderme au niveau de la membrane basale, le derme est constitué de deux couches de tissu conjonctif, plus précisément de fibres de collagène (voir Figure 1) de type I et III, de fibres élastiques, de follicules pileux et de glandes sudoripares, de vaisseaux sanguins (voir Figure 1) et lymphatiques, ainsi que de quelques fibres musculaires. Le derme est réparti en deux couches qui sont le derme papillaire, composé de tissu conjonctif lâche vascularisé, ainsi que le derme réticulaire, composé de tissu conjonctif dense. Le derme procure à la peau son élasticité et sa résistance. Les vaisseaux sanguins qu'il contient permettent de transporter des nutriments à l'épiderme et aux follicules pileux et contribuent à la réponse inflammatoire en permettant le recrutement entre autres de neutrophiles et de lymphocytes. Les follicules pileux sont entourés de mécanorécepteurs qui détectent le mouvement des poils et transmettent le signal au-delà de la surface de la peau. D'autres récepteurs sensoriels (voir Figure 1), tels que les corpuscules de Pacini, sont sensibles à la pression et à la vibration alors que les corpuscules de Meissner sont plutôt sensibles au toucher léger (4).

On retrouve principalement, dans le derme, des fibroblastes, mais également, des macrophages, des mastocytes, des adipocytes et des cellules de Schwann. Les fibroblastes participent à la synthèse de la matrice extracellulaire permettant l'adhésion des cellules et assurant le soutien du tissu conjonctif qui la compose. Les fibroblastes participent également au développement des follicules pileux (5). Les mastocytes sont des cellules inflammatoires résidentes de la peau. Elles libèrent des granules contenant des médiateurs inflammatoires lorsqu'elles sont activées par des agents pathogènes, des agents chimiques ou des allergènes, et jouent un rôle dans la production et

le remodelage du collagène. Des stimuli physiques ou mécaniques, tels que des blessures, peuvent également activer les mastocytes qui sécrètent alors des cytokines et des facteurs de croissance agissant sur les kératinocytes et les fibroblastes ainsi que des facteurs pro-angiogéniques afin de permettre la cicatrisation (6). Les nocicepteurs permettent de détecter les stimuli pouvant causer des dommages afin d'assurer la survie des cellules. Les cellules de Schwann, des cellules gliales spécialisées faisant partie du système nerveux périphérique, sont situées à la frontière entre le derme et l'épiderme. Elles entourent les fibres nerveuses des récepteurs sensoriels de la peau et participent ainsi à la transmission des signaux douloureux (7) vers le système nerveux central.

Hypoderme : On retrouve, dans l'hypoderme, des adipocytes, des vaisseaux sanguins, des fibres nerveuses et des cellules adipeuses (voir Figure 1). Ces dernières forment le tissu adipeux (8). Les adipocytes jouent un rôle dans le métabolisme du glucose et expriment des enzymes impliquées dans la synthèse de triglycérides qu'ils emmagasinent. Dans l'obésité, la surconsommation de calories engendre une surproduction de triglycérides qui dépasse la capacité des adipocytes à les emmagasiner. L'accumulation de produits de dégradation des triglycérides dans des tissus autres que le tissu adipeux provoque une dysfonction et une réponse inflammatoire impliquée dans le diabète, la stéatose hépatique non alcoolique et d'autres troubles métaboliques (9, 10). L'accumulation de lipides dans les adipocytes constitue une couche d'isolation (11) permettant de réguler la température corporelle et de s'adapter au froid.

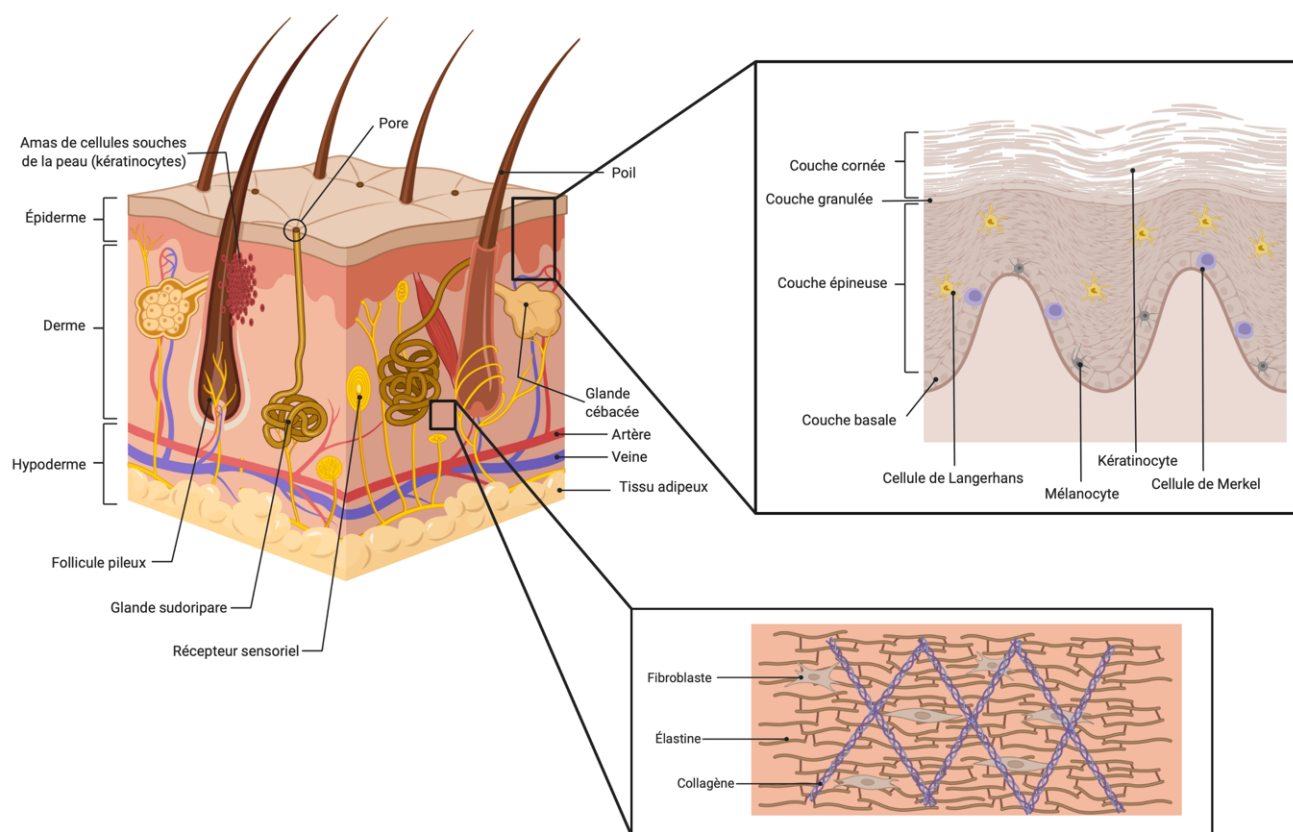


Figure 1 : Description des différentes couches cutanées et des structures qui les composent. La peau est composée de trois couches, la plus superficielle étant l'épiderme, suivi du derme puis de l'hypoderme, la couche la plus profonde. L'épiderme contient quelques cellules immunitaires et certains récepteurs sensitifs, mais elle contient principalement des kératinocytes qui captent et emprisonnent la mélanine produite par les mélanocytes également retrouvés dans l'épiderme. Le derme contient des fibroblastes. Ces derniers participent à la synthèse des différentes fibres qui maintiennent la structure du tissu et lui permettent d'assurer son rôle de support et de soutien. Le derme renferme également certaines cellules immunitaires, notamment des macrophages, des mastocytes, des cellules dendritiques et des lymphocytes T. En cas de lésion ou d'infection, des récepteurs sensitifs ou de signaux de danger présents au niveau du derme peuvent activer une réponse immunitaire. Dans ce cas, les cellules immunitaires de la peau se différencient, recrutent d'autres cellules immunitaires et participent à la présentation antigénique afin d'éliminer les agents pathogènes et de réparer les dommages tissulaires. Le derme renferme également des vaisseaux sanguins qui acheminent oxygène et nutriments aux cellules des différentes couches cutanées, le derme étant la seule couche vascularisée. De son côté, l'hypoderme est principalement composé de tissu conjonctif et adipeux. Figure créée à l'aide de Biorender : www.biorender.com

1.1.2. Le mélanocyte

1.1.2.1. Origine du mélanocyte

Les mélanocytes sont de petites cellules ovales ou fusiformes dérivées des mélanoblastes, qui migrent à partir des cellules pluripotentes de la crête neurale à la suite d'une transition épithélio-mésenchymateuse. Les mélanoblastes migrent alors vers la périphérie où ils prolifèrent et, en réponse à différents signaux issus du microenvironnement, se différencient afin d'adopter la morphologie et le profil d'expression génique caractéristiques des mélanocytes. Chez l'humain, la migration des mélanoblastes se produit entre la sixième et la huitième semaine de l'embryogenèse (12). La prolifération, la différenciation, la migration et la survie des mélanocytes sont assurées par l'endothéline (Edn), qui active un récepteur couplé aux protéines G de la famille des récepteurs à sept passages transmembranaires, *EdnrB*, et interagit avec le récepteur tyrosine kinase c-Kit, ainsi que par la signalisation Wnt (13). La signalisation Wnt régule la transcription en recrutant un coactivateur au noyau, la β -caténine. Cette dernière se lie alors à un facteur de transcription de la famille des facteurs de transcription des cellules T (TCF) afin d'induire son activité transcriptionnelle. Le complexe formé de la β -caténine et de TCF se lie au promoteur du facteur de transcription associé à la microphthalmie (*MITF*) et l'induit (14), ce qui favorise la survie des mélanoblastes, promeut la prolifération et la différenciation des mélanoblastes au cours du développement embryonnaire et participe ultimement au développement des mélanocytes (15, 16). Le facteur de transcription PAX3 active lui aussi le promoteur de *MITF* en réponse à l'interleukine 6. De plus, *MITF* peut être phosphorylé par les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) ou la kinase ribosomale S6 (RSK), indiquant un lien entre la régulation de *MITF* et le microenvironnement. L'activation de c-Kit par le facteur de croissance des cellules souches (SCF) permet le recrutement et l'activation de kinases de la famille des Src. Cette signalisation permet ultimement l'activation de la cascade des MAPK Ras-Raf-Mek-Erk, ce qui mène à la phosphorylation et induit l'activité transcriptionnelle de *MITF*, bien que la protéine soit dégradée par ubiquitination (17). *MITF* régule également la fonction mitochondriale et participe ainsi à la reprogrammation métabolique des cellules de mélanome (voir section 1.4.1). Ensemble, les signalisations Wnt et *RAF/MEK/ERK*, de même que *MITF*, participent au développement, à la différenciation et à la prolifération des mélanocytes. D'ailleurs, TFAM est essentiel à la

différenciation (18) et à la survie des mélanocytes, avec d'autres marqueurs incluant S100, l'anticorps 45 marqueur du mélanome (HMB-45) et l'antigène de mélanome reconnu par les lymphocytes T (*MLANA*). Le marquage de MITF nucléaire, détecté en immunohistochimie, est utilisé comme outil diagnostique pour le mélanome métastatique (19).

1.1.2.2. Localisation et fonction

Les mélanocytes sont concentrés entre les cellules de la strate basale de l'épiderme et représentent moins de 1% des cellules de l'épiderme. Les mélanocytes produisent la mélanine qu'ils emmagasinent sous forme de mélanosomes. Les mélanosomes, qui contiennent également la tyrosinase (TYR), une enzyme majeure capable de synthétiser la mélanine à partir de la tyrosine, sont transférés aux kératinocytes. Chaque mélanocyte s'associe à 30 à 40 kératinocytes afin de former « l'unité épidermique », seule responsable de la synthèse de la mélanine et de la pigmentation de la peau. La mélanine existe sous différentes formes, soient l'eumélanine, un pigment brun/noir et la phéomélanine, un pigment jaune/rouge. La composition des mélanosomes varie en fonction du phototype de peau, une classification basée sur la couleur de la peau et des cheveux, ainsi que sur la sensibilité de la peau aux rayons ultraviolets (UV). Les mélanosomes se développent dans le cytoplasme à partir de vésicules contenant TYR et sécrétées par l'appareil de Golgi. TYR oxyde la L-tyrosine, une étape essentielle à la biosynthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine (20). Les enzymes TYR, TYRP1 et DCT catalysent la synthèse des intermédiaires de l'eumélanogénèse alors que la biosynthèse de la phéomélanine dépend plutôt de TYR et de l'acide aminé cystéine (21).

Afin que la pigmentation de la peau soit apparente, la mélanine est transférée à partir des prolongements dendritiques des mélanocytes vers les kératinocytes par un processus encore mal compris. Nous savons cependant que ce transport fait intervenir des protéines d'adhésion créant une jonction étroite entre les mélanocytes et les kératinocytes, appelée « synapse pigmentaire ». Au cours de la maturation des mélanosomes, la kinésine et le réseau de microtubules des mélanocytes permettent d'acheminer le mélanosome vers les prolongements dendritiques. Le pigment qu'il contient est alors exocyté puis capté par le kératinocyte par endocytose. Une alternative également envisagée est la phagocytose des mélanosomes contenus dans les

prolongements dendritiques des mélanocytes par les kératinocytes (22). La mélanine captée par les kératinocytes s'accumule alors autour de leur noyau afin de protéger le matériel générique qu'il contient des dommages causés par UV. Un déséquilibre dans le développement et la migration des mélanocytes, ou une perturbation de la régulation de l'activité des mélanocytes par les kératinocytes peuvent engendrer des mutations, des modifications épigénétiques en plus de perturber les interactions entre les mélanocytes et le microenvironnement. Tous ces facteurs sont susceptibles de causer un mélanome (23).

1.2. Particularités des différentes formes de cancer de la peau non mélanocytaire

Il existe trois principales formes de cancer de la peau, soit le carcinome basocellulaire (CBC) et le carcinome spinocellulaire (CSP), qui sont regroupés sous le terme général de « cancer de la peau non mélanocytaire », ainsi que le mélanome malin. Le cancer de la peau est la forme de cancer la plus fréquente dans le monde. La plupart des cas sont des cancers de la peau non mélanocytaires, bien que le nombre exact de cas soit difficile à établir puisque ce type de cancer n'est pas systématiquement répertorié dans des bases de données. La plupart des cas de cancer de la peau non mélanocytaire, environ 80%, sont des CBC et ces derniers affectent particulièrement la peau de la tête, du visage et du cou. Les patients peuvent ressentir des démangeaisons ou de la sensibilité et présenter des saignements (24). Les CBC se propagent localement, mais forment rarement des métastases distales. Ils peuvent cependant détruire les os et le cartilage (25).

1.2.1. Carcinomes basocellulaires

Les CBC regroupent les CBC nodulaires, les CBC superficiels, les CBC morphéiformes et les CBC infiltrants. Ils se développent à partir de cellules petites et rondes, nommées cellules basaloïdes, qui forment des amas ressemblant à la couche basale de l'épiderme. Les CBC les plus fréquents sont de types nodulaires. Ces derniers se présentent le plus souvent sous forme de papules brillantes aux bordures nacrées bombées et bien définies avec un ulcère central. De leur côté, les CBC superficiels se présentent sous forme de minces plaques rougeâtres bien délimitées qui desquament. Les CBC les plus rares sont les CBC morphéiformes caractérisés par des plaques aux bordures mal définies ressemblant à une cicatrice blanche (26). Tous les CBC ont le potentiel d'infiltrer les tissus

environnants, particulièrement les yeux, le nez, les os du visage ou le cerveau (27), bien qu'ils touchent surtout la tête et le cou. Ils peuvent alors engendrer des problèmes visuels, neurologiques ou d'ordre esthétique de même que la perte de fonction d'un ou plusieurs nerfs crâniens. Ce type de lésion est souvent blanchâtre ou rosé, mal défini et peut présenter des papules ou des ulcérations. Les CBC infiltrant se développent à partir de cellules basaloïdes qui forment des nids dont la périphérie présente un motif en palissade, c'est-à-dire que les cellules sont parallèles entre elles mais perpendiculaires à la surface sur laquelle elles sont fixées. Ces lésions développent ensuite des faisceaux de cellules basaloïdes qui s'allongent à partir de la périphérie ou de la base de la tumeur. Les tumeurs infiltrantes représentent un facteur de risque augmentant les chances de rechutes du cancer (26).

Les CBC résultent de l'interaction de facteurs environnementaux, et de prédispositions génétiques. Plus particulièrement, l'exposition aux rayons UV, un historique familial de cancer de la peau ou arborer des taches de rousseur, de même que la prise de médicaments immunosuppresseurs et l'exposition à des radiations ionisantes sont des facteurs de risque de développer un CBC (28). Par ailleurs, une exposition importante et prolongée à des sources de radioactivité (29, 30) et les traitements de radiothérapie (31) constituent des sources connues de radiation augmentant le risque de développer un CBC. Le gène suppresseur de tumeur *PTCH* (récepteur transmembranaire homologue de Patched), situé sur le chromosome 9 humain, code pour un récepteur du même nom faisant partie de la signalisation de *Sonic Hedgehog* (SHH). La liaison du ligand SHH à son récepteur PTCH inhibe le récepteur et permet la relâche d'une protéine *Smoothened* (SMO), une cible directe de PTCH. À l'inverse, PTCH est une protéine inhibitrice qui empêche la relâche de SMO selon un mécanisme toujours mal compris et les mutations inhibitrices de PTCH activent la signalisation de SHH (32). Une dérégulation de la signalisation de SHH est associée au développement de plusieurs cancers, dont le CBC, mais également du cancer du pancréas, du sein, des ovaires et du poumon (33). Finalement, SMO est un co-récepteur qui régule positivement la signalisation de SHH. Il est constitutivement activé lors de l'inhibition de PTCH et active les cibles directes de ce dernier. La liaison de SHH à PTCH provoque la dégradation de ce dernier. SMO est ensuite phosphorylé par la protéine kinase A (PKA) et la caséine kinase 1 (CK1). SMO active une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation de l'oncogène associé aux gliomes 1 (GLI1). Ce dernier est un facteur de transcription qui se lie directement à la séquence 5'-GACCACCCA-

3' (33) du promoteur de gènes impliqués dans la régulation de la signalisation de SHH elle-même, en plus d'induire l'expression de gènes qui contrôlent la prolifération, le renouvellement, le cycle cellulaire et la pluripotence des cellules (34, 35).

1.2.2. Les carcinomes spinocellulaires

Le second cancer de la peau non mélanocytaire le plus fréquent est le CSP, qui se développe à partir des kératinocytes de l'épiderme (voir section 1.1.1). Le SCP se développe à partir d'une lésion le plus souvent pré-maligne nommée « kératose actinique » (KA). Ce type de lésion apparaît sous forme de plaque desquamée de quelques millimètres (mm) de diamètre de couleur brunâtre ou rosée. La KA est le résultat de la prolifération de kératinocytes néoplasiques caractérisés par une anomalie de la forme et de la taille ainsi que par un noyau élargi. Les KA peuvent se résoudre d'elles-mêmes, persister sans progresser davantage ou se transformer en tumeurs cancéreuses et devenir un CSP. En fonction du nombre de lésions pré-malignes, ainsi que de la localisation et du diamètre de la tumeur primaire, le CSP peut métastaser au niveau des ganglions lymphatiques environnants (36). Le CSP touche principalement les individus au teint pâle, et l'exposition aux rayons UV ou au virus du papillome humain (VPH) est un facteur de risque de développer un CSP. Certaines anomalies héréditaires de la peau prédisposent également à développer un CSP. C'est le cas notamment de l'albinisme, une anomalie ou une absence de la production de mélanine par les mélanocytes, ainsi que du xeroderma pigmentosum, qui augmente la sensibilité de la peau aux rayons UV. Les patients ayant reçu une greffe d'organe solide ont également un risque plus élevé de développer un CSP. Chez ces patients, le CSP progresse plus rapidement et est associé à un taux de mortalité plus élevé (37). Chez les patients transplantés, la consommation de tabac ou d'alcool, l'âge, le genre masculin, les traitements de radiothérapie ou de chimiothérapie ainsi que l'infection au VPH sont les principaux facteurs de risque de développer un SCP sous-jacent. Lors d'une allogreffe de cellules souches, qui proviennent principalement de la moelle osseuse d'un donneur, le patient (receveur) reçoit une radiothérapie ou une chimiothérapie intensive afin de détruire les défenses immunitaires du receveur et de permettre au greffon provenant du donneur de prendre le contrôle hématopoïétique de l'organisme du receveur. Ceci permet de limiter les risques de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), qui survient lorsque les lymphocytes T du donneur reconnaissent les cellules du receveur comme des corps étrangers et les attaquent. La GVHD est également

associée à une inflammation chronique qui peut engendrer une instabilité génomique et ainsi contribuer au développement de plusieurs cancers, dont le SCP. La plupart des patients transplantés, particulièrement ceux qui développent la GVHD, prennent de lourds traitements immunosuppresseurs à long terme (38). Ainsi, l'inflammation et l'immunosuppression contribuent au développement du SCP chez les patients ayant subi une allogreffe.

1.3. Pathophysiologie du mélanome

1.3.1. Incidence

Le mélanome est le plus mortel des cancers de la peau. Bien que l'incidence exacte du mélanome soit difficile à déterminer en raison du manque de critères diagnostiques, les épidémiologistes croient que le nombre de cas augmente constamment depuis les cinquante dernières années, et ce, plus rapidement que pour n'importe quel autre type de cancer. Il s'agit du troisième cancer le plus couramment diagnostiqué aux États-Unis, après le cancer de sein et celui du poumon, avec 192 000 nouveaux cas estimés pour l'année 2019 seulement (39). Au Canada, on estime que 8000 personnes auront reçu un diagnostic de mélanome en 2020 et que 1300 en mourront.

L'incidence du mélanome varie en fonction de l'ethnicité, de la situation géographique, du genre et de l'âge. L'exposition aux rayons UV, particulièrement un antécédent de coup de soleil ou la fréquentation des salons de bronzage, est le principal facteur de risque modifiable du mélanome (40). Une faible production de mélanine chez les personnes au teint clair rend la population caucasienne plus vulnérable à ce type de cancer, alors que les personnes à la peau foncée diminuent leur exposition aux rayons UV de 50%. Les Caucasiens sont donc les plus touchés, suivis par les Autochtones, les Hispaniques, les Asiatiques puis finalement les Afro-Américains (41).

Cependant, pour une même ethnicité, l'incidence du mélanome peut varier en fonction de la situation géographique, principal facteur dictant le niveau d'exposition aux rayons UV. En effet, l'incidence et la mortalité du mélanome augmentent en se rapprochant de l'équateur ou d'endroits où l'effet protecteur de la couche d'ozone est diminué (42). Les disparités au niveau de l'incidence du mélanome pour une même ethnicité, par exemple caucasienne, proviennent généralement de

différences dans l'exposition aux rayons UV. En effet, une exposition intermittente est plus carcinogène qu'une exposition chronique. Pour une même région, cependant, l'incidence du mélanome est plus élevée au Sud qu'au Nord. On observe une telle tendance en Australie, qui présente la plus forte incidence de mélanome dans le monde (43). Cette tendance est commune à plusieurs régions, et l'on considère que l'incidence du mélanome cutané évolue suivant un « gradient de latitude ». Or, en Europe, l'incidence du mélanome cutané est plus élevée au Nord (pays scandinaves) qu'au Sud. Le Danemark, la Norvège et la Suède présentent d'ailleurs une incidence de mélanome cutané plus élevée que d'autres pays dont la latitude est similaire (44). Ceci peut s'expliquer par une combinaison de facteurs génétiques et des particularités dans la pigmentation des yeux et de la peau (45) affectant la susceptibilité de développer un mélanome.

L'incidence du mélanome varie à l'intérieur d'une même population en fonction de l'âge et du genre. Elle est plus faible chez les personnes de moins de quarante ans, mais le mélanome figure parmi les cancers les plus communs détectés chez les adolescents et les jeunes adultes. À cause de la popularité des salons de bronzage dans cette population, ce qui augmente le risque de développer un mélanome, les adolescentes et les jeunes femmes sont plus susceptibles de développer un mélanome que leur contrepartie masculine. Passé 40 ans, la tendance s'inverse et les hommes sont plus à risque de développer un mélanome que les femmes, possiblement à cause des androgènes qui favorisent la migration et la survie des cellules de mélanome (46).

1.3.2. Facteurs de risques

Plusieurs facteurs génétiques et environnementaux participent au développement et à la progression du mélanome. Leurs capacités à causer des mutations et à altérer l'expression des gènes font des rayons UV le plus important facteur de risque modifiable du mélanome. Le soleil est la principale source de rayons UV, suivi par quelques sources artificielles comme certaines lumières, les lasers et les appareils de bronzage. Les rayons UV se présentent sous forme d'ondes invisibles et sont divisés en trois sous-catégories en fonction de leur longueur d'onde. Plus la longueur d'onde est courte, plus la quantité d'énergie propagée par l'onde est importante et plus les dommages sont importants pour notre organisme. Heureusement, la couche d'ozone présente dans la stratosphère nous protège en absorbant une partie du rayonnement du soleil. En effet, les rayons UVB, qui émettent à une longueur d'onde de 280 à 315 nm, sont filtrés jusqu'à 99% par la couche d'ozone.

Par contre, 1 à 10% des rayons UVB du soleil nous atteignent. Riches en énergie, les rayons UVB peuvent pénétrer l'épiderme où ils provoquent des coups de soleil et participent au vieillissement de la peau. Carcinogènes, ils sont susceptibles d'engendrer un cancer de la peau. De leur côté, les rayons UVC, qui émettent à une longueur d'onde de 100 à 280 nm, sont totalement filtrés par la couche d'ozone et n'atteignent jamais la Terre. Ce sont toutefois des rayons à très haute énergie et ils sont très nocifs pour toute forme de vie. Ils sont utilisés pour détruire des agents pathogènes. Finalement, les rayons UVA ne sont quant à eux pas filtrés par la couche d'ozone et 90 à 90% atteignent la surface de la Terre. Ils pénètrent la peau en profondeur où ils participent au vieillissement cutané. Leur potentiel énergétique est plus faible que celui des autres rayons mais les rayons UVA peuvent tout de même provoquer des dommages en cas d'exposition prolongée (47). Ainsi, un historique de coup de soleil durant l'enfance ou une exposition marquée aux rayons UVA, par exemple dans les salons de bronzage, augmente le risque de développer un mélanome (48).

Les nævi mélanocytaires, communément appelés « grains de beauté », sont des excroissances cutanées bénignes résultant de l'accumulation de mélanocytes et pouvant être présents dès la naissance ou apparaître plus tard dans la vie. Environ 25% des cas de mélanomes se développent à partir de nævus. La présence d'un nombre élevé de nævus augmente le risque de développer un mélanome, bien qu'il importe d'également considérer la taille et le type de nævus. La présence de nævi dysplasiques, également appelés nævi atypiques, est un facteur de risque connu de développement certains cancers de la peau, notamment le mélanome. Ces derniers sont des nævi mélanocytaires d'une largeur d'au moins cinq millimètres dont la coloration n'est pas uniforme et dont les contours sont asymétriques, irréguliers et mal définis. Bien que la présence d'un seul nævus atypique soit suffisante pour représenter un risque, la présence de cinq nævi atypiques augmente de six fois le risque de développer un mélanome (49).

Les personnes à la peau claire ont un risque plus élevé de développer un mélanome que les personnes qui ont une peau naturellement foncée (voir Tableau 1). Ces personnes ont un teint pâle, souvent avec des taches de rousseur, et bronzent très peu ou pas. Elles sont particulièrement sujettes aux coups de soleil. Les yeux et les cheveux pâles, comme les yeux bleus ou verts et les cheveux roux ou blonds, traduisent souvent une plus grande sensibilité au soleil (50).

Tableau 1 : Classification de Fitzpatrick pour les différents types de peaux et risque associé de développer un mélanome (51, 52)

Type	Couleur de la peau	Couleur des yeux	Couleur des cheveux	Réactivité au soleil	Risque de développer un mélanome
I	Peau très pâle avec présence de tâches de rousseur	Bleus ou verts	Roux ou blond	Brûle toujours, ne bronze jamais	Très élevé
II	Peau pâle	Bleus, noisette ou verts	Roux, blond ou brun pâle	Brûle facilement, ne bronze difficilement	Très élevé
III	Légèrement brunâtre, blanc à olive	Brun, bleu, verts ou noisettes	Blond foncé à châtain	Brûle parfois, ne bronze jamais	Élevé
IV	Brun moyen à foncé	Bruns ou noisette	Brun moyen à foncé	Ne brûle que très légèrement, bronze facilement	Modéré
V	Brun foncé	Brun	Brun foncé	Brûle rarement, bronze facilement	Faible
VI	Noire	Brun	Noire	Ne brûle jamais, bronze systématiquement et facilement	Très faible

Un historique familial de mélanome peut indiquer la présence d'un profil de mutations autosomiques dominantes, par exemple celles affectant des gènes de susceptibilité connus du mélanome tels que *CDKN2A*, *CDK4*, *BAP1*, *POT1*, *ACD*, *TERF2IP* ou *TERT*, qui représentent un facteur de risque important de la maladie. Le mélanome se développe et progresse à mesure que les mélanocytes accumulent des mutations provoquant des changements génomiques affectant leur

développement et leur prolifération. Pour un individu présentant un ou plusieurs facteurs de risque génétiques, l'accumulation de quelques mutations somatiques pourrait être suffisante pour atteindre le niveau d'instabilité génomique nécessaire au développement du mélanome (53).

Les mutations affectant *CDKN2A* représentent 20 à 40% des cas de mélanome héréditaire. Ce gène encode pour une protéine, P-16 (ou p16INK4A), qui inhibe les kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4-6). Cette inhibition empêche la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (RB) et bloque les cellules au point de contrôle G1/S du cycle cellulaire, conférant ainsi un rôle de suppresseur de tumeur à *CDKN2A*. Les mutations affectant *CDKN2A* sont un indicateur du nombre de nævus et de la réactivité de la peau aux rayons UV, pouvant favoriser l'apparition de mélanome cutané (54). *CDK4* peut également être muté, ce qui empêche la liaison et l'inhibition de CDK4 par P-16. CDK4, qui régule le passage à la phase de synthèse (S) du cycle cellulaire, est alors constitutivement activée, ce qui lui confère des propriétés oncogéniques (55).

1.3.3. Transition du mélanocyte vers un mélanome

Le mélanome est le cancer de la peau le plus agressif en raison de sa grande capacité à métastaser et à adopter différentes transformations métaboliques permettant aux cellules cancéreuses de s'adapter à différents microenvironnements. Il est provoqué par un dysfonctionnement des mélanocytes affectant particulièrement les cellules de la peau. Cependant, le mélanome peut également toucher les muqueuses et les yeux. Comme mentionné à la section 1.3.2, les rayons UVA et UVB peuvent générer des cancers de la peau, mais selon des mécanismes différents. L'exposition aux rayons UVB engendre la formation de photoproduits, communément des dimères de pyrimidine. Les dimères les plus couramment rencontrés sont des dimères de thymine. Les dimères de pyrimidine altèrent la structure de l'ADN, ce qui perturbe l'activité de l'ADN polymérase ainsi que la réplication de l'ADN (56). Des senseurs tels que XPC, DDB1, DDB2 et XPA détectent les dommages à l'ADN et activent des programmes de réparation comme la réparation par excision de nucléotides (NER) ou la réparation par excision de base (BER). De leur côté, les UVA engendrent un stress oxydatif détecté par la glycosylase 1 de l'oxoguanine 8 de l'ADN (OGG1) et réparé par BER (57). La principale différence entre ces deux mécanismes de réparation concerne l'ampleur des dommages. En effet, la méthode NER retire plusieurs nucléotides de part et d'autre d'une

importante lésion affectant la structure de l'ADN, particulièrement les dimères de pyrimidine (58), alors que la méthode BER retire une seule base azotée engendrant une petite mutation qui n'affecte pas la structure de l'ADN. De telles mutations sont souvent le résultat d'une réaction d'alkylation spontanée ou de stress oxydatif (59). Des défauts dans les mécanismes de réparation de l'ADN augmentent la sensibilité au soleil et représentent un facteur de risque de développer un cancer de la peau (60).

Ainsi, la cellule tente de minimiser les dommages grâce à des mécanismes de réparation, mais ceux-ci sont sujets aux erreurs. Des mutations surviennent si les dommages à l'ADN ne peuvent être réparés ou si des erreurs surviennent. En effet, la réparation des dimères de pyrimidine engendre des mutations de type transition. Celles-ci consistent le plus souvent à substituer une pyrimidine pour une autre pyrimidine, donc substituer une cytosine (C) pour une thymine (T), ou substituer CC pour TT (61). De telles mutations favorisent la progression du mélanome, participent à l'hétérogénéité tumorale et favorisent la métastase. La section 1.3.6 fournit plus de détails sur le type de mutations engendrées par les rayons UV et la façon dont elles impactent le développement et la progression du mélanome. Par ailleurs, les mutations engendrées par les rayons UV rendent également les mélanocytes plus sensibles à certains oncogènes (62).

Les rayons UV activent des voies de signalisation du stress impliquant le facteur de croissance épidermique et des kinases activées par les mitogènes afin d'activer des enzymes détoxifiant les ROS. Cette signalisation permet également à la cellule de combler les besoins énergétiques associés aux mécanismes de réparation de l'ADN en activant des enzymes notamment impliquées dans le métabolisme du glucose. Chacun des mécanismes de réparation de l'ADN sollicite différemment le métabolisme du glucose en fonction de la voie de synthèse des nucléotides privilégiée, du type de dommage à l'ADN et du niveau de dommage. Des études s'intéressant au rôle du métabolisme dans la réponse aux dommages à l'ADN montrent que des mutations au niveau de l'ADN mitochondrial, l'activation de proto-oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs diminuent le métabolisme oxydatif et activent la voie des pentoses phosphates (63), ce qui diminue le niveau d'énergie des cellules tumorales. Ces dernières s'adaptent en augmentant leur consommation de glucose. Elles augmentent également la production d'acide lactique et induisent la glycolyse grâce à l'accumulation de HIF-1 α . La reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses joue un rôle dans l'invasion et l'évasion immunitaire du mélanome (64).

1.3.4. Description des différents stades du mélanome

Afin de guider les professionnels de la santé dans la prise en charge de leurs patients, d'émettre le pronostic approprié et d'orienter le déroulement d'essais cliniques, il est essentiel de s'appuyer sur une stratégie de classification du mélanome tenant compte de nos connaissances actuelles de la pathophysiologie et de la progression de la maladie (65). Notre compréhension approfondie de l'immunité du cancer et la découverte de nouveaux facteurs pronostiques appellent à la réforme du système de classification des différents stades du mélanome. En 2017, des experts du American Joint Committee on Cancer (AJCC) ont été mandatés afin de mettre à jour ce système en se basant sur une base de données constituée de plus de 46 000 patients diagnostiqués avec un mélanome de stade I, II ou III provenant de 10 centres partout dans le monde, ainsi que sur les données de patients de stade IV provenant de la version précédente du système de stratification. Ceci a permis d'établir un pronostique plus adéquat en plus d'améliorer la formation de groupes de traitement et la gestion de risques lors d'essais cliniques. Cette classification est maintenant la plus acceptée et la plus utilisée à travers le monde (66).

La classification AJCC incorpore le système TNM, qui se base sur des examens cliniques et des rapports de pathologie. Ici, « T » représente l'épaisseur de la tumeur primaire et « N » représente le nombre de ganglions lymphatiques dans lesquels le cancer s'est propagé. Le stade « M » désigne la présence de métastases aux ganglions lymphatiques ou de métastases distales (67). Cette classification incorpore également le taux de réplication cellulaire, le résultat de biopsie de ganglions lymphatiques, la présence ou non d'ulcération, une dégénérescence de la peau au-dessus de la tumeur, ainsi que les niveaux sériques de LDH (lactate déshydrogénase), un indicateur de dommages cellulaires et d'apoptose (68-70).

Le stade le plus précoce du mélanome est désigné stade 0 (mélanome in situ). Le mélanome progresse ensuite en quatre stades désignés I à IV (voir Tableau 2). Le plus superficiel est le stade I. Les stades I et II désignent des tumeurs localisées alors que les stades III et IV impliquent la présence de métastases locorégionales et distales respectivement (voir Figure 2). Chacun des stades de mélanome est ensuite divisé en sous-catégories en fonction de la présence ou de l'absence d'ulcérations (71).

Tableau 2 : Description des différents stades de progression du mélanome (65, 72)

Stade	Description
0	La lésion est limitée à l'épiderme
1	Ia : La lésion mesure moins d'un millimètre d'épaisseur, avec ou sans ulcération de la tumeur, soit une érosion de la surface cutanée provoquant une plaie ouverte aux bords irréguliers.
	Ib : La lésion mesure entre un et deux millimètres d'épaisseur sans ulcération
II	IIa : La lésion mesure entre un et deux millimètres d'épaisseur avec ulcération ou elle mesure entre deux et quatre millimètres d'épaisseur sans ulcération.
	IIb : La lésion mesure entre deux et quatre millimètres d'épaisseur avec présence d'ulcération ou elle mesure plus de quatre millimètres d'épaisseur sans présence d'ulcération
	IIc : La lésion mesure plus de quatre millimètres d'épaisseur avec présence d'ulcération
III	La lésion a migré vers au moins un ganglion lymphatique à proximité de la tumeur initiale et peut former une ou des métastases locales. Ce stade est divisé en quelques sous-catégories en fonction du nombre de ganglions lymphatiques atteints, de la quantité de cellules cancéreuses ayant atteints le ganglion et le niveau de propagation aux régions et vaisseaux lymphatiques avoisinants.
	IIIa : Métastase affectant jusqu'à trois ganglions proximaux sans ulcération de la tumeur primaire
	IIIb : Métastase affectant jusqu'à trois ganglions proximaux ou se dirigeant vers les vaisseaux lymphatiques avoisinants sans atteindre les ganglions drainant
	IIIc : Tumeur avec ulcération formant des métastases pouvant atteindre jusqu'à trois ganglions lymphatiques régionaux ou tumeur sans ulcération formant des métastases dans au moins quatre ganglions lymphatiques régionaux
IV	La tumeur s'est propagée de façon importante et forme des métastases distales, notamment aux poumons, au foie, au cerveau ou aux os.

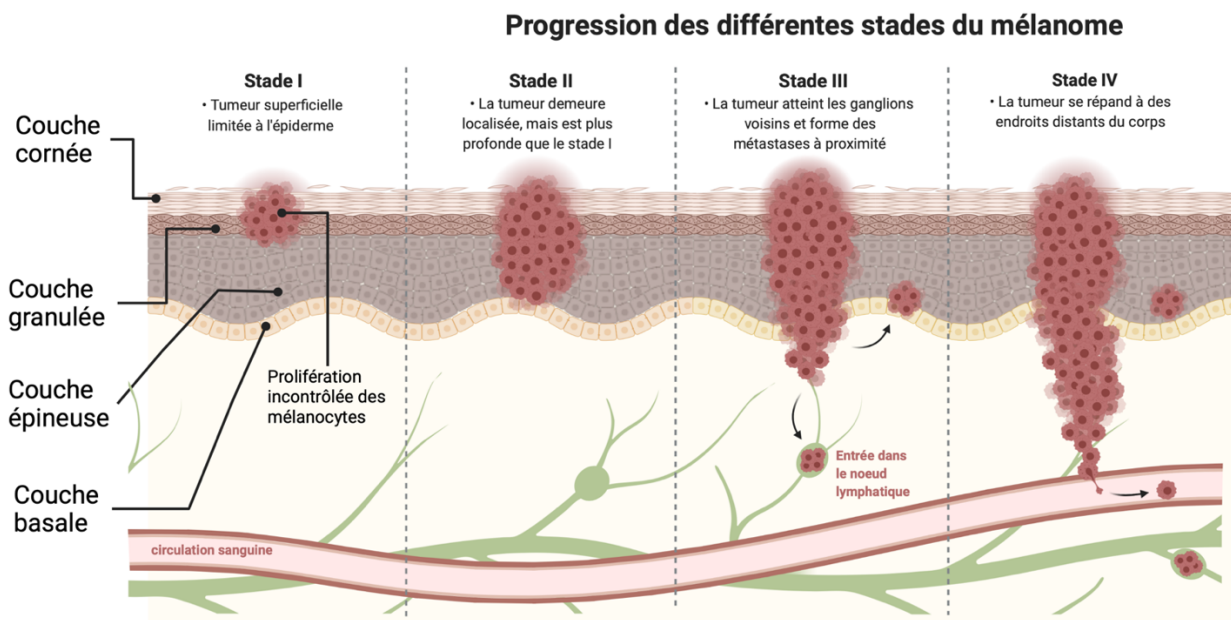


Figure 2 : Description des différents stades de progression du mélanome. Le mélanome est caractérisé par une prolifération incontrôlée des mélanocytes, un exemple commun étant un nævus mélanocytaire ayant accumulé différentes mutations affectant la croissance et la survie des mélanocytes. Ceci génère une lésion pré-maligne atypique. Celles-ci subissent d'abord une phase de progression radiale lors de laquelle la lésion s'étend sur le plan horizontal tout en restant en superficie de la peau au niveau de l'épiderme. À ce stade, des molécules d'adhésion empêchent la lésion de progresser en profondeur. S'en suit une phase de croissance verticale où les cellules deviennent de plus en plus invasives et gagnent la circulation sanguine et lymphatique. Les cellules tumorales perdent alors l'expression de molécules d'adhésion telles que les cadhérines (73), ce qui leur permet de traverser la couche basale. Au stade le plus avancé du mélanome, les cellules tumorales forment des métastases. D'abord observées au niveau de nœuds lymphatiques locaux, les métastases progressent et atteignent des endroits éloignés de la tumeur primaire tels que le cerveau ou les poumons (74). Figure créée à l'aide de Biorender : www.biorender.com

1.3.5. Signalisation des MAPK

Dans le mélanome, les mélanocytes accumulent des mutations provoquant leur prolifération incontrôlée et engendrant des lésions précurseurs du mélanome tels que des nævi mélanocytaires bénins ou des nævus dysplasiques. Ces lésions deviennent malignes et se propagent, d'abord sur le plan radial puis verticalement, pouvant ainsi générer des métastases (voir figure 2). La signalisation la plus fréquemment mutée dans le mélanome, ainsi que dans plusieurs autres types de cancers, est la signalisation des MAPK, qui régule la croissance cellulaire, la survie et la migration (75). Dans cette signalisation, des facteurs de croissance issus du microenvironnement tumoral (TME) lient un récepteur à activité tyrosine kinase comme le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), le récepteur tyrosine kinase c-KIT, les récepteurs de facteurs de croissance dérivés des

plaquettes (PDGFR) ou le récepteur du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGFR). Ceci active RAS qui hydrolyse la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP) (76).

RAS peut lier des facteurs d'échange de nucléotides guanine (GEFs). Les GEFs activent les GTPase en favorisant l'échange d'une molécule de GDP pour une molécule de GTP. Les RalGEFs constituent un exemple connu de GEFs participant au développement de certains cancers, dont le mélanome (77). On retrouve, chez les mammifères, quatre RalGEFs, soient RALGDS, RGL1, RGL2/Rlf et RGL3 (78). Les RalGEFs peuvent activer les GTPase RalA et RalB, mais peuvent également s'associer à PDK1 et exercer des fonctions indépendantes de l'échange de nucléotides. Bien qu'elles jouent des rôles souvent distincts, RalA et RalB peuvent induire *SRC*, *JUN*, les *STAT*, *NF-κB* ainsi que la cycline D selon un mécanisme encore inconnu. RalB est impliqué dans l'apoptose alors que RalA joue plutôt un rôle dans la croissance des cellules cancéreuses. L'activation de RalA par l'activité d'échange de nucléotide de RalGEF promeut la tumorigenèse en permettant la liaison de RalA aux sous-unités SEC5 et EXO84 du complexe exocyste (79) impliqué dans le remodelage du cytosquelette d'actine, la migration et la métastase (80).

Deux voies de signalisation distinctes peuvent découler de l'activation des RAS. Lorsque RAS est liée au GTP et localisée à la membrane, RAS peut activer l'enzyme phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui phosphoryle les lipides de la membrane des cellules et participe ultimement à la synthèse du phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) à partir du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2). PIP2 et PIP3 recrutent à la membrane la protéine kinase B (Akt), une sérine-thréonine kinase. Cette signalisation régule la survie, l'apoptose et la résistance au traitement, favorisant ainsi le développement et la progression du mélanome. En effet, la suractivation de la signalisation PI3K/AKT peut agir en synergie avec des mutations activatrices de *BRAF* et engendrent des effets comparables à une mutation activatrice de *NRAS* et augmente le caractère invasif des tumeurs. Dans ce contexte, les inhibiteurs de MAPK ne permettent pas d'éliminer les cellules cancéreuses et les patients développent parfois des mutations secondaires affectant des récepteurs à activité tyrosine kinase impliqués dans l'activation de la signalisation des MAPK (PDGFR, récepteur du facteur de croissance analogue à l'insuline de type 1 (IGF1R)). Le traitement de cellules présentant de telles mutations avec des inhibiteurs de BRAF ou de MEK induit une activation compensatoire de la signalisation PI3K/AKT et rend les cellules résistantes à l'apoptose (81, 82). Initialement sous forme inactive, AKT est phosphorylée en réponse à des facteurs de

croissance, des signaux de stress énergétique ou des dommages à l'ADN. Akt peut alors activer la cible de la rapamycine chez le mammifère (mTOR) afin de réguler le métabolisme, la croissance, la survie cellulaire et l'angiogenèse (81, 83).

La sérine/thréonine kinase mTOR est constituée de deux complexes, mTORC1 et mTORC2. Le premier est impliqué dans la synthèse des ribosomes et des protéines en phosphorylant puis inactivant la protéine 1 se liant au facteur 4E d'initiation de la traduction (4EBP1). Cette dernière, qui exerce un rôle répresseur sur la traduction, se détache alors du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (eIF4E), levant ainsi l'inhibition sur la synthèse de protéines. De plus, mTORC1 phosphoryle et active la kinase ribosomale S6 (S6K) qui lie la machinerie traductionnelle. Il régule également l'expression du facteur d'élongation eEF2, du facteur induit par l'hypoxie HIF-1 α , de la protéine du rétinoblastome Rb et du transducteur de signal et activateur de la transcription (STAT3). Ce dernier, un facteur de transcription, joue un rôle dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse, l'inflammation et la réponse immunitaire (84). Des facteurs de croissance, des hormones et certains nutriments peuvent également activer PI3K. Cette dernière active à son tour mTORC2 en favorisant sa liaison aux ribosomes. En effet, indépendamment de la synthèse de protéines, l'activité de mTORC2 dépend de sa liaison aux ribosomes dans les cellules en croissance puisque la capacité de croissance des cellules est déterminée par les ribosomes en réponse à des signaux comme l'insuline et le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1) (85). Une fois activé, mTORC2 régule la formation du cytosquelette d'actine. Ceci lui confère un rôle dans la migration, l'invasion et la métastase en plus de contrôler l'apoptose et la croissance cellulaire. L'exposition aux rayons UV active PI3K, conduisant ultimement à la phosphorylation de mTOR et de S6K. Nous observons souvent, dans le mélanome, la surexpression de 4EBP1, eIF4E ou S6K. La surexpression ou la suractivation de récepteurs de facteurs de croissance, ainsi que la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs comme PTEN, peuvent déréguler la signalisation PI3K/AKT, activer la signalisation mTOR et contribuer à la croissance tumorale et à la métastase (86).

Lorsque les conditions sont favorables à la croissance des cellules, la signalisation mTOR est activée afin de promouvoir la synthèse de macromolécules, soutenant ainsi le métabolisme et permettant aux cellules d'augmenter en taille. Au contraire, lorsque les conditions sont

défavorables, par exemple en situation de stress métabolique ou génotoxique, d'un manque d'oxygène ou d'un manque de nutriments, les cellules inhibent l'activation de mTOR afin de limiter la croissance cellulaire et d'économiser leur énergie. L'inhibition de mTOR mène à l'activation du facteur d'élongation eucaryote 2K (eEF2) et ce facteur d'élongation active l'autophagie. L'inhibition de la traduction permet à la cellule de limiter ses dépenses énergétiques en situation de stress alors que l'autophagie est une forme alternative d'énergie permettant de procurer certains nutriments, entre autres des acides aminés, aux cellules en situation de stress. L'autophagie est un procédé qui permet d'éliminer des composantes cellulaires endommagées, des protéines toxiques ou des agents pathogènes. L'autophagie est un processus à la fois pro et anti-cancer. En effet, elle permet de dégrader les composantes cellulaires anormales, mais procure également de l'énergie et des macromolécules essentielles à la croissance des cellules cancéreuses (87).

La seconde signalisation qui découle de l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase ou de RAS est la voie RAF/MEK/ERK, impliquée dans la croissance, la survie et la prolifération cellulaire. RAS active la kinase B-RAF qui participe à son tour à la phosphorylation des kinases MEK puis ERK au niveau de résidus sérine et thréonine. La kinase ERK migre au noyau où elle active des facteurs de transcription tels que c-FOS, cMYC et c-JUN, en plus de moduler l'activité de protéines impliquées dans le transport et le métabolisme de l'ARN. Dans le cytoplasme, ERK phosphoryle des composantes du cytosquelette et des jonctions adhérentes, ce qui favorise le détachement des cellules de la matrice extracellulaire (75, 88). En induisant c-FOS, cMYC et c-JUN, ERK régule l'expression de la cycline D et du complexe cyclineD-CDK4/6, menant à la phosphorylation et à l'inactivation de Rb. L'inactivation de Rb libère le facteur de transcription E2F qui induit l'expression de la cycline E et du complexe cyclineE-CDK2 dont l'activité mène à la phosphorylation et à l'induction subséquente de E2F. Cette rétroaction positive permet à la cellule de progresser adéquatement dans la phase G1 (croissance) et d'entrer dans la phase S (synthèse) du cycle cellulaire. La Figure 3 illustre les différentes branches de la signalisation des MAPKs et les procédés cellulaires qu'elle régule. Des mutations dans la signalisation MAPK, ainsi que la surexpression de certains récepteurs et facteurs de croissance, ou la perte d'expression d'un régulateur négatif de la signalisation MAPK, par exemple suite à la méthylation de son promoteur, peuvent engendrer une prolifération incontrôlée des mélanocytes et contribuer au développement du mélanome (89).

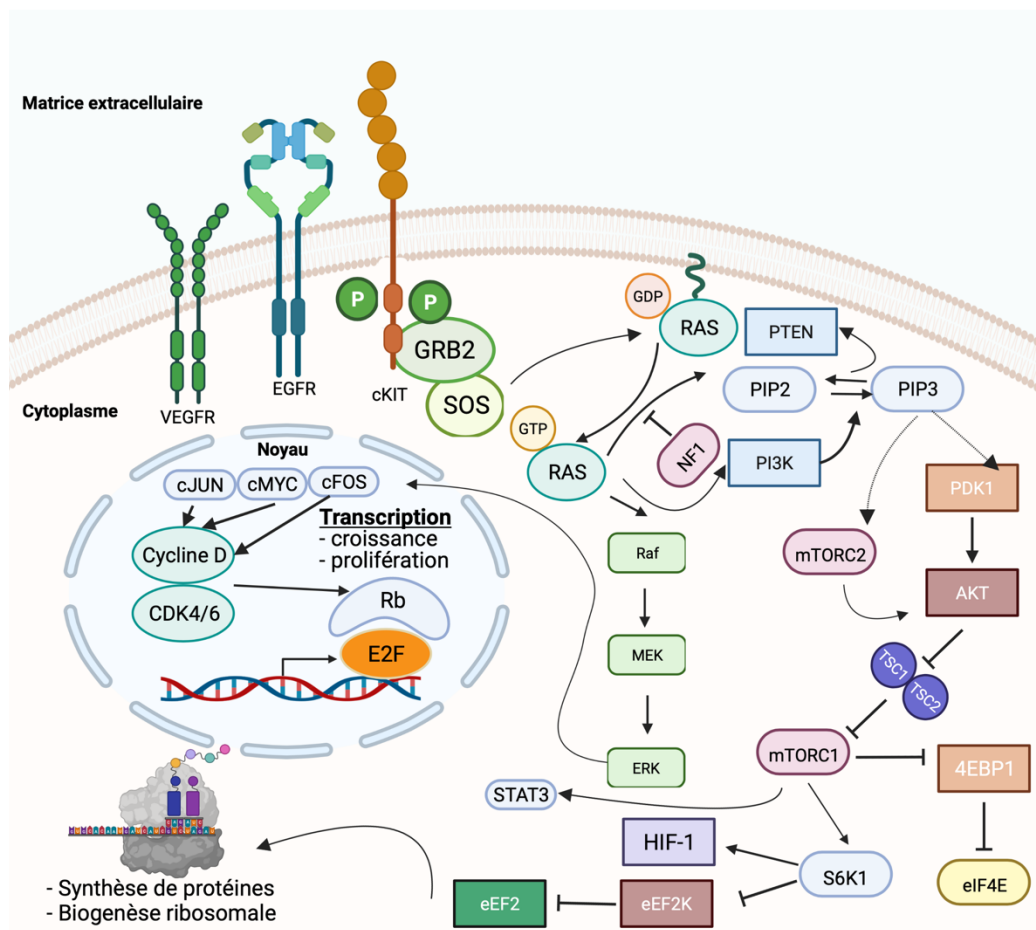


Figure 3 : Signalisation des MAPK. Des facteurs de croissance issus du TME activent différents récepteurs à activité tyrosine kinase. Ceci provoque un changement de conformation de RAS qui s'active et lie le GTP. Deux principales voies signalétiques peuvent être induites par l'activation de RAS, soit la voie PI3K/Akt/mTOR ou la signalisation RAS/RAF/MEK/ERK. Dans la première, RAS active PI3K qui phosphoryle le PIP2 en PIP3. Ceci permet le recrutement de Akt qui régule la signalisation mTOR. Ce dernier est activé dans un contexte bioénergétique favorable afin d'induire la traduction et la synthèse de protéines ainsi que l'expression de facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme, la survie et la prolifération cellulaire. La seconde signalisation induite par RAS est la voie RAS/RAF/MEK/ERK. Dans cette voie, l'activation de kinases induit des facteurs de transcription régulant l'expression de cyclines et de kinases dépendantes des cyclines. Ces dernières activent d'autres facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes du cycle cellulaire. Cette signalisation contrôle ainsi la prolifération cellulaire et peut contribuer au développement du mélanome. **GRB2** : Protéine 2 liée au récepteur du facteur de croissance, **SOS** : *Son of sevenless*, **GTP** : Guanosine triphosphate, **GDP** : Guanosine diphosphate, **RAS** : Virus du sarcome du rat, **MEK** : Kinase activée par un mitogène. **ERK** : Kinase régulée par des signaux extracellulaires, **PTEN** : Homologue de la phosphatase et tensine, **PIP₂** : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, **PIP₃** : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, **PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase, **PDK1** : Protéine kinase dépendante de PI3K, **Akt** : Protéine kinase B **TSC1** : Hamartin, **TSC2** : Tuberin, **mTORC1** : Complexe 1 de la cible fonctionnelle de la rapamycine, **mTORC2** : Complexe 2 de la cible fonctionnelle de la rapamycine, **STAT3** : Transducteur de signal et activateur de la transcription, **4EBP1** : Protéine 1 se liant au facteur 4^E d'initiation de la traduction **eIF4E** : Facteur

d'initiation de la traduction eucaryote 4^E, **S6K** : Kinase ribosomale S6. **HIF-1** : Facteur induit par l'hypoxie, **eEF2** : Facteur 2 d'élongation eucaryote, **Rb** : Rétinoblastome. Figure créée à l'aide de Biorender : www.biorender.com

1.3.6. Mutations fréquemment observées dans le mélanome

L'exposition aux rayons UV engendre des mutations distinctes et typiques, par exemple la formation de dimères de pyrimidines ou l'ajout d'une cytidine © ou d'une thymidine (T) plutôt qu'une adénosine (A) lors de la réplication de l'ADN. Les rayons UV provoquent également un stress oxydatif pouvant engendrer des dommages à l'ADN. Ces dommages contribuent aux aberrations génétiques observées dans le mélanome (90). Ces mutations affectent la prolifération et le métabolisme cellulaire en plus de soutenir des processus régulés en partie par la signalisation MAPK et favorisant la tumorigenèse, par exemple l'invasion, l'angiogenèse et l'évasion du système immunitaire. La plupart des nævus bénins présentent ainsi une suractivation de la signalisation MAPK provoquée par une mutation de *BRAF*, *NRAS*, *HRAS* ou *NFI* (voir Figure 4) (91). Si une telle mutation se présente seule, plusieurs mécanismes suppresseurs de tumeurs, tels que la réponse aux dommages à l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ou la réponse immunitaire interviennent pour empêcher la transformation d'une lésion bénigne vers un mélanome et la cellule entre en sénescence. Cependant, l'acquisition de mutations additionnelles dans certains oncogènes ou d'autres gènes régulant la chromatine peut altérer les systèmes suppresseurs de tumeurs ou empêcher la différenciation adéquate des cellules. Dans ce cas, l'ensemble des aberrations génétiques accumulées par les mélanocytes peuvent interagir avec le microenvironnement et la réponse immunitaire afin de promouvoir la progression de nævus bénins en mélanome (92).

Environ 30% des cas de mélanome émanent d'une lésion bénigne, par opposition aux autres 70% de cas qui proviennent de lésions *de novo* donc survenues spontanément (93). Seulement trois mutations à des endroits stratégiques du génome des mélanocytes suffisent à engendrer un mélanome, mais ce nombre varie considérablement d'une tumeur à l'autre et la plupart des mélanomes présentent plusieurs autres aberrations génétiques. Le mélanome est d'ailleurs le cancer présentant le plus haut taux de mutations, avec environ 30 mutations par mégabase d'ADN (94). Les mutations les plus couramment observées dans le mélanome sont celles activant la signalisation MAPK, qui sont séparées en quatre sous-types. Les mutations affectant le gène *BRAF*, une composante importante dans l'activation de la signalisation des MAPK (voir la section 1.3.5 ainsi

que les figures 3 et 4), représentent environ 50% des cas de mélanome. La substitution d'une valine par un acide glutamique à la position 600, désignée V600E, constitue 75% des mutations de *BRAF* et est présente dans la plupart des nævi mélanocytaires. Certaines études suggèrent que la mutation V600E est associée à un mauvais pronostic et à la résistance aux inhibiteurs de MAPK (95). Les mutations de *RAS* (voir Figure 4) représentent 25% des cas de mélanome; les plus fréquentes étant les mutations de *NRAS* (96). Les mutations de *NF1* représentent 10 à 15% des cas de mélanome. *NF1* est un gène suppresseur de tumeur inactivé dans certains cancers, dont le mélanome. L'inhibition de NF1 empêche l'hydrolyse du GTP lié à RAS (97) et permet à RAS de conserver une conformation active. RAS induit alors les signalisations MAPK/ERK et PI3K/Akt/mTOR (voir Figure 4). Cette mutation est associée à un taux de mortalité élevé et contribue à la résistance du mélanome aux inhibiteurs de RAF (98). Finalement, environ 10% des cas de mélanome sont qualifiés de « triple négatif ». Ceci signifie qu'ils ne présentent aucune des mutations mentionnées précédemment, mais plutôt des mutations affectant le récepteur tyrosine kinase KIT (voir Figure 4) ou des mutations de *GNAQ*, qui encode pour la sous-unité alpha de la protéine de liaison de la guanine (Gq). Finalement, on observe également des mutations de l'homologue de *GNAQ*, *GNAI1*. *GNAQ* et *GNAI1* codent pour des protéines G du même nom qui, lorsqu'elle est activée, peut activer des protéines qui dégradent le GTP, activer ERK et exercer des effets pro-oncogéniques (99). Ces mutations activent les signalisations MAPK/ERK et PI3K/Akt/mTOR, participant ainsi à la prolifération et à la progression tumorale (100, 101).

On retrouve également, dans le mélanome, certaines mutations provoquant une perte de fonction. *CDKN2A* est le plus important gène de susceptibilité impliqué dans la plupart des cas familiaux de mélanome. Il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur qui encode pour deux protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, p16^{INK4A} (P-16) et p14^{ARF} (P-14) (102). La première, P-16, entrave la progression du cycle cellulaire (voir section 1.3.2). La seconde, P-14, active le suppresseur de tumeur p53, qui répond aux dommages à l'ADN provoqués par les rayons UV et est impliqué dans plusieurs processus cellulaires tels que l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence. En effet, p53 peut réguler le cycle cellulaire en activant p21, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines, ce qui empêche les transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire. La mutation la plus commune touchant *CDKN2A* est une délétion causant la perte des régions codant pour P-14 et P-16. La présence d'îlots CpG rend le promoteur de *CDKN2A*(P-16) sensible

à la méthylation, ce qui empêche également la transcription et l'expression de la protéine. *CDKN2A* peut également subir des mutations non-sens et faux-sens affectant particulièrement P-16. Ainsi, les mutations de *CDKN2A* peuvent participer à la progression du mélanome et, avec les mutations *NRAS*, peuvent diminuer la réponse aux inhibiteurs de BRAF (103, 104). On remarque également, dans la plupart des cas de mélanome, une perte de fonction du suppresseur de tumeur PTEN (voir Figure 4) qui inhibe la signalisation PI3K/Akt. L'inhibition de PTEN active PI3K qui agit en synergie avec *BRAF^{V600E}*. Par conséquent, l'activation de PI3K participe à la résistance aux inhibiteurs de BRAF (sera abordé plus en détail à la section 1.3.7.2.2). Ainsi, cibler simultanément les signalisations RAF/MEK/ER et PI3K/Akt pourrait rétablir l'apoptose chez les cellules cancéreuses résistantes aux inhibiteurs de BRAF (81).

1.3.7. Traitements actuels du mélanome

Détecté à un stade précoce, un mélanome localisé en superficie de la peau ou au niveau de ganglions lymphatiques à proximité peut être réséqué. Dans ce cas, le patient peut être guéri par la chirurgie uniquement et le pronostic est favorable. À un stade avancé de la maladie, cependant, les options de traitement sont limitées et le pronostic est beaucoup plus sombre. En effet, peu de patients atteignent la rémission et le mélanome est résistant à la plupart des thérapies systémiques. Heureusement, certains agents thérapeutiques se sont distingués et ont engendré une réponse favorable à long terme chez certains sous-groupes de patients (105).

1.3.7.1. Chimiothérapie

Il existe différentes formes de chimiothérapie, soit la chimiothérapie à agent unique, la polychimiothérapie et la chimiothérapie adjuvante. La polychimiothérapie consiste à administrer, chez une même personne, une combinaison de quelques agents thérapeutiques agissant selon différents mécanismes d'action dans le but de limiter la résistance au traitement et d'induire une réponse favorable. La thérapie adjuvante, quant à elle, est utilisée après avoir réséqué une tumeur chirurgicalement, afin de limiter les chances de récurrence.

Aux États-Unis, la dacarbazine est l'agent chimiothérapeutique le plus couramment utilisé pour le traitement du mélanome métastatique (106). Il s'agit d'un composé de la classe des agents alkylants. Bien que nous ne connaissions pas le mécanisme d'action exact de la dacarbazine, il pourrait agir en ajoutant un groupe méthyl de manière covalente au niveau de guanines. Ceci perturbe les liens hydrogènes entre la guanine et la cytosine et la guanine méthylée se lie plutôt avec la thymine. Ce mésappariement provoque des mutations. Ces mutations sont cependant prises en charge par les mécanismes de réparation de l'ADN, ce qui contribue à la résistance au traitement (107). Un analogue de la dacarbazine, le temozolomide, a la capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, il peut être utilisé pour traiter des métastases au cerveau communément observées dans le mélanome (108).

Le cisplatine et le carboplatine sont deux agents thérapeutiques de la classe des dérivés du platine qui peuvent être utilisés en chimiothérapie unique pour le traitement du mélanome métastatique. Les dérivés du platine se lient à l'ADN de manière covalente, précisément au niveau de l'azote 7 des guanines, et entraînent la formation de ponts intra et inter-brins qui perturbent la structure en double hélice de l'ADN. Ainsi, le cisplatine et le carboplatine perturbent la réplication et la transcription de l'ADN (109).

La vincristine, de son côté, est un « poison du fuseau mitotique » de la classe des vinca alkaloides. Elle inhibe la tubuline et bloque la synthèse des microtubules, ce qui empêche les cellules de progresser au-delà de la phase M du cycle cellulaire. La vincristine exerce des effets antitumoraux dans plusieurs cancers hématologiques et tumeurs solides, dont le mélanome. Elle peut être utilisée seule, mais est le plus souvent administrée en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques ou biologiques (110).

Finalement, le paclitaxel, un composé de la classe des taxanes, exerce un effet anti-tumoral modéré chez les patients atteints de mélanome métastatique. Les taxanes se fixent à la tubuline et, contrairement aux vinca alkaloides, favorisent la polymérisation des microtubules. Ces microtubules ne sont cependant pas fonctionnels et activent le point de contrôle du fuseau mitotique. Ce point de contrôle est activé lors de perturbations dans la répartition du matériel

génétique au cours de la division cellulaire. Ainsi, paclitaxel arrête la réplication des cellules et entraîne leur mort (111).

1.3.7.2. Thérapies ciblées

Les inhibiteurs de RAS

La signalisation MAPK fait intervenir, dans cet ordre, les protéines RAS, RAF, MEK et ERK (voir section 1.3.5 et Figure 3). Un dysfonctionnement de la signalisation MAPK, soit causée par des mutations BRAF et NRAS ou par des modifications épigénétiques, est souvent observé dans le mélanome. Tel que vu précédemment, des mutations affectant *NFI* et *KIT* peuvent également moduler cette signalisation (voir section 1.3.6). Plusieurs molécules permettant d'inhiber l'activité de la protéine RAS mutée existent, mais leur efficacité est limitée. L'activation et le recrutement à la membrane de RAS nécessitent la prénylation, soit le couplage d'un groupement farnésyl à l'extrémité carboxy-terminale de résidus cystéine par la farnésyltransférase (FT), et des inhibiteurs de la FT exerceraient des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques qui potentialiseraient l'effet de certaines chimiothérapies (112). Par exemple, le SCH66336 (Lonafarnib) (voir Figure 4) engendre la formation de fibres de stress, composées d'actine et de myosine, altérant la morphologie des cellules de mélanome. Les inhibiteurs de FT induisent également une accumulation de P-21 (113) indépendante de RAS ainsi qu'une induction de P-27 (114), deux inhibiteurs de CDK qui inhibent l'activité des complexes cycline/CDK, empêchant ainsi la transition G1/M du cycle cellulaire.

Des inhibiteurs directs de RAS furent également testés en clinique. Par exemple, BMS-214662 inhibe HRAS (voir Figure 4), alors que L-778123 inhibe KRAS (voir Figure 4). BMS-214662 engendre des effets secondaires importants comme la nausée, la diarrhée, des vomissements, des douleurs abdominales, une perte d'appétit, de la fatigue et de la fièvre (115). L-778123 engendre quant à lui des toxicités cardiaques caractérisées par l'élongation de l'intervalle QT corrigé pour la fréquence cardiaque (QTc) (116). L'intervalle QT correspond à la phase de contraction du cœur et varie en fonction de la fréquence cardiaque. Un allongement de l'intervalle QT est une forme d'arythmie caractérisée par des battements rapides et désorganisés des ventricules pouvant mener à une mort subite (117). L'efficacité de ces molécules pour le traitement du mélanome est

cependant limitée, étant donné que le mélanome présente le plus souvent des mutations *NRAS* et non les mutations *HRAS* et *KRAS* ciblées par ces molécules, et que des mécanismes alternatifs peuvent activer les protéines RAS chez les cellules traitées avec un inhibiteur de RAS, favorisant ainsi la progression tumorale et la résistance au traitement (75).

Les inhibiteurs de RAF

La famille RAF est quant à elle constituée de ARAF, BRAF, et CRAF (ou RAF-1). Plus de 60% des mélanomes avancés présentent une mutation de *BRAF*, la plus commune étant la substitution d'une valine par l'acide glutamique (V600E). L'activité de BRAF^{V600E} est indépendante de RAS et la protéine mutée est dix fois plus active que sa contrepartie non mutée, ce qui mène à une activation constitutive de la voie MAPK et par conséquent promeut le développement du mélanome en favorisant la survie et la prolifération cellulaire. Certaines molécules permettent d'inhiber BRAF^{V600E} et présentent une certaine efficacité clinique. Sorafenib est un inhibiteur de kinase originalement conçu pour cibler la mutation V600E de *BRAF* ainsi que sa forme non mutée. Certaines études ont ensuite montré que Sorafenib cible également des récepteurs à activité tyrosine kinase impliqués dans l'angiogenèse (VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR) ainsi que d'autres récepteurs impliqués dans la progression tumorale. (118, 119). Les résultats de ces dernières études suggèrent que les effets anti-tumoraux de Sorafenib pourraient être indépendants de l'inhibition de BRAF. D'autres inhibiteurs de BRAF, plus puissants et plus sélectifs, ont par conséquent été développés, dont PLX4032 (Vémurafénib) (voir Figure 4) et PLX4720 (95). PLX4032 empêche la croissance de tumeurs présentant une mutation de *BRAF* de façon dépendante de la dose dans un modèle de xénogreffe en plus de présenter un profil pharmacocinétique intéressant dans les modèles animaux. Dans un essai clinique de phase I, parmi les 32 patients atteints de mélanome présentant une mutation de *BRAF* et ayant été traités avec PLX4032, 24 ont atteint une rémission partielle et 3 ont atteint une rémission complète (120).

Les inhibiteurs de MEK

Les patients traités avec des inhibiteurs de BRAF développent rapidement des résistances, par exemple en raison d'une réactivation de la signalisation des MAPK. De plus, les inhibiteurs de

BRAF peuvent engendrer, de manière paradoxale, une activation de la signalisation des MAPK. Il existe différentes formes de RAF, soient A-RAF, B-RAF et C-RAF. De manière paradoxale, le traitement avec un inhibiteur de RAF dans des cellules qui expriment CRAF peut provoquer l'homodimérisation de ce dernier et induire son activité, ce qui conduit à la phosphorylation et à l'activation de MEK. Les inhibiteurs de RAF actuellement se dissocient trop rapidement pour permettre une inhibition adéquate de CRAF et empêcher l'activation de MEK subséquente, ce qui promeut la croissance tumorale (121). Ceci peut également engendrer des tumeurs secondaires, par exemple des CSP (122).

Néanmoins, quelques inhibiteurs de MEK ont été développés. Cependant, les inhibiteurs de MEK offrent souvent peu de bénéfices aux patients par leur manque d'efficacité. De plus, puisque la signalisation des MAPK est également essentielle à la survie des cellules saines de l'organisme, les inhibiteurs de MEK ont un index thérapeutique étroit (123). Cependant, certaines molécules se sont démarquées et sont aujourd'hui utilisées en clinique. Le Trametinib est inhibiteur sélectif de MEK1/2 administrée par voie orale. Même administré seul, ce dernier est efficace que la chimiothérapie pour le traitement des tumeurs présentant une mutation de *BRAF*, par exemple *BRAF^{V600E}* ou *BRAF^{V600K}*. Il permet une survie sans progression de 4.8 mois et augmente la survie à six mois (124). Plusieurs autres inhibiteurs de MEK ont également été développés, par exemple le selumetinib, le MEK162, le cobimetinib, le pimasertinib, le E6201, le TAK733, etc (125). Le selumetinib est un autre inhibiteur sélectif de MEK1/2 supposé être également efficace pour le traitement des tumeurs présentant une mutation de RAS ou de RAF. Administré seul, la molécule s'est toutefois montrée peu efficace en clinique lors d'une étude de phase II. Or, une seconde étude a montré que le selumetinib engendre une réponse partielle dans des tumeurs présentant à la fois une mutation de BRAF et une faible expression d'Akt (126), suggérant que la combinaison du selumetinib avec un inhibiteur de PI3K/Akt pourrait engendrer des résultats positifs. Depuis, plusieurs études cliniques se sont intéressées à la combinaison de thérapies, par exemple la combinaison d'un inhibiteur de MEK avec de la chimiothérapie, des inhibiteurs de RAF ou l'immunothérapie.

Combinaison de thérapies

Des études cliniques ont montré que la combinaison d'un inhibiteur de RAF, par exemple le dabrafenib, avec un inhibiteur de MEK, par exemple Trametinib, est plus efficace qu'un inhibiteur de RAF administré seul pour le traitement de tumeurs présentant une mutation de *BRAF* (127, 128). Une autre étude clinique de phase 3 a montré que la combinaison du Vémurafénib et de cobimetinib est plus efficace que le Vémurafénib seul et allonge la période de survie sans progression chez des patients souffrant de mélanome présentant une mutation de *BRAF* (129). L'immunothérapie est une stratégie qui tente de rétablir la réponse immunitaire antitumorale en ciblant les molécules de points de contrôle immunitaire, par exemple le ligand de mort cellulaire programmée de type 1 (PD-L1), la protéine 1 de mort cellulaire programmée (PD-1) ou CTLA-4. L'immunothérapie représente une percée majeure pour le traitement du mélanome et son principe de fonctionnement sera détaillé à la section suivante (section 1.3.7.3). Une étude clinique de phase 1 a montré que la combinaison d'anticorps anti-PD-L1 avec le Trametinib ou le dabrafenib est plus efficace que le Trametinib ou le dabrafenib seul pour le traitement du mélanome présentant une mutation de *BRAF* (130). Une autre étude clinique de phase I a comparé la combinaison d'un anticorps anti-PD-L1 avec le Vémurafénib ou le cobimetinib par rapport à l'administration d'un inhibiteur de kinase seul et est arrivée au même constat. Malheureusement, la combinaison d'un inhibiteur de kinase avec un inhibiteur des points de contrôle immunitaire s'accompagne souvent d'effets indésirables importants (131).

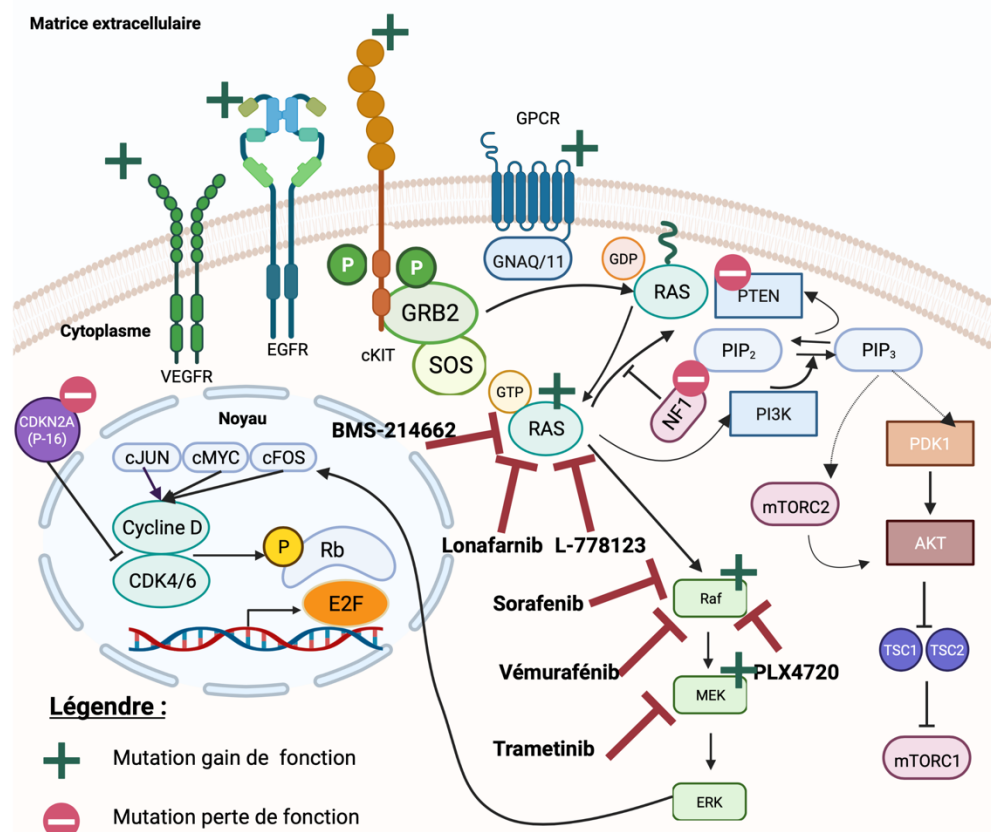


Figure 4 : Mutations les plus communes de la signalisation des MAPK dans le mélanome et thérapies ciblant les récepteurs ou protéines constitutivement activées. La signalisation MAPK est la plus communément mutée dans le mélanome, et sa suractivation entraîne la prolifération incontrôlée des mélanocytes. Ceci englobe les mutations BRAF, NRAS, HRAS et NF1, la plus commune étant la mutation ^{V600E}B-RAF. La signalisation MAPK dépend de l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que PDGFR, VEGFR ou cKIT, qui peuvent également être la cible de mutations activatrices dans le mélanome. L'activation de ces récepteurs entraîne un changement de conformation de RAS, qui devient actif. La mutation de RAS provoque l'activation constitutive de la signalisation MAPK. L'activation et le recrutement à la membrane de RAS peuvent être ciblés par des anticorps ou des inhibiteurs enzymatiques tels que BMS-214662, Lonafarnib et L778123. L'activation de RAS peut activer les signalisations RAF/MEK/ERK1/2 et PI3K/Akt/mTOR qui ensemble régulent le cycle cellulaire, le métabolisme et la synthèse de protéines afin d'assurer la croissance et la prolifération cellulaire. Dans la voie RAF/MEK/ERK1/2, la mutation V600E peut être inhibée par Sorafenib, Vémurafénib et PLX4720. Une mutation par perte de fonction de PTEN induit l'activation constitutive de la signalisation PI3K/Akt/mTOR. Cette dernière est impliquée dans la traduction et la synthèse de protéines via mTOR, mais joue également un rôle dans l'immunosuppression en induisant STAT 3 et NF-κB. **GRB 2** : Protéine 2 liée au récepteur du facteur de croissance. **SS** : Son of sevenless, **GP** : Guanosine triphosphate, **GD** : Guanosine diphosphate, **RS** : Virus du sarcome du rat, **MK** : Kinase activée par un mitogène. **EK** : Kinase régulée par des signaux extracellulaires, **PTN** : Homologue de la phosphatase et tensine, **PI₂** : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate, **PI₃** : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, **PIK** : Phosphoinositide 3-kinase, **PKD** : Protéine kinase dépendante de PI3K, **Akt** : Protéine kinase B **TSC1** : Hamartin, **TSC2** : Tuberin, **mTOR1** : Complexe 1 de la cible fonctionnelle de la rapamycine, **mTOR2** : Complexe 2 de la cible fonctionnelle de la rapamycine, **GCR** : Récepteur couplé aux protéines G, **GαQ** : Sous-unité alpha de la protéine de liaison de la guanine (Gq). Figure créée à l'aide de Biorender : www.biorender.com

1.3.7.3. Immunothérapie

L'immunothérapie représente la troisième plus grande percée dans le traitement du cancer après la chimiothérapie et les thérapies ciblées. Elle inclut notamment des anticorps ciblant des molécules de points de contrôle immunitaire telles que PD-L1, PD-1 et CTLA-4 (voir section 1.5.1) (132). Elle inclut également le transfert de cellules immunitaires génétiquement modifiées et les vaccins. L'immunothérapie constitue la forme de traitement la plus efficace pour le mélanome, et représente souvent la seule option pour les stades avancés de la maladie comme le stade métastatique. Comme son nom le suggère, l'immunothérapie consiste à déjouer les mécanismes de défense mis en place par les cellules cancéreuses pour s'évader du système immunitaire (133).

Nous sommes constamment exposés à des antigènes, par exemple des corps étrangers, des parasites, des virus ou des bactéries. Normalement, les antigènes sont reconnus par les cellules du système immunitaire et engendrent une réponse nous permettant de nous débarrasser des infections. Les cellules cancéreuses constituent également une substance étrangère pouvant être reconnue et éliminée par le système immunitaire. En effet, les cellules cancéreuses peuvent produire des antigènes exprimés à la surface des cellules ou libérés dans le sang. Les antigènes produits par les cellules cancéreuses sont regroupés en deux catégories en fonction de leur profil d'expression, soient les antigènes spécifiques aux tumeurs et les antigènes associés aux tumeurs. Les antigènes spécifiques sont le produit de gènes normalement exprimés dans le génome humain, mais qui ne sont pas exprimés dans les tissus normaux chez l'adulte. Cette catégorie inclut également des gènes présents en plusieurs copies dans les cellules cancéreuses, ainsi que des gènes présentant des mutations ponctuelles conduisant à une protéine anormale reconnue comme étrangère. Les antigènes associés aux tumeurs sont normalement faiblement exprimés dans les tissus sains, mais sont surexprimés dans les cellules cancéreuses (134).

Les cellules dendritiques sont recrutées au site tumoral suite à la sécrétion de chimiokines comme CCL4 et CCL5 par les cellules cancéreuses (135, 136). Ces chimiokines, ainsi que les DAMP relâchés par les cellules endommagées au site tumoral, participent à la maturation des cellules dendritiques. Les antigènes tumoraux sont détectés par les cellules dendritiques et interagissent avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CHM) présent à la surface des cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques matures rejoignent les ganglions lymphatiques afin de présenter l'antigène aux lymphocytes T et de les activer via la formation de la synapse immunologique décrite à la section 1.5.1. Trois antigènes spécifiques au mélanome, soient la tyrosinase, MART-1 (*melanoma-associated antigen recognized by T cells*) et MAGE (*melanoma associated antigen*) ont été essayés en clinique et les cellules dendritiques transfectées avec ces antigènes activent tant les lymphocytes T CD8⁺ que CD4⁺ qui reconnaissent efficacement les cellules cancéreuses (137).

Les cellules cancéreuses ont développé certains mécanismes afin d'éviter d'être reconnues et éliminées par le système immunitaire. Par exemple, la prostaglandine 2 (PGE2) est un lipide impliqué dans la prolifération cellulaire et l'immunosuppression. PGE2 est produite par les cyclooxygénases (COX)-1 et 2 en réponse à des signaux inflammatoires et de danger. Le manque d'oxygène auquel sont soumises les cellules cancéreuses provoque la nécrose et induit les COX. COX-2 et PGE2 sont surexprimées dans le cancer. En effet, les cellules nécrotiques produisent une grande quantité de PGE2, ce qui inhibe l'expression et la relâche du facteur de nécrose tumoral (TNF)- α par les macrophages (138). PGE2 inhibe également la réponse interféron induite lors de l'activation des TLR, ce qui sera abordé plus en détail à la section 1.5.2. Finalement, COX-2 promeut la sélection de macrophages de type M2 (voir section 1.5), ce qui inhibe la réponse immunitaire anti-tumorale et promeut la croissance tumorale (139). Des cytokines, par exemple le facteur de croissance transformant (TGF)- β , IL-6 et IL10 perturbent la différenciation et la maturation des cellules dendritiques (140-142), contribuant également à l'immunosuppression du TME.

L'interféron (INF)-gamma active le transducteur de signal et activateur de la transcription (STAT1) qui induit la transcription de gènes codant pour des protéines de la machinerie de présentation antigénique, notamment les CMH. Certaines mutations engendrent des défauts de la présentation antigénique. Par exemple, la surexpression de *DUX (Double Homebox)*, perturbe la signalisation d'INF γ (143). De plus, on retrouve souvent, dans le cancer, des délétions du domaine CARD (domaine de recrutement des caspases) de la famille des récepteurs de type NOD (NLRC5), normalement impliqué dans l'activation de la machinerie de présentation antigénique (144). Les cellules cancéreuses ont la particularité d'augmenter leur expression de PD-1 et de CTLA-4, deux points de contrôle immunitaire qui inhibent la réponse immunitaire dont l'expression est régulée

par internalisation et recyclage (145) et ubiquitination (146). L'activation des lymphocytes T nécessite trois signaux donnés par les cellules présentatrices d'antigène. Le premier signal est l'antigène lié au CMH présenté à la surface des cellules présentatrices d'antigène qui est reconnu par le récepteur des lymphocytes T (TCR). Un signal de co-stimulation est fourni par la liaison de CD28, exprimé par les lymphocytes T, à ses ligands, CD80 et CD86, exprimés par les cellules présentatrices d'antigène. Un premier signal d'inhibition est fourni par la liaison de PD-1, exprimé par les lymphocytes T, à son ligand (PD-L1, PD-L2). (147). La liaison de PD-L1 ou PD-L2 à leur récepteur respectif inhibe les signaux d'activation provenant du TCR et de CD28. L'antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique (CTLA-4) compétitionne avec CD28 pour la liaison avec CD80 et CD86 et la liaison de CTLA4 avec CD28 inhibe le signal de co-stimulation. Les points de contrôle immunitaire inhibent l'activité des lymphocytes T afin de limiter l'intensité et la durée de la réponse immunitaire et ainsi éviter l'auto-immunité (148). Cependant, les cellules cancéreuses peuvent également exprimer PD-L1 (149) et ainsi inhiber l'activité des lymphocytes T via PD-1. Plusieurs stratégies ont été élaborées afin d'inhiber l'expression et l'activité des points de contrôle immunitaire afin d'activer les lymphocytes T CD8⁺ à reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses. Une avenue envisagée est de moduler l'expression des points de contrôle en inhibant leur dégradation ou en favorisant leur glycosylation (150), la glycosylation de PD-L1 étant essentielle pour assurer sa stabilité et son expression.

Les anticorps anti-CTLA4 et anti-PD1 sont cependant la forme la plus commune d'immunothérapie et permettent la plus grande chance de survie après cinq ans. Les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire favorisent l'activation des lymphocytes T CD8⁺ dont l'effet cytotoxique permet d'éliminer les cellules cancéreuses. Plusieurs études cliniques montrent que l'ipilimumab, un anti-CTLA4, améliore à long terme la survie de patients atteints de mélanome métastatique pour lequel il n'y avait auparavant pas de traitement efficace (151-153). La combinaison d'anti-CTLA4 et d'anti-PD-1 permet d'augmenter l'efficacité et l'intensité de la réponse conduisant à une diminution importante de la taille de la tumeur, mais s'accompagne également de toxicités importantes. En effet, étant donné le mode d'action de l'immunothérapie, les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire peuvent engendrer une auto-immunité (154).

1.3.8. Défis du traitement du mélanome

1.3.8.1. Détection précoce

Le mélanome comprend plusieurs sous-types de lésions qui diffèrent par leur épidémiologie, leur manifestation clinique et leur progression. Il est donc essentiel de pouvoir adéquatement distinguer chaque sous-type, connaître les facteurs environnementaux augmentant le risque de développer chacun d'eux et mieux comprendre les signalisations déterminant leur évolution. L'histopathologie, méthode largement utilisée pour diagnostiquer le mélanome, présente des limitations provoquant une mésentente entre les pathologistes concernant le diagnostic de mélanome et de nevi bénins, soulignant le besoin d'identifier de nouveaux marqueurs permettant d'encadrer le diagnostic. Ceci permettrait d'augmenter la précision du diagnostic de diminuer le taux de faux positifs, qui résulte souvent en des chirurgies inutiles et un stress psychologique pour le patient, ainsi que de diminuer le taux de faux négatifs augmentant la morbidité (155).

1.3.8.2. Métastase

La métastase est la principale cause de décès liés au mélanome. L'âge, le sexe et la localisation de la tumeur constituent les principaux facteurs qui influencent les chances de réapparition du cancer. Les cellules de mélanome peuvent migrer vers des sites locaux comme les tissus sous-cutanés ou les ganglions lymphatiques, ainsi qu'à des sites distants comme les poumons, le cerveau, le foie, les os ou les intestins. Les chances de survie à un an pour les patients qui ont une métastase à un, deux ou trois sites distants sont respectivement de 36, 13 et 1%. Les métalloprotéinases matricielles (MMP) présentes dans le TME, notamment MMP-9, participent au remodelage de la matrice extracellulaire favorisant l'initiation et la progression tumorale. Les MMPs dégradent la membrane basale, stimulent l'invasion et participent à la vascularisation des tumeurs. Elles initient la transition épithélio-mésenchymateuse en dégradant des molécules d'adhésion telles que les intégrines et en induisant des cytokines comme TGF- β . Les intégrines permettent les interactions entre les cellules et avec la matrice extracellulaire. Les différentes intégrines exprimées à la surface des cellules de mélanome favorisent la migration des cellules de mélanome vers un organe spécifique donnant chacune des métastases distinctes. Par exemple, les cellules qui expriment

l'intégrine $\beta 1$ métastasent aux poumons, alors celles qui expriment plutôt l'intégrine $\beta 3$ se propagent aux nœuds lymphatiques (156, 157).

1.3.8.3. Résistance aux traitements

Près de la moitié des mélanomes présentent une mutation de la protéine BRAF, et ces mutations peuvent être ciblées par molécules telles que Vémurafénib, dabrafénib, et Encorafénib (82) (voir section 1.3.7.2). L'effet est cependant de courte durée et le temps médian entre le début du traitement et la progression de la maladie varie entre 5.1 et 8.8 mois (158). La résistance aux thérapies ciblées est une cause fréquente de l'échec du traitement et peut être engendrée par une mutation secondaire, une modification épigénétique du gène ciblé, une modification du métabolisme de la drogue ou par l'activation de voies alternatives compensant l'inhibition de la protéine ciblée par le traitement. Les cellules de mélanome résistantes aux inhibiteurs de BRAF peuvent réactiver la signalisation MAPK indépendamment de BRAF via la surexpression de CRAF et de ARAF, deux isoformes de RAF permettant aux cellules résistantes de conserver l'activité des MAPKs et promouvoir la prolifération (159) (voir section 1.3.7.2). Ces cellules sont toutefois sensibles aux inhibiteurs de MEK. Ces derniers permettent d'empêcher la progression de la maladie sans toutefois permettre la régression du cancer, ce qui suggère l'activation d'autres mécanismes permettant de contourner la signalisation MAPK. En effet, le traitement avec des inhibiteurs de BRAF engendre la sélection d'un sous-type de cellules cancéreuses qui surexpriment certains RTKs, notamment EGFR et PDGFRB, qui activent les signalisations RAS/MEK/ERK et PI3K/AKT (160). Les RTKs promeuvent la survie des cellules cancéreuses en induisant l'expression du facteur anti-apoptotique Mcl-1, ce qui mène à l'amplification des cellules résistantes aux inhibiteurs de B-RAF.

L'activation d'autres isoformes de RAF, telles que ARAF ou CRAF, en plus de la suractivation de CRAF, peuvent mener à la réactivation de la signalisation MAPK et rétablir la prolifération (voir section 1.3.7.2). Les mutations de *NRAS* peuvent également activer la signalisation MAPK. Puisque les cellules présentant une mutation de *NRAS* ne sont pas affectées par les inhibiteurs de BRAF, les cellules présentant une mutation de *NRAS*, d'abord peu nombreuses, peuvent être sélectionnées et amplifiées en réponse à un traitement avec un inhibiteur de BRAF (161). On remarque, chez 51% à 58% des patients atteints de mélanome métastatique présentant la mutation

*V600E**BRAF*, un vaste éventail d'altérations génétiques pouvant réactiver la signalisation MAPK et PI3K/AKT (162) même suite à un traitement avec Vémurafénib ou dabrafénib. Ces altérations incluent des mutations *NRAS*, des mutations *MAPK2K1* et *MAPK2K2* (163), une amplification de *BRAF* (164), des mutations *KRAS* (165), une réactivation de ERK (166), une perte de fonction de PTEN (167) pouvant réactiver la signalisation PI3K/Akt, des mutations ou une amplification de AKT, etc.

La mutation *V600E**BRAF* favorise l'évasion du système immunitaire. Il importe de noter qu'autant les inhibiteurs de BRAF que de MEK ont des effets bénéfiques sur l'immunité anti-tumorale et le microenvironnement tumoral. Le traitement avec des inhibiteurs de BRAF peuvent engendrer une augmentation de l'expression d'antigènes tumoraux tels que MART, TYRP1, TYRP2, et Gp100, une infiltration des cellules T CD8⁺ (voir section 1.3.7.3), une augmentation des molécules cytotoxiques sécrétées par les cellules T comme perforine et granzyme B et diminuer l'expression de cytokines immunosuppressives, mais peut également induire l'expression du ligand immunosuppresseur PDL1 (168) et ainsi augmenter les chances de rechute. Les inhibiteurs de BRAF activent la signalisation MAPK dans les macrophages via l'expression de VEGF qui stimule la croissance cellulaire des macrophages et des cellules de mélanome. Les macrophages activés sécrètent des facteurs tels que facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines ou des protéinases, ce qui favorise la résistance aux inhibiteurs de BRAF et assombrit le pronostic des patients (162).

1.3.9. Hétérogénéité du mélanome

Les dommages à l'ADN engendrent une instabilité génomique pouvant provoquer des mutations. Ces mutations peuvent être ponctuelles, et dans ce cas elles ne touchent qu'un ou quelques nucléotides. Cependant, d'autres mutations peuvent affecter le génome entier. Certaines de ces mutations confèrent un avantage de survie aux cellules cancéreuses (169). Les tumeurs sont composées de différentes sous-populations de cellules, nommées « clones », chacun présentant des caractéristiques, notamment des altérations génétiques pouvant provoquer des changements phénotypiques, qui lui sont propres. On qualifie ce phénomène d'hétérogénéité intratumorale (170). Certaines cytokines et facteurs de croissance présents dans le microenvironnement tumoral,

par exemple le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , TGF- β ou le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), participent à l'hétérogénéité tumorale en favorisant la sélection et la croissance d'un clone par rapport à un autre (171). Les thérapies anti-cancéreuses imposent une pression de sélection et les clones qui prospèrent sont ceux qui possèdent une résistance intrinsèque aux traitements ou ceux présentant des aberrations génétiques leur fournissant les outils nécessaires pour survivre dans un environnement hostile. Dans tous les cas, la pression de sélection promeut la prolifération des clones les plus aptes à s'adapter à leur environnement, ce qui contribue à la résistance aux traitements (172). De plus, certaines mutations typiques des cellules cancéreuses altèrent le métabolisme (173, 174) afin de leur permettre de proliférer dans un environnement hostile, souvent dépourvu de nutriments et d'oxygène. L'hétérogénéité tumorale engendre donc différents profils métaboliques impliqués à plusieurs niveaux dans la métastase et la résistance aux traitements.

1.4. Reprogrammation métabolique dans le mélanome

1.4.1. Remodelage métabolique et effet Warburg

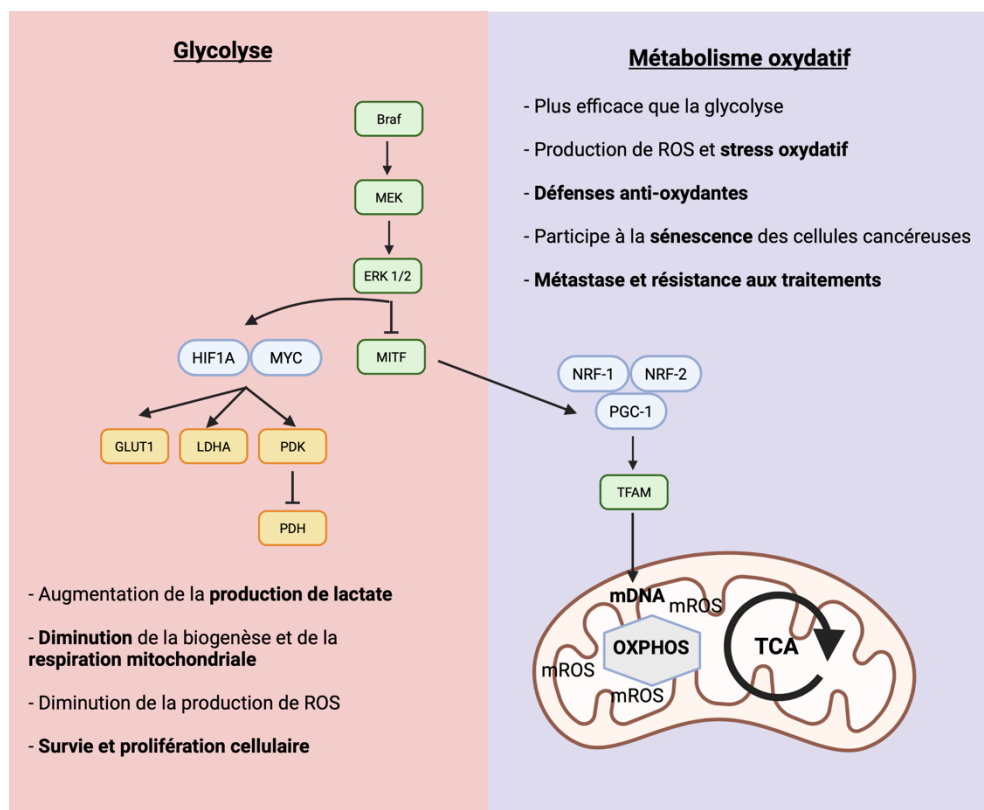
Les cellules cancéreuses prolifèrent rapidement, ce qui nécessite un métabolisme important et une grande production d'énergie. Les cellules cancéreuses présentent une augmentation de la consommation de glucose qu'elles fermentent sous forme de lactate, et ce, même en présence d'oxygène et de mitochondries fonctionnelles. On qualifie ce phénomène d'effet Warburg, qui fournit aux cellules cancéreuses l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire pour activer les voies de biosynthèse impliquées dans la prolifération et la progression tumorale (175). Cette particularité est souvent exploitée en imagerie médicale, notamment avec les IRM, les PET scan ou les CT scan, puisque les cellules cancéreuses, qui consomment plus de glucose que les cellules saines, absorbent un analogue du glucose, le FDG, qui ne peut être métabolisé et reste emprisonné à l'intérieur de la cellule, ce qui permet de visualiser les tumeurs (176). Pour soutenir un tel métabolisme, certains oncogènes tels que *RAS*, *Myc* ou le facteur induit par l'hypoxie (*HIF1A*), induisent le transporteur de glucose de classe 1 (GLUT-1) et certaines enzymes de la glycolyse telles que l'hexokinase (HK), la pyruvate kinase (PK), la phosphofructokinase 1 (PFK1) (voir Figure 5) et la lactate déshydrogénase A (LDHA) (92, 177). Ainsi, l'activation de certains proto-oncogènes et l'hypoxie

seraient à l'origine de l'induction de la glycolyse observée chez les cellules cancéreuses et l'inhibition d'enzymes de la glycolyse restaurerait l'OXPPOS.

L'effet Warburg est donc une altération métabolique réversible qui semble jouer un rôle central dans la croissance tumorale et la métastase. Certaines études envisagent ainsi d'exploiter l'effet Warburg comme cible thérapeutique pour le traitement de certains cancers. Par exemple, des analogues du pyruvate activent la pyruvate déshydrogénase (PDH), responsable de métaboliser le pyruvate en AcCoA par décarboxylation oxydative. Ce dernier alimente le cycle de l'acide citrique et induit un remodelage métabolique en faveur d'un métabolisme mitochondrial oxydatif et de l'oxydation du glucose. Le métabolisme mitochondrial ainsi induit augmente la production de ROS et engendre la mort de la cellule par apoptose. Des inhibiteurs de la glycolyse comme le 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG), ainsi que l'inhibition de certaines enzymes de la glycolyse, peuvent créer une synergie avec différents agents chimiothérapeutiques afin d'induire l'OXPPOS et engendrer un stress oxydatif toxique, empêchant ainsi la progression tumorale (178).

La mutation de *BRAF* entraîne une augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate, en plus de diminuer la densité et la fonction mitochondriale ainsi que l'expression d'enzymes de l'OXPPOS (voir Figure 5). Ceci suggère que cette mutation diminue le métabolisme mitochondrial oxydatif en faveur d'un métabolisme glycolytique (179). Le facteur de transcription *MITF* joue un rôle central dans la différenciation, la croissance et la survie des mélanocytes (voir section 1.1.2.1) en plus de réguler l'apoptose et le cycle cellulaire (180, 181). *MITF* induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'OXPPOS et la gestion du stress oxydatif, par exemple le co-activateur transcriptionnel *PGC-1 α* (voir Figure 5) notamment impliqué dans le métabolisme énergétique de la mitochondrie (sera abordé plus en détail aux sections 1.8.4.1 et 1.8.4.2). Puisque *MITF* active également des régulateurs transcriptionnels du métabolisme, la diminution de l'expression de *MITF* engendrée par une mutation de *BRAF* (voir Figure 5) peut jouer un rôle dans la reprogrammation métabolique des cellules de mélanome. En effet, *MITF* induit l'expression de gènes de l'OXPPOS (voir Figure 5), diminue la production de lactate et est impliqué dans la réponse au stress oxydatif (182). Les cellules présentant une mutation *BRAF* expriment peu *MITF*, ce qui les rend dépendantes de la glycolyse, alors que l'expression ectopique de *MITF* dans les cellules présentant une mutation *BRAF* induit un métabolisme

mitochondrial permettant de rétablir la production d'ATP. Ensemble, ces résultats soutiennent le rôle de *MITF* et de la mutation de *BRAF* dans la reprogrammation métabolique du mélanome (183).



Figur 5 : Dualité entre la glycolyse et un métabolisme oxydatif dans la reprogrammation métabolique du mélanome. La mutation de *BRAF* induit HIF1A et synergise avec d'autres oncogènes tels que Myc afin de soutenir la glycolyse via l'induction de LDHA, GLUT1, HK et PFK1. La dépendance des cellules cancéreuses à la glycolyse peut être exploitée en thérapie avec des analogues du pyruvate ou des inhibiteurs de la glycolyse afin d'alimenter le CAC et de forcer l'OXPHOS. Ceci provoque un stress oxydatif pouvant sensibiliser les cellules cancéreuses à certaines chimiothérapies et empêcher la progression du mélanome. De plus, la mutation de *BRAF* inhibe MITF, un élément central de la reprogrammation métabolique du mélanome. En effet, la mutation de *BRAF*, via l'inhibition de MITF, augmente la consommation de glucose et la production de lactate, alimentant la dépendance des cellules cancéreuses envers la glycolyse. À l'inverse, l'expression ectopique de MITF induit l'expression de gènes de l'OXPHOS tels que les PGC-1s (voir section 1.8.3). Ces derniers sont une famille de coactivateurs transcriptionnels qui interagissent avec des facteurs de transcription, par exemple les facteurs de respiration nucléaire (NRFs) afin d'induire notamment TFAM impliqué dans la transcription de l'ADN mitochondrial (ADNm). **EK** : Kinase activée par un mitogène. **RK** : Kinase régulée par des signaux extracellulaires, **MITF** : Facteur de transcription associé à la microphthalmie, **HIF1A** : Facteur 1-alpha induit par l'hypoxie, **GLUT1** : Transporteur de glucose de classe 1, **LDHA** : Lactate déshydrogénase A, **PFK1** : Phosphofructokinase 1, **HK** : Hexokinase, **PK** : Pyruvate kinase, **PDH** : Pyruvate déshydrogénase kinase, **PDH** : Pyruvate déshydrogénase, **NRF** : Facteur 1 de respiration nucléaire, **PGC-1** : coactivateurs du récepteur gamma activé par les proliférateurs du peroxysomes, **TFAM** : Facteur de transcription mitochondrial ADN grippant A. Figure créée à l'aide de Biorender : www.biorender.com

Des thérapies ciblées permettant d'inhiber la conformation active BRAF ou de maintenir BRAF en conformation inactive (184) sont disponibles, mais leur efficacité est limitée et les patients développent rapidement une résistance aux traitements. En effet, le traitement de cellules présentant une mutation *BRAF* avec des inhibiteurs tels que Vémurafénib ou dabrafenib peut engendrer une réactivation de la signalisation MAPK ou mener à l'activation de signalisations alternatives via des récepteurs à activité tyrosine kinase induisant la voie PI3K/Akt/mTOR (184). De plus, l'inhibition de BRAF rétablit la fonction mitochondriale, ce qui redirige le métabolisme de la glycolyse vers l'O₂PHOS et diminue la production de ROS. Le traitement avec des inhibiteurs de RAF diminue la glycolyse et rétablit la respiration mitochondriale, ce qui empêche la sénescence. Cette plasticité métabolique des cellules cancéreuses constitue un mécanisme de défense pouvant contribuer à la résistance aux inhibiteurs de BRAF/MEK et illustre l'importance d'explorer des approches thérapeutiques combinant des inhibiteurs de BRAF/MEK et des drogues altérant la synthèse et la fonction mitochondriale afin de sensibiliser le mélanome à la mort cellulaire induite par les traitements (185, 186).

Les observations de Warburg ont longtemps laissé croire que les cellules cancéreuses induisent un métabolisme glycolytique en raison d'une dysfonction mitochondriale, mais nous savons aujourd'hui que les mitochondries des cellules cancéreuses sont fonctionnelles et aptes à supporter l'O₂PHOS (187). Les besoins énergétiques des cellules régulent les mécanismes de fusion et de fission mitochondriale, respectivement responsables de la synthèse et de la dégradation des mitochondries, afin d'adapter la morphologie et la fonction des mitochondries. Dans le mélanome, la protéine 1 apparentée à la dynamine (DRP-1) régule les mécanismes de fission mitochondriale alors que les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2) contrôlent les mécanismes de fusion. Un déséquilibre entre l'expression de DRP-1 et de MFN1/2 rend les mécanismes de fission plus importants que ceux de fusion. Ceci promeut la métastase et la résistance à l'apoptose en plus de diminuer le stress oxydatif et la production de ROS (188, 189). En effet, bien que controversées, certaines études suggèrent que DRP-1 est impliqué dans la relâche du cytochrome C responsable de l'effet cytotoxique des inducteurs de l'apoptose (190), alors que d'autres suggèrent plutôt que la fission mitochondriale, combinée à une diminution de l'activité de la chaîne de transport des électrons, régule le cycle cellulaire, induit la glycolyse et diminue la production de ROS de manière à empêcher la mort cellulaire (191).

La mitochondrie apparait comme une cible thérapeutique majeure dans le traitement du mélanome et peut notamment être exploitée dans des thérapies adjuvantes pour augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses à la chimiothérapie et à la radiothérapie (192). La mitochondrie se présente comme un pivot permettant à la cellule de détecter des changements dans son environnement et d'adapter son métabolisme afin de continuer à assurer ses besoins énergétiques, à croître et à proliférer malgré les contraintes que lui impose son environnement (193).

1.4.2. Stress issus du microenvironnement modifiant le métabolisme

1.4.2.1. Les fibroblastes associés au cancer

Le microenvironnement tumoral est constitué d'éléments cellulaires tels que des fibroblastes, des cellules souches mésenchymateuses, des adipocytes, des péricytes, des cellules endothéliales, des lymphocytes et des macrophages, ainsi que des éléments non cellulaires, notamment les protéines, les glycoprotéines et les protéoglycans composant la matrice extracellulaire. Toutes ces composantes s'unissent et interagissent avec les cellules cancéreuses afin d'assurer leurs besoins métaboliques et énergétiques imposés par leur niveau de réplication rapide et soutenu (194). Dans les tumeurs solides, incluant le mélanome, les fibroblastes associés au cancer (CAFs) composent la plus grande partie du stroma tumoral (195). Ils sont activés par des signaux provenant du microenvironnement et envoyés par les tumeurs, par exemple des facteurs de croissance, des interleukines, des métalloprotéinases et des ROS (196). L'activation des CAFs modifie leur métabolisme et ces changements sont caractérisés par une augmentation de l'OXPPOS et de l'autophagie. En effet, l'hypoxie et le stress oxydatif, provoqué par une accumulation de ROS, inhibent la dégradation de HIF-1 α et le stabilisent. Ceci inhibe la respiration mitochondriale et diminue la production de ROS. L'hypoxie et les ROS peuvent également activer le facteur de transcription nucléaire (NF)- κ B, impliqué dans l'inflammation ainsi que dans l'immunité et dont le rôle sera abordé plus en détail à la section 1.5.2. NF- κ B est un coactivateur transcriptionnel de HIF-1 α . Ensemble, ils induisent un programme transcriptionnel qui régule l'autophagie et implique la cavéoline. La cavéoline constitue le principal élément structurel de la cavéole, une forme d'invagination de la membrane plasmique qui participe à l'activation de l'autophagie (197, 198).

Les CAFs se distinguent des autres fibroblastes par une augmentation de la sécrétion de composantes de la matrice extracellulaire, particulièrement des fibres de collagène, de fibronectine et des métalloprotéinases. Ces molécules participent au remodelage de la matrice extracellulaire, ce qui impacte les cellules avoisinantes en diminuant la consommation d'oxygène et l'expression de gènes de la glycolyse et en induisant le métabolisme de la glutamine alimentant le cycle de l'acide citrique. Ensemble, ces changements dans la structure de la matrice extracellulaire favorisent l'invasion, la métastase et la progression tumorale (199).

1.4.2.2. L'hypoxie

Les cellules cancéreuses prolifèrent de façon incontrôlée, souvent dans des endroits profonds et isolés de l'organisme. Leur apport en oxygène est insuffisant pour subvenir à leurs besoins énergétiques et les cellules cancéreuses se trouvent souvent en situation d'hypoxie. Les cellules cancéreuses s'adaptent en stimulant l'angiogenèse, soit la production de nouveaux vaisseaux nourriciers chargés d'alimenter les cellules cancéreuses en nutriments et en oxygène, mais l'hypoxie altère la structure de tels vaisseaux, empêchant l'oxygène de diffuser convenablement et provoquant l'apparition de zones de nécrose à l'intérieur des tumeurs. La présence de zones nécrotiques promeut la résistance aux traitements, corrèle positivement avec l'agressivité de la tumeur et assombrit le pronostic (200, 201). L'hypoxie stabilise les facteurs induits par l'hypoxie (*HIFs*), des facteurs qui régulent l'expression de gènes de la réponse à l'hypoxie. HIF est constitué de trois sous-unités alpha (*HIF-1 α* , *HIF-2 α* et *HIF-3 α*). En situation d'hypoxie, les sous-unités *HIF-1 α* et *HIF-2 α* forment un hétérodimère avec le récepteur nucléaire du récepteur des hydrocarbures aromatiques (*ARNT*), également connu sous le nom de *HIF-1 β* . Le complexe se lit alors à des éléments de réponse situés au niveau du promoteur de gènes de la réponse à l'hypoxie. En effet, *HIF-1* induit l'expression de *SLC2A1* et de *SLC2A3*, qui encodent respectivement pour les transporteurs du glucose *GLUT1* et *GLUT3*, en plus de réguler l'expression d'enzymes de la glycolyse telles que les hexokinases *HK1* et *HK2*, la lactate déshydrogénase *LDHA* et la pyruvate kinase déshydrogénase *PDK*. Cette dernière phosphoryle et inhibe la pyruvate déshydrogénase. L'activation de *PDK* empêche la conversion du pyruvate en acétyl-coenzyme A (*AcCoA*), freinant par le fait même la synthèse de flavine adénine dinucléotide réduit (*FADH₂*) et de nicotanimade adénine dinucléotide réduit (*NADH*), qui alimentent normalement le cycle de l'acide citrique (202).

De plus, HIF-1 diminue la biogenèse mitochondriale, favorisant plutôt leur dégradation par mitophagie. Ensemble, ces observations suggèrent qu'en situation d'hypoxie, les cellules détournent leur métabolisme en faveur de la glycolyse au détriment d'un métabolisme oxydatif. Ceci permet de réduire le fardeau sur les mitochondries. HIF-1 promeut la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. Il participe également au remodelage de la matrice extracellulaire via l'hydroxylation des fibres de collagène, ce qui soutient son rôle dans la métastase. En permettant l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses en situation de stress, HIF-1 participe également à la résistance aux traitements (203).

1.4.2.3. Déprivation de nutriments

Les cellules cancéreuses prolifèrent trop rapidement et souvent dans des endroits trop reculés de l'organisme pour assurer une vascularisation adéquate. L'environnement tumoral est par conséquent souvent pauvre en nutriments. Pour assurer leurs besoins énergétiques, le métabolisme du carbone des cellules cancéreuses repose sur le glucose pour la glycolyse et la production de lactate, ainsi que sur la glutamine. L'activation de mTORC1 dépend de la biodisponibilité de nutriments afin de contrôler la synthèse de protéines et la croissance cellulaire. Les nutriments, particulièrement les acides aminés, contrôlent l'activation de mTORC1 via TSC1/TSC2 et Rheb. La déprivation de nutriments inhibe mTORC1 afin d'empêcher la biosynthèse de ribosomes et d'induire l'autophagie (204). L'activation de l'autophagie permet de maintenir les processus bioénergétiques et la survie en situation de déprivation de nutriments.

La déprivation de glucose peut, de son côté, augmenter le ratio MP : ATP (augmentation de l'AMP), ce qui active la protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK). AMPK est constituée d'une sous-unité catalytique ainsi que de deux sous-unités régulatrices. La liaison de l'AMP active AMPK et permet à la kinase hépatique B1 (LKB1) de phosphoryler un résidu thréonine présent au niveau du domaine d'activation de la sous-unité catalytique d'AMPK (205). La déprivation de glucose induit la phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) par AMPK. ACC est impliquée dans la synthèse des acides gras (voir section 1.8.4.2). De plus, la déprivation de glucose diminue les niveaux de NADPH et la perte du potentiel réducteur de NADPH augmente la production de ROS qui peuvent également activer AMPK (206). L'activation d'AMPK et de LKB1

lors de la déprivation de glucose pourrait induire NRF2 qui se lie à des éléments de réponse de la réponse antioxydante (ARE) au niveau du promoteur de *MMP9*. L'induction de MMP-9 favorise l'invasion, la métastase et l'angiogenèse. L'angiogenèse permet d'acheminer oxygène et nutriments vers les tumeurs et MMP-9 pourrait ainsi permettre aux cellules cancéreuses de survivre même en situation de déprivation de nutriments (207). La formation de ponts disulfure est une étape importante du repliement de plusieurs protéines. Le stress oxydatif engendré par la déprivation de glucose perturbe le potentiel REDOX du réticulum endoplasmique (RE) en altérant l'oxydation du glutathion, impliquée dans la formation de ponts disulfure. Ainsi, le stress oxydatif perturbe le repliement des protéines et le repliement inapproprié des protéines engendre également un stress oxydatif (208, 209). Une accumulation de protéines mal repliées engendre une forme de stress nommée « stress du RE ». Ce stress sera abordé à la section suivante.

1.4.3. Stress du RE et réponse UPR

1.4.3.1. Activation et signalisation

Dans plusieurs cancers, on remarque une croissance tumorale rapide, une augmentation de la synthèse de protéines, une vascularisation inappropriée et insuffisante ainsi qu'une déprivation de nutriments ou de l'hypoxie, ce qui perturbe le fonctionnement du RE. Des protéines mal structurées s'accumulent alors dans le RE, engendrant un stress du RE perturbant l'ensemble de l'activité cellulaire. La cellule met en place une réponse adaptative aux protéines dépliées, nommée UPR (*Unfolded Protein Response*), dans le but de rétablir l'homéostasie et assurer sa survie. Cependant si le stress est trop important, ou si la réponse UPR est insuffisante, la cellule meurt par apoptose. La protéine régulée par le glucose GRP78 est une chaperonne critique pour le contrôle qualité des protéines et est liée aux senseurs de stress ATF6, PERK et IRE1. En condition de stress du RE, GRP78 se détache de ses partenaires. Le facteur de transcription ATF6 transloque alors au noyau où il active la transcription de plusieurs chaperonnes et du facteur de transcription XBP1. Une fois activé, la protéine transmembranaire IRE1 participe à l'épissage de l'ARNm de XBP1 et la protéine résultante transloque au noyau afin de réguler l'expression de gènes et de chaperonnes impliquées dans la prise en charge de protéines mal repliées et la dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD). Une fois activé, PERK phosphoryle, et donc inactive, le facteur d'initiation de la traduction eucaryote eIF2 α , ce qui réduit le fardeau sur le RE en empêchant la

synthèse générale de protéines. Le facteur de transcription ATF4 demeure cependant sélectivement traduit et, une fois activé, régule la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose, le métabolisme des acides aminés, le maintien du potentiel REDOX et le repliement adéquat des protéines (210, 211). ATF4 participe donc à la mise en place d'un programme transcriptionnel permettant de rétablir l'homéostasie et d'assurer la survie des cellules.

Les cellules de mélanome présentent une activation basale de la réponse UPR, caractérisée par l'induction de GRP78 ou par l'activation d'une signalisation impliquant la protéine homologue aux protéines liant les séquences stimulatrices de type CAAT (CHOP), un facteur de transcription. CHOP module la survie cellulaire en situation de stress par la transcription de facteurs pro et anti-apoptotiques et en favorisant la formation d'autophagosomes et d'autolysosomes lors de l'autophagie (212), et ce, même en l'absence de stimuli externes. Induire le stress du RE dans des cellules dont la capacité d'adaptation est faible pourrait être une avenue thérapeutique intéressante pour le traitement de certains cancers, mais plusieurs sous-types de cellules de mélanome présentant un niveau de stress du RE basal s'adaptent et deviennent insensibles au stress du RE, activant des mécanismes les rendant résistantes à l'apoptose. L'autophagie induite en situation de stress du RE constitue un mécanisme de défense permettant aux cellules cancéreuses d'assurer leurs besoins énergétiques en situation de privation de nutriments ou suite à certains traitements pharmacologiques comme la chimiothérapie et la radiothérapie. L'autophagie permet alors aux cellules cancéreuses d'échapper à la mort cellulaire induite par différents traitements, ce qui promeut la métastase et la résistance aux traitements (213). Ces observations soulignent l'importance d'explorer attentivement les mécanismes d'adaptation des cellules cancéreuses au stress du RE et leur implication dans la progression tumorale.

1.4.3.2. Double rôle du stress du RE dans la survie et la mort cellulaire

En fonction du microenvironnement, de la cause et du niveau de stress, le stress du RE ou un manque d'oxygène et de nutriments peuvent induire l'autophagie, un processus lors duquel la cellule digère son propre contenu afin d'éliminer et de remplacer les organites et les protéines endommagés ou non fonctionnels. L'autophagie se présente donc comme un mécanisme de défense des cellules pour soutenir leurs besoins énergétiques et assurer leur survie dans un environnement

pauvre en nutriments. En effet, des changements dans les niveaux de nutriments et d'oxygène provoquent l'accumulation de protéines mal structurées au niveau du réticulum endoplasmique, conduisant au stress du RE, et endommagent les mitochondries en plus d'induire la production de ROS. L'autophagie permet, dans ce contexte, d'empêcher la mort cellulaire engendrée par la toxicité des organites endommagés et de rétablir l'homéostasie (214).

Lors du stress du RE, la relâche de calcium du réticulum endoplasmique vers le cytosol diminue la concentration de calcium au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui contribue davantage au stress du RE en altérant l'activité de chaperonnes et en provoquant l'accumulation de protéines mal structurées. Le calcium cytosolique active la kinase II dépendante de Ca^{2+} /calmoduline (CaMKII) qui phosphoryle et active la protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK) (215, 216). En situation de stress énergétique, le ratio AMP/ATP est augmenté en raison d'une anomalie lors de la production d'ATP ou d'une augmentation de la consommation d'ATP, ce qui active AMPK. Cette dernière phosphoryle et active tuberin (TSC2). Tuberin est un suppresseur de tumeur qui, une fois associé à TSC1 (hamartin), hydrolyse le GTP en GDP. La petite protéine G homologue de RAS enrichie dans le cerveau (Rheb) demeure liée au GDP plutôt qu'au GTP et adopte une conformation inactive. Ce faisant, AMPK empêche l'activation de mTORC1 via Rheb, ce qui limite la prolifération cellulaire (217). La kinase activatrice de l'autophagie ULK1 (*Unc-51-like autophagy activating kinase*) forme un complexe avec les protéines spécifiques à l'autophagie Atg13 et Atg101 et la phosphorylation de ULK1 et de Atg13 par mTORC1 inhibe l'activité du complexe (218, 219). Lors de la privation de nutriments, notamment des acides aminés, mTORC1 n'est pas activé et se dissocie du complexe ULK1. ULK1 s'auto-active et active Atg13, ce qui induit l'autophagie et la formation de phagosomes afin de limiter la synthèse de lipides et de protéines en situation de stress. À l'inverse, lorsque les nutriments sont présents en quantité suffisante, mTORC1 active des procédés de biosynthèse assurant la survie et la prolifération des cellules (220).

L'objectif principal de la réponse UPR est de protéger les cellules contre les dommages intra et extra-cellulaires engendrés par le stress du RE. Cependant, si l'homéostasie ne peut être rétablie, la cellule affectée est éliminée par apoptose. En effet, plusieurs facteurs de transcription activés en situation de stress du RE, tels que *ATF4*, *ATF6* et *XBPI*, induisent le facteur de transcription *CHOP*

qui régule l'expression de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bim, NOXA et PUMA. En situation de stress du RE, ces trois protéines lèvent l'inhibition qu'exerce Bcl-xL sur les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, induisant un changement de conformation de ces dernières augmentant la perméabilité de la membrane mitochondriale et permettant ainsi la relâche du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytosol. La relâche du cytochrome C provoque l'activation en chaîne des caspases, notamment les caspases 3, 9 et 12 exerçant une activité protéase (221, 222). Parmi elles, la caspase 3 clive la Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) au niveau de son domaine de liaison à l'ADN situé en N-terminal, laissant en C-terminal un fragment pro-apoptotique de 89 kDa qui présente également une activité catalytique. En cas de dommages à l'ADN, les cellules qui présentent la forme totale de PARP meurent par nécrose. Au contraire, au cours de la réponse aux dommages à l'ADN, le clivage de PARP par la caspase 3 inhibe la nécrose et induit un programme pro-apoptotique impliquant le fragment catalytique en C-terminal. PARP reconnaît et se lie à l'ADN simple brin, puis utilise la nicotinamide adénine dinucléotide oxydée (NAD^+) afin de produire des polymères d'adénosine diphosphate ribose permettant le recrutement de protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN. La diminution de la concentration de NAD^+ provoquée par l'activation de PARP est une étape essentielle de l'apoptose (223).

Le stress du RE semble induire l'apoptose par plusieurs mécanismes, et l'un d'entre eux pourrait impliquer la protéine régulant l'apoptose APR-2. En situation de stress cellulaire pouvant provoquer l'apoptose, APR-2 est relocalisée au niveau du réticulum endoplasmique, où elle induit la relâche de calcium dans le cytoplasme. L'augmentation du calcium cytosolique induit la phosphorylation, et donc l'activation, de IRE1 et de PERK, ainsi que l'activation du facteur de transcription ATF4 et de sa cible CHOP, indiquant un rôle du stress du RE dans l'apoptose (224). La phosphorylation de IRE1 permet le recrutement du facteur 2 associé aux récepteurs de facteurs de nécrose tumorale (TRAF 2) à la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui active la kinase 1 de régulation de signaux apoptotiques (ASK1) qui phosphoryle et active à son tour c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) et p38 MAPK, suggérant une boucle de rétroaction positive dans laquelle le stress du RE peut réguler la signalisation des MAPK et vice versa (225). En effet, la signalisation des MAPK est induite en situation de stress du RE, afin de réguler l'apoptose et le cycle cellulaire de manière à assurer la survie des cellules en situation de stress. D'un autre côté, la signalisation

des MAPK régule également certains aspects de la réponse au stress, notamment l'induction de ERK1/2 et des MAPK JNK et p38, afin de réguler l'apoptose et le cycle cellulaire de même que l'activité de facteurs transcription (CHOP) et la transcription de gènes impliquées dans la réponse au stress (226). Par ailleurs, APR-2 est essentielle à l'activation de la signalisation ASK1/JNK par IRE1, ce qui active le facteur de transcription p53(224), un suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation des dommages à l'ADN (227). La kinase JNK régule l'apoptose en activant les facteurs pro-apoptotiques BID et BIM et en inhibant les facteurs anti-apoptotiques BCL-XL et MCL-1. L'inhibition de ces dernières empêche l'inhibition de Bax et Bak, ce qui promeut la relâche du cytochrome C de la membrane mitochondriale et active une cascade de caspase dont l'activité protéase conduit à l'apoptose (228).

1.5. Immunité du mélanome

Les tumeurs cancéreuses sont très hétérogènes et on y retrouve différentes cellules immunitaires composant en partie le TME et affectant des processus importants tels que l'inflammation, la métastase et la réponse aux traitements. Le TME est ainsi constitué d'une combinaison d'éléments immunitaires tels que des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, des lymphocytes et des macrophages ainsi que d'éléments non immunitaires tels que des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des fibroblastes (229). Les changements métaboliques subits par les cellules cancéreuses modulent le microenvironnement tumoral, par exemple en diminuant la concentration de glucose et en augmentant la production d'acide lactique (230, 231) de manière à créer un environnement inflammatoire favorable à la progression tumorale, mais surtout de manière à reprogrammer les cellules immunitaires de telle sorte qu'elles adoptent un phénotype immunosuppresseur et pro-tumoral (232).

Un exemple bien documenté de ce phénomène est l'activation alternative des macrophages. Le microenvironnement module le phénotype des macrophages associés aux tumeurs (TAM) recrutés au site tumoral. Les cellules cancéreuses fermentent le pyruvate produit lors de la glycolyse sous forme de lactate, et ce, même en présence d'oxygène afin de rapidement produire suffisamment de macromolécules pour alimenter les voies de biosynthèse assurant leur prolifération soutenue (233). On remarque ainsi, dans le microenvironnement tumoral, une forte concentration de lactate

corrélant avec le niveau d'activité de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (Pmk2), une enzyme majeure de la glycolyse. Le lactate présent dans le microenvironnement stabilise HIF-1 α (234) qui est nécessaire à l'induction du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de l'arginase (Arg1). VEGF est impliqué dans la formation de nouveaux vaisseaux nourriciers (235). De son côté, l'arginase (Arg1) active des voies de biosynthèse impliquées dans la prolifération et la production de collagène en plus de permettre la détoxification de l'ammoniac provenant du métabolisme des acides aminés (236). Ensemble, VEGF et Arg1 favorisent la progression tumorale.

Les TAM exposés à un environnement riche en lactate surexpriment la molécule apparentée à la résistine (FIZZ1, RELM α) ainsi que les lectines galectines de type C (MGL1 et MGL2), toutes caractéristiques de l'activation alternative des macrophages (234). On qualifie un tel phénotype de « M2 » par opposition aux macrophages « M1 ». Les macrophages de type M1 sont pro-inflammatoires et coordonnent une réponse immunitaire impliquant les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK. Cette réponse permet d'éliminer les cellules cancéreuses. Les TAM présentant un phénotype dit M2 ont une grande capacité de phagocytose. Ils produisent des facteurs pro-angiogéniques, sont impliqués dans la synthèse de la matrice extracellulaire et jouent un rôle dans la réparation des dommages tissulaires. Ils induisent une réponse impliquant les cellules T auxiliaires Th2 et les cellules T régulatrices en plus d'inhiber les cellules T cytotoxiques dans le but d'engendrer une immunosuppression locale favorisant la progression tumorale (237). Le TME régule ainsi le recrutement et la fonction de cellules immunitaires au cœur des tumeurs, affectant par le fait même des procédés clés de la tumorigenèse tels que la métastase et l'évasion.

1.5.1. Polarisation des tumeurs chaudes ou froides et impact du TME

Les chimiokines, une sous-catégorie de cytokine, comprennent plusieurs interleukines et autres facteurs inflammatoires. Les chimiokines peuvent être sécrétées par les cellules cancéreuses et les cellules stromales dans le TME. L'expression de ces chimiokines peut être régulée par plusieurs facteurs génétiques et épigénétiques. Une modification épigénétique des histones et la méthylation de l'ADN répriment l'expression de plusieurs chimiokines, par exemple CXCL14 ou CCL4, ce qui empêche le recrutement de cellules dendritiques et de cellules T effectrices au site tumoral et

diminue l'efficacité de plusieurs immunothérapies ciblant les points de contrôle immunitaire (238). De plus, certaines mutations causant l'activation ou la surexpression du récepteur de CXCL12, CXCR4 (CD184), participe à l'inflammation et empêche le recrutement de cellules immunitaires matures, ce qui favorise la croissance tumorale et la métastase (239, 240). Les chimiokines attirent plusieurs cellules immunitaires au site tumoral, notamment des neutrophiles, des cellules dendritiques, des cellules NK et des macrophages, induisant leur activation et leur différenciation (241). La présence ou non de cellules immunitaires et leur phénotype affectent la métastase, l'invasion et la réponse aux traitements, notamment l'immunothérapie (242, 243). Selon la présence ou non de cellules immunitaires, une tumeur peut être qualifiée de « chaude » ou « froide », cette dernière catégorie pouvant être subdivisée en fonction de la distribution de certaines cellules au sein de la tumeur (244). La manipulation de certains procédés génétiques et épigénétiques peut réguler le recrutement de cellules immunitaires au site tumoral, altérer leur phénotype et favoriser la progression ou la régression des tumeurs.

Dans les tumeurs chaudes, la présence de chimiokines telles que CXCL9, CXCL10 et CCL5 ainsi que l'interféron gamma ($INF\gamma$) au niveau du TME favorise l'activation des lymphocytes TCD8 cytotoxiques et leur migration au site tumoral. Par rétroaction, $INF\gamma$ induit deux molécules immunosuppressives qu'on qualifie de « point de contrôle immunitaire », soient l'idoleamine 2,3-désoxygénase (IDO) et PD-L1 (voir section 1.3.7.3) (245). Le premier, IDO, est impliqué dans le catabolisme du tryptophane, dont les sous-produits de dégradation exercent des fonctions immunomodulatrices. Les métabolites du tryptophane engendrent un environnement immunosuppresseur favorable à la prolifération des cellules T régulatrices en plus de provoquer l'apoptose des lymphocytes T auxiliaires. Ainsi, IDO favorise la progression tumorale et l'évasion en inhibant l'immunité anti-tumorale (246, 247). De son côté PD-L1 est le ligand du récepteur de PD-1 présent à la surface des lymphocytes T.

L'activation des lymphocytes T est complexe et nécessite des signaux de costimulation. Les cellules cancéreuses sont soumises à différents stress, par exemple le manque de nutriments ou d'oxygène, de même qu'une instabilité génomique engendrée par leur prolifération rapide. Ces différents stress peuvent provoquer la mort des cellules par apoptose ou nécrose. Le stress et les différents mécanismes de mort cellulaires engendrent la relâche de signaux moléculaires associés

au danger (DAMP) qui incluent l'ATP, des protéines de choc thermique (HSP) ou le groupe de haute mobilité 1 (HMGB1) (248). Les DAMPs sont reconnus par les récepteurs toll-like (TLR) exprimés par les cellules dendritiques, ce qui engendre une réponse immunitaire et inflammatoire caractérisée par l'activation de NF- κ B et du facteur 3 de régulation de l'interféron (IRF3) et la production de cytokines inflammatoires (249). Les cellules dendritiques expriment, au niveau du CMH présent à leur surface, un antigène qui est reconnu par le TCR. Ces antigènes sont reconnus comme étrangers et déclenchent une réponse immunitaire. Ils incluent des protéines anormales ou surexprimées provenant de mutations ciblant souvent des proto-oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs. L'activation des TLR des cellules dendritiques induit l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 qui se lient au récepteur CD28 exprimé par les lymphocytes T, permettant ainsi de compléter la synapse immunologique. Cette dernière permet la relâche d'IL-2 nécessaire à l'activation des lymphocytes T qui deviendront des cellules cytotoxiques (250, 251). Afin de finement réguler l'homéostasie des lymphocytes T et la réponse immunitaire, et ainsi éviter l'auto-immunité, les ligands CD80 et CD86 exprimés par les cellules dendritiques lient CTLA-4, ce qui inhibe l'activation des lymphocytes T. De même, l'interaction de PD-1 avec un de ses ligands, PD-L1 ou PD-L2, inhibe également les lymphocytes T. On remarque, dans plusieurs tumeurs, une induction de PD-L1, ce qui induit l'apoptose des lymphocytes T, empêche la production de granzyme, de perforine, et de cytokines inflammatoires en plus de diminuer la production de cytokines immunosuppressives et anti-inflammatoires telle qu'IL-10, ce qui favorise l'évasion tumorale (252, 253). Les interventions ciblant CTLA4 et PD-1/PD-L1 sont au cœur de l'immunothérapie (tel que détaillé à la section 1.3.7.3) et permettent de lever l'inhibition induite par certaines tumeurs sur la réponse immunitaire, favorisant ainsi la reconnaissance et l'élimination des cellules cancéreuses.

Dans les tumeurs froides, les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) sont soit totalement absents, soit concentrés en périphérie sans pouvoir infiltrer la tumeur. On remarque toutefois la présence de lymphocytes T régulateurs (Trég) et de TAMs dont le rôle immunosuppresseur fut décrit à la section 1.5. Les Trég expriment des points de contrôle immunitaire, notamment CTLA-4, ou d'autres molécules immunosuppressives et produisent des cytokines anti-inflammatoires afin d'inhiber les lymphocytes T CD8+. De plus, les Trég peuvent produire des granules de perforine et de granzyme afin d'éliminer les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) et d'inhiber la prolifération

des lymphocytes B, ce qui diminue la réponse anti-tumorale (254). Finalement, l'AMP cyclique (AMPc) diminue la production d'IL-2 en réprimant sa transcription, puisque l'activation de la protéine kinase A par l'AMPc induit des répresseurs qui interagissent avec des co-activateurs transcriptionnels au niveau des éléments de réponse de gènes cibles (255, 256). Comme mentionné précédemment, les cellules dendritiques sont essentielles à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ et permettent donc à l'immunité innée de commander la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace. Les cellules dendritiques proviennent de cellules myéloïdes progénitrices. Elles empruntent la circulation et atteignent les ganglions lymphatiques où la présence de signaux de dangers tels que les PAMPs et les DAMPs provoque des changements structuraux et métaboliques en plus d'altérer l'expression de protéines de surface et la sécrétion de cytokines, favorisant ainsi les processus de présentation antigénique et d'activation des lymphocytes T CD8⁺ (257). Les cellules dendritiques peuvent être séparées en différentes classes en fonction de leur localisation et de l'expression de certaines glycoprotéines utilisées comme marqueur pour le phénotypage des cellules immunitaires. Les cellules dendritiques impliquées dans la présentation antigénique sont dites classiques (cDC). Elles expriment fortement le facteur de transcription à glissière à leucine apparenté à ATF3 (BATF3) impliqué dans la différenciation et la maturation des cDC et dans la mise en place d'une réponse immunitaire employant l'interféron qui empêche la progression tumorale. En effet, l'interaction de BATF3 avec sa cible IRF8 est essentielle à la maturation des cellules dendritiques et la perte d'expression de BATF3, bien qu'elle n'empêche pas la présentation antigénique ni le développement des cDC, indépendamment de IRF8

1.5.2. Immunoédition du cancer et son interaction avec le microenvironnement

Les cellules cancéreuses sont capables d'induire un microenvironnement diminuant la réponse immunitaire dirigée contre elles, d'activer des points de contrôle inhibiteur du système immunitaire, de sécréter des cytokines immunosuppressives, d'altérer la présentation antigénique et de produire des facteurs pro-apoptotiques. Le système immunitaire est normalement capable de reconnaître et d'éliminer les cellules cancéreuses, mais permet également la sélection d'un sous-type de cellules cancéreuses, moins immunogènes, capables d'éviter la reconnaissance par le système immunitaire et de continuer à croître. Le processus par lequel les cellules cancéreuses s'évadent du système immunitaire se nomme « immunoédition » et se déroule en quatre étapes. Tout d'abord, les systèmes immunitaires inné et adaptatif, en particulier les cellules tueuses

naturelles (NK) et les lymphocytes T, ainsi que des molécules immunorégulatrices telles que l'INF γ et l'IL-12, permettent la reconnaissance et la destruction des cellules cancéreuses, ce qui empêche la progression des tumeurs. Ensuite, un état d'équilibre s'installe entre le système immunitaire qui élimine les cellules cancéreuses et les cellules cancéreuses qui subissent des transformations leur permettant de proliférer malgré la pression exercée par le système immunitaire. Finalement, la pression sélective exercée par le système immunitaire durant la phase d'équilibre permet l'émergence d'un clone tumoral menant au développement d'une tumeur capable de croître dans un hôte immunocompétent. La plupart des antigènes exprimés par les cellules cancéreuses sont des marqueurs spécifiques à un tissu et sont également exprimés par les cellules saines. Les tumeurs ont la capacité d'engendrer l'anergie des lymphocytes. L'anergie est un système par lesquels les lymphocytes T reconnaissent et deviennent tolérants aux antigènes du « soi ». L'anergie induite par les tumeurs peut expliquer la faible capacité du système immunitaire à reconnaître les cellules cancéreuses. Cette tolérance des cellules immunitaires aux antigènes tumoraux diminue l'efficacité de plusieurs approches thérapeutiques (258).

1.5.3. Rôle de l'inflammation dans le mélanome

Le microenvironnement tumoral généré par le mélanome est souvent inflammatoire et immunosuppresseur et promeut l'initiation du cancer, la survie des cellules cancéreuses, l'angiogenèse, la métastase et module la réponse de la tumeur aux hormones et autres agents chimiothérapeutiques. Deux procédés mènent à la formation d'un microenvironnement tumoral inflammatoire : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Dans la voie intrinsèque, les cellules qui subissent des modifications génétiques, par exemple des mutations, un réarrangement chromosomique ou une amplification, menant à l'activation d'oncogènes (*HRAS*, *NRAS*, *MYC*) ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (*P16/INKA4*) produisent des médiateurs inflammatoires et génèrent un environnement inflammatoire au sein des tumeurs. Dans la voie extrinsèque, l'infection par des pathogènes, les radiations et l'exposition à certains produits chimiques génèrent un stress oxydatif sous forme de ROS et d'espèces réactives nitrées. Ce stress oxydatif mène à une inflammation chronique pouvant augmenter le risque de développer un cancer. Les ROS jouent un rôle dans le métabolisme, le cycle cellulaire et la carcinogenèse. Les deux processus activent des facteurs de transcription tels que *NF- κ B*, *STAT3* et *HIF1A* qui induisent à leur tour la production de molécules pro-inflammatoires comme des cytokines (TNF- α , IL-6, IL-

1), des chimiokines (CCL2, CXCL8), des cyclooxygénases (COX-2) et des prostaglandines. L'oxyde nitrique (NO), les cytokines et les ROS participent à l'activation de voies de signalisation telles que NF- κ B et AP-1, impliquées dans la croissance cellulaire, la prolifération et l'apoptose.

NF- κ B et *STAT* sont les deux facteurs de transcription les plus importants dans l'inflammation et sont constitutivement activés dans le mélanome. Ils jouent un rôle majeur dans la tumorigenèse en régulant l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, la survie, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse et la métastase. *NF- κ B* régule également l'expression de gènes médiant l'apoptose. *NF- κ B* peut être activé par TNF- α , l'IL-1 β , les lipopolysaccharides (LPS), les rayons UV, les radiations ionisantes et certaines bactéries ou virus. L'activation de *NF- κ B* est importante pour la migration et la différenciation des cellules épidermiques. Les STATs sont quant à elles activées par des facteurs de croissance (EGFR), des cytokines (IL-6, IL-17, IL-22) et, grâce à leur domaine de liaison à l'ADN, lient le promoteur de gènes de la réponse de type « interféron ». Les STATs régulent la survie et la croissance cellulaire, mais jouent également un rôle dans l'inflammation et la tumorigenèse. En effet, STAT3 inhibe la production d'IL-12 et d'INF γ nécessaires à l'activité anti-tumorale des lymphocytes T auxiliaires. De plus, l'interaction de STAT3 avec NF- κ B stimule l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et les deux peuvent lier le promoteur de gènes cibles, par exemple impliqués dans l'angiogenèse ou l'hypoxie, afin d'induire leur expression de manière synergique (259).

Certaines chimiokines et cytokines jouent un rôle dans l'inflammation, l'angiogenèse et la tumorigenèse. Lorsqu'elle est constitutivement exprimée, CXCL1, une chimiokine, peut induire des dommages tissulaires et activer *NF- κ B*. Les cellules présentant une mutation de *RAS* surexpriment CXCL1, et ce dernier participe à la transformation de cellules pré-néoplasiques en cellules néoplasiques via la phosphorylation de I κ B α . Une fois phosphorylé, I κ B α se sépare de NF- κ B et libère des signaux de localisation permettant la localisation de ce dernier au noyau où il induit la transcription de gènes impliqués dans l'invasion et la prolifération. De son côté, *IL6* est exprimé par les monocytes et les macrophages mais peut également être exprimé par les cellules cancéreuses du sein, de la prostate et des ovaires. IL-6 joue un rôle dans l'apoptose, la prolifération des cellules cancéreuses, l'angiogenèse, la migration et la métastase (260). Finalement, IL-1 peut stimuler et recruter des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) au site tumoral. Ces dernières vont modifier

une tyrosine kinase spécifique aux lymphocytes T (LCK) pour empêcher leur activation et ainsi engendrer un microenvironnement immunosuppresseur. L'IL-1 promeut l'angiogenèse, la croissance tumorale, la métastase en plus d'activer l'inflammasome. (261, 262).

Comme mentionné précédemment (voir section 1.4.1), la prolifération rapide et soutenue des cellules cancéreuses engendre d'importantes demandes en nutriments et en oxygène qui ne peuvent être comblées par le TME et les cellules cancéreuses doivent adopter différentes transformations métaboliques afin de s'adapter à un environnement hostile et d'assurer leurs besoins énergétiques (263, 264). Ces changements métaboliques participent à l'inflammation dans le TME, favorisant ainsi la tumorigenèse et la progression tumorale. À l'inverse, l'inflammation peut également moduler d'importants processus métaboliques. (265). En effet, les cellules cancéreuses produisent de nombreuses cytokines et chimiokines inflammatoires, par exemple IL-6, CCL2 et CXCL8, qui participent au recrutement de cellules immunitaires, notamment des macrophages, au site tumoral et à l'angiogenèse (266, 267). D'un autre côté, l'inflammation provoque la polarisation des macrophages en macrophages pro-inflammatoires sécrétant différentes cytokines inflammatoires, notamment IL-10, CCL4, CCL13 et CCL17 (268).

L'inflammation induit plusieurs facteurs de transcription sensibles au stress oxydatif, par exemple *NF- κ B*, *HIF1A* et la famille des *STAT*, qui régulent l'expression de cytokines et chimiokines inflammatoires impliquées dans la tumorigenèse, mais également de plusieurs enzymes oxydantes, notamment la NADPH oxydase (NOX). Cette dernière produit des anions superoxyde (O_2^-) en catalysant l'oxydation du NADPH en $NADP^+$ (269). Bien que les ROS exercent des rôles bénéfiques via leur implication dans la présentation antigénique (270) et l'homéostasie des cellules immunitaires (271), une production délétère de ROS qui surpasserait les défenses antioxydantes de l'organisme engendre un stress oxydatif pouvant endommager l'ADN mitochondrial (mtDNA) et altérer la fonction des complexes de la chaîne de transport des électrons (ETC) impliqués dans la respiration mitochondriale. L'ETC permet de réduire l'oxygène, l'accepteur final de la chaîne, en molécules d'eau à l'intérieur de la matrice mitochondriale. Un dysfonctionnement de l'ETC engendre cependant la formation de ROS mitochondriaux puisque le transfert partiel d'électrons vers l'oxygène ou la fuite d'électrons hors de la chaîne qui ne réduiront que partiellement l'oxygène engendre la formation d'ions superoxyde (O_2^-) et peroxyde (O_2^{2-}) (272). Les ROS ainsi produits

activent l'inflammasome et provoquent des dommages à l'ADN. Ces dommages engendrent une instabilité génomique et des mutations facilitant la progression tumorale. S'installe alors un cercle vicieux dans lequel les ROS engendrent des dommages mitochondriaux et altèrent le métabolisme mitochondrial, ce qui maintient la production de ROS mitochondriaux (273).

L'inflammation exerce un rôle à double tranchant dans la progression tumorale. L'inflammation permet le recrutement de cellules immunitaires au site tumoral. Par exemple, les lymphocytes T empêchent la métastase et leur activité cytotoxique permet d'éliminer les cellules cancéreuses (274). Les cellules tueuses naturelles (NK) libèrent quant à elles des chimiokines et des cytokines inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-2, IL-12, et IL-15 ainsi qu' $INF\alpha$ et $INF\gamma$. Ces dernières, tout comme les granules de perforine et granzyme responsables de l'activité cytotoxique des cellules NK, font partie de la réponse immunitaire innée permettant d'éliminer les cellules cancéreuses (275, 276). D'un autre côté, les neutrophiles exercent des effets à la fois pro et anti-tumoral. En effet, les neutrophiles peuvent agir comme des cellules présentatrices d'antigènes (APC) afin d'activer les lymphocytes T. Les neutrophiles sont capables de reconnaître et d'éliminer les cellules cancéreuses recouvertes d'anticorps et participent ainsi à la cytotoxicité dépendante des anticorps. Finalement, ils peuvent également tuer les cellules cancéreuses en libérant des ROS (277).

Les neutrophiles peuvent participer à la progression et à la croissance tumorale en favorisant l'angiogenèse. Ils sécrètent également des métalloprotéinases telles que MMP9 et des leucotriènes impliqués dans l'invasion et la métastase (278). Certaines chimiokines et cytokines relâchées dans le microenvironnement tumoral par les neutrophiles sont pro-tumorales, par exemple IL-6, IL-8 et le facteur de croissance transformant ($TGF-\beta$), ce dernier jouant également un rôle dans la métastase (279). Une inflammation persistante et non résolue est au cœur de plusieurs pathologies. L'inflammation chronique engendre un microenvironnement tumoral immunosuppresseur, favorisant la tumorigenèse et la métastase, et promeut la résistance aux traitements. En effet, on retrouve, dans le microenvironnement tumoral inflammatoire, des cytokines et des cellules immunosuppressives tels que des lymphocytes T régulateurs et des macrophages M2 immunosuppresseurs. L'inflammation chronique peut ainsi participer à la progression tumorale par l'activation d'oncogènes, par la production de ROS, en engendrant des dommages à l'ADN ou en

activant les signalisations NF- κ B, p53, MAPK, JAK-STAT et PI3K/AKT, pour la plupart impliquées dans l'immunosurveillance et la réponse à l'immunothérapie (280).

Mieux comprendre la complexité de l'interrelation entre la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses et le TEM, ainsi que les mécanismes par lesquels ces processus fondamentaux s'unissent pour moduler la réponse immunitaire, est essentiel à notre compréhension globale du cancer, mais aussi de plusieurs autres maladies métaboliques et immunitaires.

1.6. Description des principales voies métaboliques des cellules cancéreuses

La mitochondrie est une organelle à double membrane possédant son propre génome (mtDNA) qui encode pour 13 protéines impliquées dans le métabolisme mitochondrial oxydatif (OXPHOS), deux ARN ribosomiaux ainsi que 22 ARN de transfert impliqués dans la traduction, le reste des protéines mitochondriales étant encodées par le génome nucléaire. L'étude MitoCarta recense 1136 gènes encodant pour des protéines mitochondriales chez l'humain catégorisées en fonction de la localisation de la protéine pour laquelle ils codent et de leur fonction. Les transcrits sont répertoriés dans un outil accessible gratuitement (<http://www.broadinstitute.org/mitocarta>). Cette étude soutient que 99% des protéines mitochondriales sont encodées par le génome nucléaire et l'interaction entre le génome mitochondrial et nucléaire est essentielle à l'expression de gènes de la biogenèse et de la fonction mitochondriale (281). La mitochondrie est largement responsable de la production énergétique des cellules sous forme d'ATP, l'OXPHOS étant plus efficace et produisant plus d'énergie par molécule de glucose que la glycolyse (282). Toutefois, les observations de Warburg soutenant que les cellules cancéreuses augmentent leur consommation de glucose et favorisent un métabolisme glycolytique même en présence d'oxygène, un phénomène qualifié de glycolyse aérobie et décrit à la section 1.4.1, laissent penser qu'une dysfonction mitochondriale pouvant être provoquée par un manque d'oxygène dans le TEM (voir section 1.4.2.2) empêche un métabolisme mitochondrial et une OXPHOS optimale (283).

L'absence d'oxygène dans le TEM stabilise HIF-1 α qui induit la glycolyse et par conséquent la production d'acide lactique (284). De plus, les cellules cancéreuses activent une branche du métabolisme du glucose, la voie des pentoses phosphates (PPP), impliquée dans la croissance et la

prolifération des cellules en produisant les métabolites nécessaires à la synthèse d'acides gras, d'acides aminés et de nucléotides. La voie PPP comprend une phase oxydative et une phase non oxydative. La phase oxydative consiste à convertir le glucose-6-phosphate (G6P) en ribulose-5-phosphate, un précurseur de la synthèse des nucléotides. Les réactions d'oxydoréduction et de décarboxylation réalisées dans la voie PPP engendrent la synthèse de NADPH impliqué dans les défenses antioxydantes en situation de stress et de dioxyde de carbone (CO_2) (285). Le ribulose-5-phosphate produit lors de la phase oxydative est ensuite utilisé par la branche non oxydative de la voie PPP afin de produire deux molécules de fructose-6-phosphate (F6P) et une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) (voir Figure 6) qui seront métabolisées en précurseurs de la biosynthèse d'acides aminés et d'acides nucléiques (286).

L'acide lactique produit lors de la glycolyse et le CO_2 produit par la voie PPP contribuent à l'acidification du TEM, qualifiée d'acidose, le pH influençant la survie, la croissance et le développement cellulaire. L'acidification promeut la métastase ainsi que la résistance aux traitements, inhibe la réponse immunitaire dirigée contre les tumeurs en plus de réguler des procédés tels que la résistance à l'apoptose. En empêchant la co-stimulation des lymphocytes CD8+, l'acidose provoque leur anergie, ce qui diminue l'activité cytotoxique, la production de cytokines et la signalisation du TCR (287, 288). L'hypoxie et la production de lactate lors de la glycolyse induisent des facteurs angiogéniques qui recrutent des TAMs au site tumoral. Ces derniers produisent des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, TNF- α et IL-8, ainsi que des métalloprotéinases qui altèrent la matrice extracellulaire et la structure des néovaisseaux, participant ainsi à l'invasion et la métastase (289). Ceci illustre bien comment la tumeur exploite son environnement à son avantage pour induire une immunosuppression favorisant la migration et l'invasion.

Nous savons aujourd'hui que les tumeurs sont très hétérogènes, comme abordé plus en détail à la section 1.3.9, et peuvent présenter plusieurs profils métaboliques différents. Ayant été démontré que la fonction mitochondriale demeure intacte dans plusieurs cancers, plusieurs sous-types de mélanome favorisent l'OXPPOS en condition aérobie pour assurer leurs besoins énergétiques et métaboliques (290). Dans ce processus, le pyruvate produit lors de la glycolyse est oxydé sous forme d'AcCoA qui réagit avec une molécule d'oxaloacétate pour former une molécule de citrate.

Des réactions de décarboxylation oxydative métabolisent le citrate sous forme d'alpha cétooglutarate (α -KG) puis de succinyl-CoA, ce qui génère deux molécules de CO_2 et deux molécules de NADH. Le succinyl-CoA est ensuite transformé en succinate qui sera oxydé sous forme de fumarate par la succinate déshydrogénase (SDH), une enzyme faisant partie de la chaîne de transport des électrons. Ceci permet de transférer deux atomes d'hydrogène à la flavine adénine dinucléotide (FAD) et ainsi produire deux molécules de FADH. Le fumarate est finalement converti en malate puis en oxaloacétate, permettant ainsi de perpétuer le cycle de l'acide citrique (CAC) (voir Figure 6). Le FADH produit par le CAC transfère des électrons à l'ETC, composée de cinq complexes protéiques situés dans la membrane interne des mitochondries (291) (voir Figure 6). Le transfert d'électrons d'un complexe à un autre génère un potentiel membranaire permettant la production de 30 à 36 molécules d'ATP par molécule de glucose, ce qui est plus efficace que la glycolyse produisant deux molécules d'ATP par molécule de glucose (292).

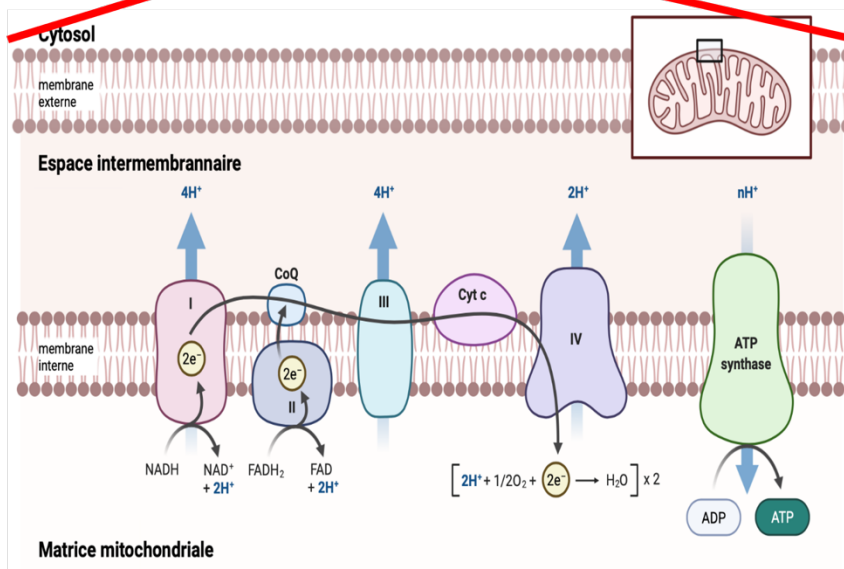
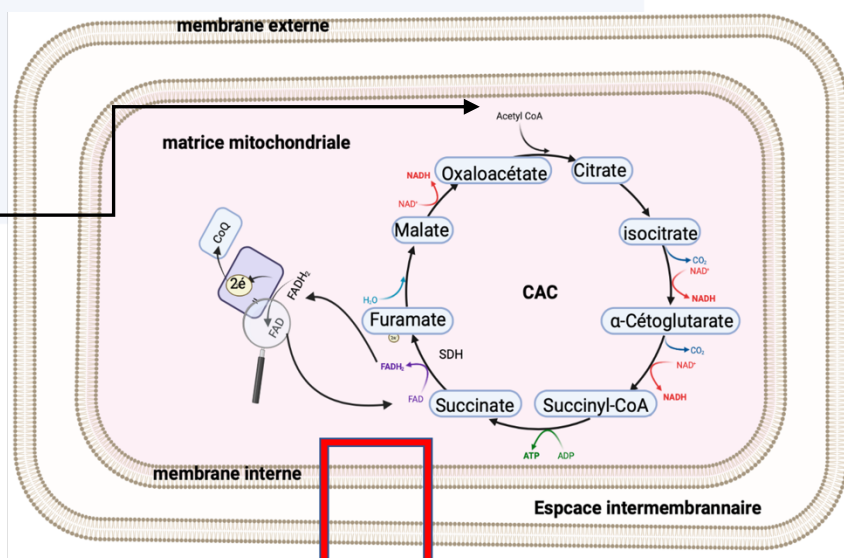
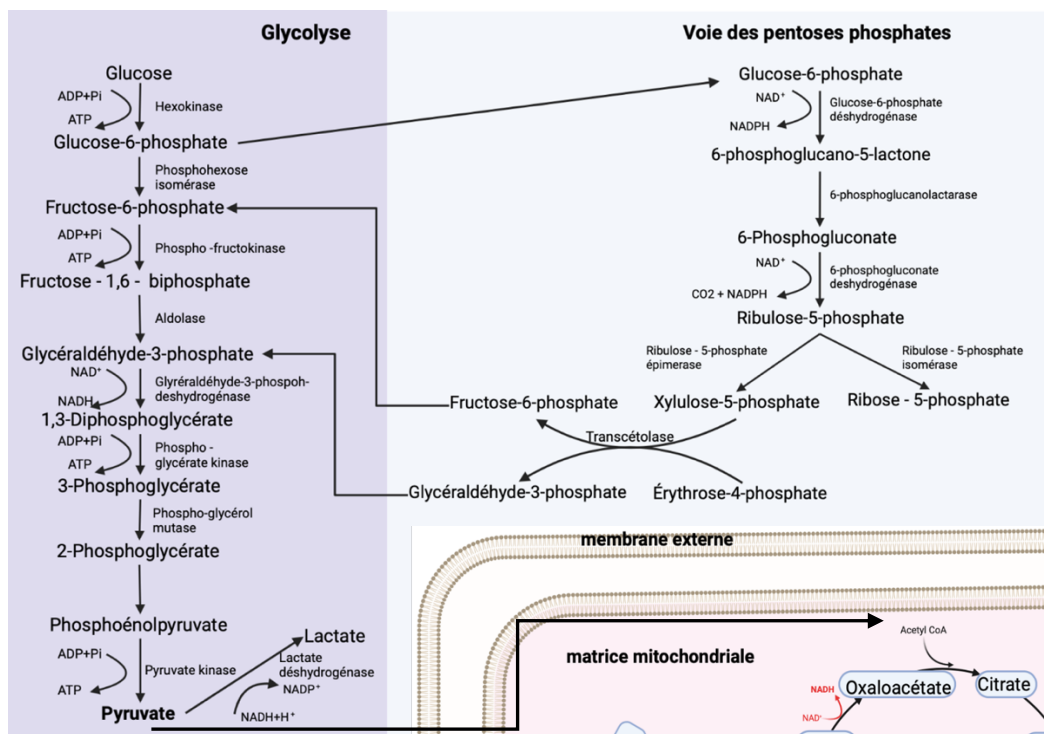


Figure 6 : Voies métaboliques principales soutenant la synthèse de pyruvate et la production mitochondriale d'ATP (293-295). Différents facteurs environnementaux, notamment la présence ou non d'oxygène ainsi que le statut énergétique des cellules, modulent la fonction mitochondriale. L'hypoxie détourne le métabolisme du glucose en faveur de la glycolyse et de la fermentation du pyruvate sous forme de lactate directement dans le cytoplasme. À l'inverse, en présence d'oxygène, l'AcCoA produit par la dégradation du glucose (oxydation du pyruvate produit par la glycolyse, voie des PPP) et l'oxydation des acides gras peut être capté par la mitochondrie afin d'alimenter le CAC. L'AcCoA subit alors plusieurs réactions successives d'oxydation et de carboxylation permettant de produire des molécules de CO₂, de FADH₂ et de NADH. Les molécules de FADH₂ et de NADH fournissent des électrons à l'ETC composée de cinq complexes protéiques situés au niveau de la membrane de la mitochondrie. Le passage d'électrons d'un complexe à un autre active des pompes à protons qui provoquent l'accumulation d'ions H⁺ au niveau de l'espace intermembranaire des mitochondries, engendrant ainsi un potentiel membranaire. Ce dernier génère suffisamment d'énergie pour activer l'ATP synthase, permettant de phosphoryler l'ADP pour produire de l'ATP. **AD** : Flavine adénine dinucléotide, **FA H₂** : Forme réduite de la flavine adénine dinucléotide, **DH** : Succinate déshydrogénase, **N D⁺** : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée, **N DH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase, **TP** : Adénosine triphosphate, **DP** : Adénosine diphosphate, **AC** : Cycle de l'acide cytrique. Figure créée à l'aide de Biorender : www.biorender.com

1.7. Rôle de la mitochondrie dans la réponse immunitaire

Les PAMP et DAMP (voir section 1.5.1) sont détectés par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR). Ces derniers sont répartis en différentes classes, soient les PRR transmembranaires, les PRR cytosoliques et les PRR sécrétés. Les PRR transmembranaires incluent les TLR (voir section 1.5.1) et les récepteurs de lectines de type C. Les PRR cytosoliques incluent les récepteurs de type gène 1 induits par l'acide rétinoïque (RLR) et les récepteurs de type NOD (NLR). Les PRR reconnaissent des signaux invariables spécifiques aux microbes et partagés par les membres d'une même classe. Ainsi, les TLR détectent les lipopolysaccharides exprimés au niveau de la membrane des bactéries à Gram négatif, des acides nucléiques provenant du matériel génétique microbien (296). Les récepteurs des lectines de type C détectent des polysaccharides présents dans la paroi fongique, notamment les β-glucanes et le mannan (297). Les RLR, quant à eux, reconnaissent les extrémités 5' triphosphate des ARN double brin viraux (298). Finalement, les NLR détectent des produits de dégradation des peptidoglycans retrouvés dans la paroi des bactéries à GRAM positif (296). Les PRR font partie de l'immunité innée, une réponse rapide et immédiate à une infection par des pathogènes de nature diverse. L'activation des PRR active des facteurs de transcription comme NF-κB, les IRF ou le facteur nucléaire des lymphocytes activés NFAT (voir section 1.5.1). L'activation des PRR induit la relâche de cytokines et de chimiokines, par exemple IL-8, CXCL1, CCL2 ou les facteurs chimio-attracteurs des monocytes (MCP) 1-4

(299), qui participent à la réponse inflammatoire et au recrutement de cellules effectrices de la réponse immunitaire adaptative (voir section 1.5.1).

Les DAMP sont des molécules normalement conservées à l'intérieur des cellules, mais qui sont libérées lors de dommages ou de mort cellulaire, particulièrement en cas de nécrose. Des dommages affectant la perméabilité ou le potentiel membranaire mitochondrial, de même qu'une dysfonction mitochondriale ou un stress cellulaire, peuvent provoquer la relâche de ROS, d'ADN mitochondrial et de phospholipides vers le cytosol (300). Les phospholipides relâchés par les mitochondries peuvent activer l'inflammasome (301). En effet, les dommages à l'ADN mitochondrial, notamment provoqués par les ROS, activent l'inflammation et la mitophagie, cette dernière ayant pour objectif de retirer les mitochondries endommagées responsables de la production de ROS (302). L'ATP relâchée par la mitochondrie lors de la nécrose ou de l'apoptose active l'inflammasome, ce qui provoque l'activation de *TFAM*. À son tour, *TFAM* contribue à amplifier la réponse inflammatoire et induit une réponse immunitaire via l'activation des cellules dendritiques (303). En plus d'induire une réponse inflammatoire pouvant activer l'immunité innée et adaptative (voir section 1.5.3), les différents DAMP relâchés par les mitochondries lors de dommages ou d'infection peuvent être détectés par les PRR. Par exemple, les TLR activés par l'ADN mitochondrial induisent TRAF6. TRAF6 transloque ensuite au noyau où il ubiquitine l'intermédiaire de la signalisation Toll conservé au cours de l'évolution (ECSIT). ECSIT s'accumule alors en périphérie de la mitochondrie et induit la production de ROS. TLR4 contribue au recrutement de NF- κ B ainsi qu'à la régulation de son activité, ce qui induit la production de cytokines pro-inflammatoires (304). De plus, les ROS induits par l'accumulation de ECSIT exercent un rôle antibactérien permettant d'éliminer directement les agents pathogènes.

1.8. La famille des coactivateurs 1 du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PGC-1s)

1.8.1. Découverte des PGC-1s

Les PGC-1s désignent une famille de co-activateurs transcriptionnels qui potentialisent la transcription de gènes de la biogenèse et de la fonction mitochondriale, incluant des gènes du métabolisme et des défenses antioxydantes. La famille des PGC-1s est composée de trois membres.

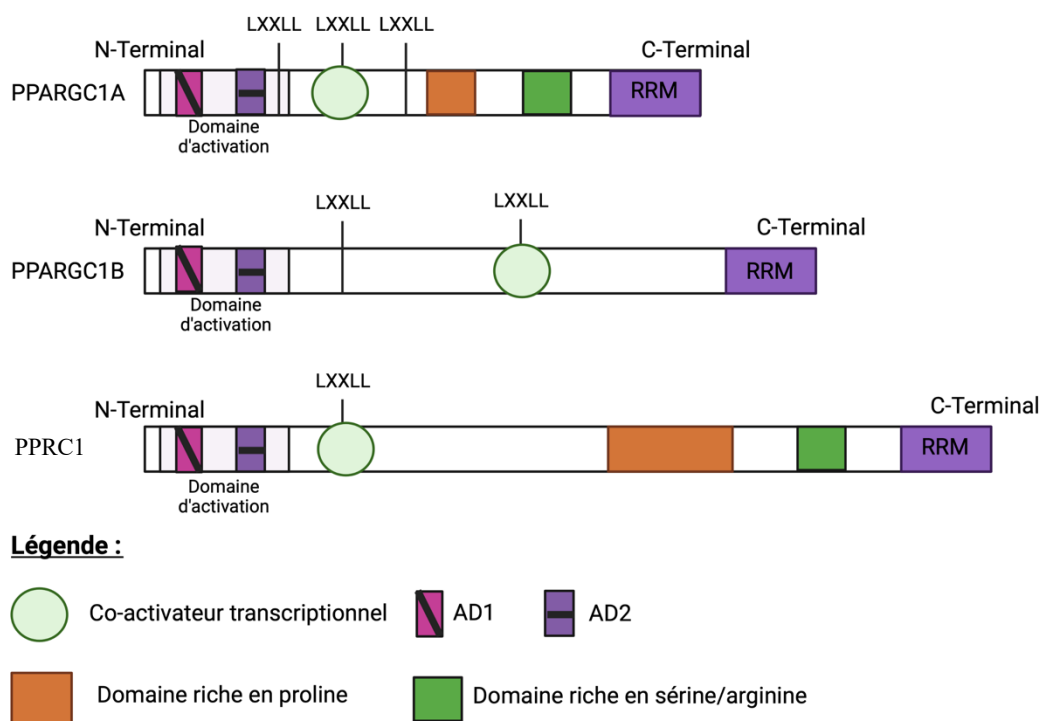
Le membre le plus connu, et le seul étudié à ce jour dans le cancer est PGC-1 α , qui fut découvert en 1998 par Bruce Spiegelman et son équipe dans le tissu adipeux brun, riche en mitochondries et spécialisé dans la thermogénèse (305). Ce processus désigne l'énergie libérée sous forme de chaleur en réponse à des changements environnementaux ou métaboliques. La thermogénèse fait notamment intervenir des protéines découplantes mitochondriales (UCP) impliquées dans la diffusion d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale, permettant ainsi de transformer l'énergie produite par l'ETC sous forme d'ATP. Lors d'une chute de température, les UCP détournent l'énergie produite par la respiration mitochondriale sous forme de chaleur. L'expression des UCP est régulée par *PPAR γ* qui agit comme facteur de transcription pour réguler l'expression de gènes impliqués dans la tumorigénèse, la différenciation et le métabolisme. *PPAR γ* exerce ses fonctions en se liant à son coactivateur, PGC-1 α , qui chez l'humain est encodé par le gène *PPARGC1A*. Dans le tissu adipeux brun, le froid augmente l'expression de PGC-1 α , qui induit à son tour l'expression d'enzymes de la chaîne respiratoire et la biogénèse mitochondriale. Plus tard, PGC-1 β , encodé par le gène *PPARGC1B*, qui partage une très forte homologie avec PGC-1 α , ainsi que *PPRC1*, encodé par le gène *PPRC1*, ont été identifiés par homologie de séquence d'ADNc et de protéine respectivement (305, 306). PGC-1 β est également largement exprimé dans le tissu adipeux brun. Cependant, comparativement à PGC-1 α , l'expression de PGC-1 β n'est pas induite par le froid. PGC-1 β est toutefois impliqué dans la différenciation des adipocytes bruns. Ceci suggère des rôles distincts de PGC-1 α et de PGC-1 β dans la régulation du tissu adipeux brun (307). La déplétion de PGC-1 β dans les souris augmente la sensibilité au froid. En effet, la déplétion de PGC-1 β diminue l'expression d'enzymes de l'oxydation des acides gras, ce qui suggère que PGC-1 β supporte le métabolisme oxydatif impliqué dans la thermogénèse (308). Les différents PGC-1s exercent des fonctions souvent similaires, mais peuvent également jouer des rôles différents qui leur sont propres dans divers contextes (voir section 1.8.4).

PGC-1 α et PGC-1 β sont fortement exprimés dans des tissus dont le métabolisme mitochondrial et le potentiel oxydatif sont élevés, alors que l'expression de PRC est ubiquitaire (309). En plus de leur rôle dans la thermogénèse, les PGC-1s sont exprimés dans le foie, le cerveau, le cœur et le muscle squelettique, où ils détectent des changements bioénergétiques issus du microenvironnement, par exemple des changements dans la biodisponibilité des nutriments,

l'exercice physique et la production d'ATP (310). L'expression et l'activation des PGC-1s sont relatives au tissu et au contexte, mais tant PGC-1 α que PGC-1 β sont impliqués dans la biogenèse mitochondriale, la détoxification des ROS et la gestion du stress oxydatif (307). PGC-1 α et PGC-1 β jouent des rôles connexes dans l'oxydation des acides gras en situation de déprivation de glucose (311), mais ils exercent des fonctions distinctes au niveau de la néoglucogenèse (312) et du métabolisme des lipides (313) respectivement.

1.8.2. Structure et domaines des PGC-1s

Les PGC-1s possèdent un domaine d'activation en N-terminal présentant un motif LXXLL (Leucine-X-X-Leucine-Leucine) (voir Figure 7) permettant la liaison et l'interaction avec des coactivateurs transcriptionnels tels que le complexe coactivateur SRC-1/p300 des récepteurs des stéroïdes, un signal de localisation nucléaire et un motif de reconnaissance de l'ARN (RRM) en C-terminal (306). On retrouve également, dans les PGC-1s, deux domaines, nommés AD1 et AD2 (voir Figure 7), constitués d'acides aminés conservés entre *PPARGC1A* et *PPARGC1B* chez la souris, le rat et l'humain, et participant chacun à 50% de l'activité transcriptionnelle des PGC-1s. Le domaine AD1, un peptide de 11 acides aminés, possède cinq résidus d'acide aspartique chargés négativement responsables de son activité. De son côté, l'activité du domaine AD2 est modulée par des résidus leucine arrangés selon la séquence LLXX, le premier motif riche en leucine de *PPARGC1A* et *PPARGC1B*, et forme une structure secondaire en hélice alpha. Ce motif permet à PGC-1 α et PGC-1 β d'interagir avec le récepteur alpha lié aux œstrogènes (ERR α). Ces domaines d'activation induisent les promoteurs de gènes sensibles à l'activité des PGC-1s (314).



Figur 7 : Domaines fonctionnels des PGC-1s. Les PGC-1s possèdent une certaine homologie de séquence au niveau de leur domaine d'activation de liaison à l'ARN, ainsi qu'au niveau structurel (315). Les PGC-1s possèdent un domaine d'activation en N-terminal, un ou plusieurs motifs LXXLL, qui constituent un site de liaison pour les récepteurs nucléaires interagissant avec les PGC-1s (316), un domaine riche en sérine/arginine et un domaine de reconnaissance de l'ARN situé en C-terminal. Ils possèdent également, à l'exception de *PPARGC1B*, un domaine riche en proline. Figure créée à l'aide de Biorender : www.biorender.com

1.8.3. Facteurs de transcription et récepteurs nucléaires interagissant avec les PGC-1s

Les PGC-1s sont des coactivateurs qui lient, au niveau du motif LXXLL, différents récepteurs nucléaires et facteurs de transcription tels que *PPAR γ* , le facteur 1 de respiration nucléaire (*NRF-1*) et potentiellement *NRF-2* qui régule la réplication de l'ADN mitochondrial et la transcription de gènes de la respiration mitochondriale (317). Les PGC-1s peuvent également lier des protéines présentant un domaine histone acétyltransférase (HAT) telles que la protéine de liaison à CREB (CBP/p300) et le coactivateur des récepteurs des stéroïdes (SRC-1) (318) qui participent au remodelage de la chromatine afin de permettre le recrutement d'autres facteurs de transcription. De plus, PGC-1 α peut interagir, via TRAP220, avec le complexe médiateur TRAP à l'extrémité N-terminale, ce qui promeut l'activité de récepteurs nucléaires et la liaison de l'ARN polymérase II (319). La phosphorylation de PGC-1 α par la kinase Cdc2-like (CLK2) provoque le détachement du complexe médiateur TRAP et la dégradation de PGC-1 α par le protéasome pour inhiber la réponse PGC-1 α (320). PGC-1 α peut aussi être acétylé par la Spt-Ada-Gcn5 acétyltransférase

(SAGA), ce qui active ou réprime son activité transcriptionnelle selon l'endroit où se produit la modification. PGC-1 α interagit également avec NSUN7 qui catalyse la méthylation de cytosine en 5-méthylcytosine (m⁵C) et module l'expression de gènes cibles de PGC-1 α , notamment *PFKL*, *SIRT5*, *IDH3B* et *HOMOX2* (321). Finalement PGC-1 α peut induire la transcription en délogeant du promoteur de leurs gènes cibles des répresseurs comme les histones désacétylases, qui augmentent normalement le niveau de compaction de l'ADN autour des histones, le rendant inaccessible pour la machinerie transcriptionnelle.

La liaison de PPAR γ avec PGC-1 β induit un changement de conformation de PGC-1 β qui interagit indirectement avec SRC-1 afin d'induire l'activité transcriptionnelle de *ER α* via les motifs LXXLL retrouvés au niveau de son domaine de coactivation AF-1 (322). De plus, PGC-1 β peut se lier et ainsi co-activer des facteurs de transcription d'autres familles, tel que les protéines de liaison aux éléments régulateurs des stérols (SREBP) qui induisent l'expression de gènes de la lipogenèse (313), le facteur de transcription Forkhead de type O1 (*FOXO1*) qui induit l'expression de gènes de la glucogenèse (312) ainsi que Sox9 qui régule l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des chondrocytes et la synthèse de cartilage (323). Les PGC-1s possèdent ainsi différents sites de liaisons leur permettant d'interagir avec différents facteurs de transcription, chacun activant un programme transcriptionnel différent selon le contexte et le tissu où il est exprimé.

1.8.4. Fonctions des PGC-1s

1.8.4.1. Biogenèse mitochondriale

L'ADN mitochondrial, dont la transcription est régulée par les facteurs de transcription Diméthyladénosine transférase mitochondriale 2 (*TFB2M*) et le Facteur de transcription mitochondrial ADN grippant A (*TFAM*), encode pour 13 protéines des complexes I, II, IV et V de la chaîne de respiration mitochondriale, alors que les enzymes du métabolisme oxydatif sont encodées par l'ADN génomique (324). PGC-1 α régule la quantité d'ADN et de protéines mitochondriales dans les cellules et est impliqué dans la production d'ATP, en plus de moduler le nombre et la physiologie des mitochondries (325). PGC-1 α lie un grand nombre de facteurs de transcription et de récepteurs nucléaires associés à la respiration mitochondriale tels que *NRF-1*, *ERR α* , *YY1* et *PPAR α* (324). Lors d'une déplétion en PGC-1 α , on remarque une diminution de la

consommation d'oxygène corrélant avec une diminution de l'expression de gènes codant pour les complexes I ou I+II de la chaîne de transport des électrons (326), dont l'activité ne peut pas être compensée par le complexe II (325). PGC-1 α transactive des gènes cibles de *NRF-1* (327) impliqué dans la biogenèse mitochondriale. PGC-1 α interagit également avec *ERR α* et *GABPA* (*NRF-2 α*) pour réguler l'expression de gènes de la respiration mitochondriale. Ensemble, *ERR α* et *NRF-1* modulent l'expression de l'activateur de mort cellulaire *CIDEA*, également impliqué dans le métabolisme des lipides au niveau du foie ainsi que dans la thermogenèse au niveau du tissu adipeux brun (328). L'activation de *NRF1* et de *NRF2* induit l'expression de gène encodant pour des protéines de l'ETC en plus d'induire *TFAM*. Ce dernier transloque au niveau de la matrice mitochondriale où il joue un rôle dans la réplication, la transcription et le contrôle qualité de l'ADN mitochondrial en plus de réguler l'expression de protéines encodées par l'ADN mitochondrial (329). PGC-1 α active également le récepteur alpha des œstrogènes (*ER α*) qui augmente la masse mitochondriale.

1.8.4.2. Régulation du métabolisme

Les cellules cancéreuses ont la particularité de proliférer de façon incontrôlée. Pour maintenir les voies de biosynthèse nécessaires à leur survie, des oncogènes tels que *RAS*, *Myc*, ainsi que *HIF1A* augmentent l'expression du transporteur de glucose GLUT1 (92) et d'enzymes de la glycolyse, altérant le métabolisme des cellules cancéreuses en fonction de la disponibilité de l'oxygène (177). Il existe donc plusieurs profils métaboliques dans le mélanome déterminés par le profil énergétique des cellules ainsi que par la disponibilité des nutriments et de l'oxygène. Les PGC-1s permettent de détecter des changements dans le statut énergétique des cellules ou dans la disponibilité des nutriments au niveau du TEM puis activent des voies métaboliques adaptatives permettant aux cellules cancéreuses d'assurer leurs besoins énergétiques même en situation d'hypoxie ou de carence en nutriments.

Dans le mélanome, les cellules qui expriment fortement PGC-1 α expriment également fortement *MITF*, un marqueur des mélanocytes impliqué dans la pigmentation de la peau (voir section 1.1.2.1). En effet, *MITF* endogène se lie au promoteur de PGC-1 α , ce qui lui permet de réguler son activité et ainsi d'induire l'expression du transcrite de PGC-1 α (330). *MITF* intervient dans le passage d'un métabolisme glycolytique à un métabolisme oxydatif en augmentant la

consommation d'oxygène, en induisant l'expression de gènes de l'OXPPOS via PGC-1 α (voir section 1.8.4.2), et en diminuant la production de lactate (183). Dans des mélanocytes humains immortalisés, l'activation de la signalisation des MAPK, par exemple par l'introduction de la mutation *BRAF*^{V600E}, corrèle inversement avec l'expression de MITF et de ses cibles, dont PGC-1 α . À l'inverse, on remarque, chez des patients dont les tumeurs présentent une activation de la signalisation des MAPK, le traitement avec un inhibiteur de BRAF/MEK induit l'expression de MITF et de PGC-1 α . Toujours dans des mélanocytes humains immortalisés, les cellules qui présentent naturellement la mutation *BRAF*^{V600E} présentent également une faible expression de MITF, ce qui corrèle avec une faible expression de PGC-1 α . Ainsi, la mutation *BRAF*^{V600E} corrèle avec une faible expression de MITF et de PGC-1 α (183). Ceci engendre un remodelage métabolique en faveur de la glycolyse caractérisé par une augmentation de la consommation de glucose. Les cellules présentant une mutation *BRAF* sont souvent dépendantes de la glycolyse alors que les cellules qui expriment fortement *MITF* dépendent de leur fonction mitochondriale. Le traitement avec des inhibiteurs de BRAF induit *MITF* et rend les cellules de mélanome plus sensibles aux agents découplants et aux inhibiteurs de l'OXPPOS (183). Ceci suggère que *MITF* pourrait être exploité en clinique afin d'empêcher la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses et ainsi enrayer la résistance aux inhibiteurs de BRAF.

Dans le cancer de la thyroïde, la mutation *BRAF*^{V600E} induit la phosphorylation de MEK1/2 et augmente les niveaux de HIF-1 α , ce qui inhibe Myc. En effet, HIF-1 α inhibe l'activité transcriptionnelle de Myc en l'empêchant de se lier avec ses partenaires au niveau de gènes cibles de *Myc* (331), ce qui permet aux cellules de continuer à croître même en situation d'hypoxie. Au contraire, lorsqu'il est activé, Myc se lie à un site spécifique (5'-CACGTG-3') présent au niveau de l'intron 1 du transcrite codant pour PGC-1 β et active l'activité transcriptionnelle de ce dernier. Ainsi, la mutation *BRAF*^{V600E} inhibe PGC-1 β via *Myc*, ce qui diminue la consommation d'oxygène, l'expression de complexes de l'ETC et l'expression de gènes de l'OXPPOS. Ceci suggère que HIF-1 α participe également à la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses en faveur de la glycolyse, puisque l'activation de HIF-1 α induit des enzymes de la glycolyse telles que LDHA et PKM2 (332). En plus d'induire des enzymes des défenses antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD2), les peroxyrédoxines (Prdx-) 3 et 5 ainsi que la thioredoxine 2 (Txn 2).

PGC-1 β joue également un rôle dans le métabolisme des lipides. En effet, PGC-1 β induit l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse d'acide gras. La première, Acc, convertit l'acétyl-Coenzyme A (AcCoA), produit à partir du pyruvate lors de la glycolyse, en malonyl-CoA. La seconde, l'acide gras synthase (FASN), catalyse la conversion du malonyl-CoA en acide palmitique à partir duquel peuvent être synthétisés d'autres acides gras. Finalement, la stéaroyl-CoA désaturase -1 (SCD1), est responsable de la formation du double lien carbone-carbone lors de la synthèse de l'acide oléique, un constituant des phospholipides membranaires et des esters de cholestérol. PGC-1 β promeut la dégradation des acides gras par β -oxydation (333), ce qui produit des molécules de NADH et de FADH₂ permettant d'alimenter l'ETC pour la production d'ATP. Le NADPH produit permet également la détoxification des ROS et protège les cellules cancéreuses contre le stress oxydatif et les dommages cellulaires qu'il provoque (334), assurant ainsi leur survie.

1.8.4.3. Mécanisme de production de ROS par la mitochondrie

La mitochondrie, via le métabolisme oxydatif (OXPHOS), est la principale source de ROS cellulaires. Ceux-ci incluent des ions superoxydes (O₂⁻) et des molécules de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). En effet, lors de l'OXPHOS, l'oxydation de donneur d'électrons permet de produire de l'ATP. Ce procédé est réalisé par la chaîne de transport des électrons (ETC) composée de cinq complexes protéiques (CI/II/III/IV/V) situés dans la membrane interne de la mitochondrie (335). Le CAC produit des molécules de NADH et de FADH₂, des transporteurs qui peuvent être oxydés afin de libérer des électrons de haute énergie (336). Ces électrons sont ensuite libérés dans la matrice mitochondriale. Le NADH est capté par le complexe I de l'ETC, également appelé NADH-ubiquinone oxydoréductase (ou NADH-coenzyme Q oxydoréductase). La NADH déshydrogénase, responsable de l'activité enzymatique de ce complexe, catalyse le transfert d'un électron du NADH à l'ubiquinone (CoQ) afin de le réduire sous forme d'ubiquinol (QH₂). Ce transfert provoque un changement de conformation de certaines sous-unités de CI permettant le transfert de quatre protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire selon un mécanisme encore obscur (337). Le complexe II, également appelé succinate déshydrogénase, est le seul complexe de l'ETC incorporé au CAC. La succinate déshydrogénase catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et utilise les électrons provenant du succinate pour réduire le FAD en FADH₂. Les électrons provenant de FADH₂ sont ultimement transférés à l'ubiquinone (CoQ) afin de le réduire

sous forme d'ubiquinol (QH_2) (338). L'oxydation de ce dernier sous forme d'ubisemiquinone (QH^\cdot) rejette deux protons dans l'espace intermembranaire et permet de transférer un électron d'abord à une sous-unité catalytique de CIII, également appelé CoQ-cytochrome c réductase, puis ultimement au cytochrome c. Le second électron de QH^\cdot est transféré à une autre sous-unité catalytique de CIII, ce qui génère une molécule totalement oxydée (Q^\cdot). CIII contient également un site pour la réduction de l'ubiquinone. Ainsi, une seconde molécule d'ubiquinol (CoQ), transfère un électron à l'ubiquinone (Q^\cdot) formée précédemment. Ceci, avec les deux protons relâchés dans l'espace intermembranaire lors de l'oxydation de la première molécule d'ubiquinol, permet de former une molécule d'ubiquinol supplémentaire (339) qui pourra être oxydée pour perpétuer le cycle. Le cytochrome c transfère quatre électrons au CIV, également appelé cytochrome c oxydase. Ceux-ci, combinés à huit protons provenant de la matrice mitochondriale, permettent de réduire le dioxygène (O_2), l'accepteur final de l'ETC, et de produire deux molécules d'eau (H_2O) (340). Quatre protons sont relâchés dans l'espace intermembranaire. Les protons présents dans l'espace intermembranaire sont transférés vers la matrice mitochondriale, ce qui génère un gradient pouvant être utilisé comme force électrochimique afin d'activer CV, également appelée ATP synthase qui phosphoryle l'ADP (341) afin de produire de l'ATP. La production d'ATP par PGC-1 α lors de la respiration mitochondriale n'est pas aussi efficace que pour PGC-1 β à cause de la réentrée de protons dans la mitochondrie (324), ce phénomène étant dicté par le niveau de métabolisme basal.

Cependant, certains électrons peuvent s'échapper de l'ETC et interagir directement avec l'oxygène moléculaire sans le réduire complètement sous forme de molécule d'eau, ce qui engendre la formation d'ions superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (342) au niveau de la matrice mitochondriale. Les complexes I et III sont les principaux sites de production de ROS mitochondriaux (343), leur contribution relative étant tissu spécifique. Le NADH permet l'entrée d'électrons dans l'ETC au niveau de CI. Des dommages aux complexes de l'ETC, une diminution de la disponibilité de l'oxygène, une diminution de la demande énergétique, ou une diminution de la respiration inhibent l'ETC, empêchent la consommation du NADH et augmentent le ratio NADH/NAD^+ . Ce ratio détermine le potentiel REDOX de CI. Lorsque le ratio NADH/NAD^+ est élevé, les électrons de NADH peuvent, plutôt que d'être transférés à l'ubiquinone, interagir directement avec l'oxygène afin de former d'ions superoxyde (344). De plus, lorsque la réduction de l'ubiquinone est importante, les électrons transférés à CoQH_2 à partir du succinate suite à son

oxydation par CII peuvent être retournés vers CI afin de réduire le NAD^+ en NADH. Ce phénomène, qualifié de transport inverse des électrons, est associé à une forte production de peroxyde d'hydrogène et d'ions superoxyde (345) selon un mécanisme obscur impliquant le site de liaison de l'ubiquinone à CI et le transport de protons d'un côté et de l'autre de la membrane interne de la mitochondrie (346). L'antimycine A est un composé qui inhibe spécifiquement CIII de l'ETC en se liant au niveau d'un site catalytique. L'antimycine A délège l'ubiquinone et l'empêche d'interagir avec la sous-unité catalytique de CIII, ce qui inhibe le transport d'électrons vers le cytochrome C. Cette inhibition bloque entièrement l'ETC responsable d'établir un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie et engendre la formation de ROS.

1.8.4.4. Implication de PGC-1 α dans la gestion du stress oxydatif

PGC-1 α promeut l'expression de gènes de la chaîne de transport des électrons, notamment des protéines des complexes I et IV, et de la réponse anti-oxydante impliqués dans la détoxification des ROS produit lors d'une augmentation de l'activité et de la respiration mitochondriale. En effet, dans les tissus qui expriment beaucoup PGC-1 α , ce dernier à un facteur de transcription présent au promoteur de gènes de la réponse anti-oxydante pour induire l'expression de Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD), qui transforme les anions superoxydes en oxygène et en peroxyde d'oxygène, de UCP-2, ainsi que de thiorédoxine, glutaredoxine et de peroxirédoxine, responsables du maintien du potentiel REDOX (330). Ces mécanismes de défense permettent d'éviter l'accumulation de ROS et l'apoptose engendrées par une augmentation de la biogenèse et de l'activité mitochondriale dont PGC-1 α est responsable, en plus d'augmenter la capacité de détoxification des cellules (347).

Les ROS peuvent aussi bien être bénéfiques que néfastes dans le développement du cancer. En effet, ils peuvent, d'un côté, stimuler la prolifération des cellules cancéreuses et engendrer une instabilité génomique menant à la transformation de cellules saines en cellules tumorales. D'un autre côté, les ROS peuvent être toxiques et engendrer des dommages conduisant à la mort des cellules. Les ROS activent également des facteurs pro-apoptotiques tels que BAX (348), et sont impliqués dans la peroxydation des lipides, soit la dégradation des lipides par oxydation. Ce

phénomène engendre la production de malondialdéhyde, un composé mutagène et cancérigène qui altère la structure des protéines et réagit avec des bases de l'ADN pour former des adduits génotoxiques (349).

La N-acétyl-L-cystéine (NAC) est un précurseur de la L-cystéine un acide aminé important dans la synthèse du glutathion (350). Le Trolox est un analogue de la vitamine E. Il séquestre les radicaux libres selon un mécanisme encore mal compris (351). Le Trolox et le NAC exercent donc tous les deux des effets antioxydants. Ils empêchent également le clivage de PARP, ce qui empêche l'apoptose (352). La diminution de l'expression de PGC-1 α perturbe le potentiel membranaire mitochondrial. Les cellules qui expriment peu PGC-1 α produisent beaucoup de ROS et présentent une diminution des défenses antioxydantes. Elles sont donc particulièrement sensibles à l'apoptose engendrée par les ROS et le stress oxydatif, cette sensibilité étant renversée par le Trolox et NAC. Une diminution de l'expression de cibles de PGC-1 α , telles que NDUFS3, COX5A et ATP5b, diminue la consommation d'oxygène, augmente celle du glucose, augmente la sécrétion de lactate, diminue la production de ROS et diminue l'expression de GSH. Les cellules exprimant peu ou pas PGC-1 α sont également plus sensibles à des thérapies telles que piperlongumine, PEITC ou doxorubicine (330), qui induisent un stress oxydatif toxique à la cellule.

On pourrait donc penser qu'inhiber les défenses antioxydantes des cellules cancéreuses est une approche thérapeutique intéressante, mais les dommages à l'ADN induits par le stress oxydatif contribuent à la carcinogenèse et stabilisent HIF-1 α , ce qui favorise un métabolisme glycolytique et l'angiogenèse, (353, 354). Les ROS sont également impliqués dans la prolifération, la migration et l'invasion, et une production faible à modérée de ROS promeut la croissance et empêche l'activation de voies de signalisation apoptotiques. Les ROS inactivent l'inhibiteur de l'autophagie Atg8, ce qui active la formation d'autophagosomes spécifiquement dirigés contre les mitochondries, ce qui permet d'éliminer les mitochondries dysfonctionnelles produisant une quantité néfaste de ROS. Cette stratégie est exploitée par les cellules cancéreuses pour conserver les ROS à un niveau permettant leur prolifération et la croissance tumorale plutôt que menant à l'apoptose (348).

1.8.4.5. Réponse inflammatoire

PGC-1 α et PGC-1 β modulent la signalisation NF- κ B en empêchant la phosphorylation de la sous-unité p65, ce qui inhibe son activité transcriptionnelle (355), ce qui induit l'expression de facteurs anti-inflammatoires tels que CCL1, CCL22, IL-1Ra et TGF- β , et inhibe l'expression de l'IL-12 pro-inflammatoire (356, 357). L'environnement anti-inflammatoire induit par l'inhibition de l'IL-12 exerce des effets immunomodulateurs médiés par les PGC-1s tels que l'activation alternative des macrophages qui adoptent un phénotype « M2 » (358) anti-inflammatoire (voir section 1.5). Le profil anti-inflammatoire de ces derniers est caractérisé par la sécrétion d'IL-10 et TGF- β . Les macrophages de type M2 favorisent la production de collagène pour la réparation des tissus et débarrassent les cellules apoptotiques. Les macrophages associés aux tumeurs présentent souvent ce profil et produisent des facteurs de croissance et des cytokines favorisant l'angiogenèse, par exemple VEGF. Ces macrophages permettant ainsi au mélanome de progresser plus longtemps sans être reconnu par le système immunitaire inné, mais ces macrophages peuvent aussi faire partie d'une réponse immunitaire de l'organisme contre la tumeur (voir les sections 1.5 et 1.5.1) (356, 359). L'activation de NF- κ B par le LPS, TNF α et IL-1 β diminue l'expression de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative, incluant PGC-1 α et PGC-1 β , ce qui supporte le rôle anti-inflammatoire de la déplétion des PGC-1s (360).

Le rôle anti-inflammatoire des PGC-1s a surtout été exploré dans le muscle squelettique. En effet, PGC-1 α et PGC-1 β sont enrichis dans le muscle squelettique, puisqu'il est riche en mitochondries et présente une importante capacité d'oxydation. Lors de l'exercice, l'activation de P-38 MAPK et de NFAT induit l'expression d'IL-6 (361). IL-6 induit l'antagoniste du récepteur de l'interleukine (IL-1Ra), qui inhibe les effets pro-inflammatoires d'IL-1, en plus d'induire l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et d'inhiber la production de TNF α (362). Le TNF α et l'IL-1 β induisent l'expression de PGC-1 α dans le muscle squelettique, ce qui augmente la biogenèse et la capacité de respiration mitochondriale lors de l'exercice.

PGC-1 α et PGC-1 β interagissent avec ERR α (voir section 1.8.3) un facteur de transcription impliqué non seulement dans la respiration mitochondriale et l'oxydation des acides gras, mais également dans l'inflammation et la réponse immunitaire. En effet, l'expression de ERR α est induite dans les macrophages activés en situation d'infection bactérienne. ERR α inhibe la réponse

inflammatoire induite par l'activation des TLR en inhibant la phosphorylation de la kinase inhibitrice de NF- κ B (I κ B α), ce qui empêche la translocation de p65 au noyau (363). Dans le macrophage, l'activation des TLR, particulièrement TLR2 et TLR4, active la kinase 1 activée par le facteur de croissance tumoral transformant bêta (TAK1), et l'activation de TAK1 est nécessaire à l'activation de NF- κ B (364). TAK1 se lie des protéines de liaison (TAB1-3) et phosphoryle plusieurs protéines impliquées dans la réponse à divers stress cellulaires. PGC-1 β lie TAB1, ce qui empêche la liaison de TAB1 avec TAK1, ce qui inhibe la réponse inflammatoire lors de l'activation des macrophages (365). En conclusion, le rôle des PGC-1s dans l'inflammation a surtout été étudié dans des modèles de macrophages résidants, de macrophages issus de la moelle osseuse ou des modèles de muscle squelettique mais leur rôle dans l'inflammation et l'immunité du mélanome reste à découvrir.

1.8.5. Régulation post-traductionnelle des PGC-1s

1.8.5.1. Phosphorylation par AMPK

Les cellules doivent sans cesse adapter leur métabolisme en fonction des contraintes bioénergétiques imposées par leur environnement. L'AMP, finement régulée dans les cellules, est un marqueur important du statut énergétique de la cellule. Le ratio AMP/ATP module l'activité de AMPK (voir Figure.8), qui peut également être activée par une stimulation adrénérurgique, par le peptide natriurétique, par l'hypoxie, par le manque de glucose ou par des adipokines (leptine, adiponectine), des régulateurs du métabolisme énergétique. AMPK détecte la diminution de la production d'énergie dans les cellules et réagit en induisant le catabolisme, souvent via des réactions d'oxydation, afin de libérer de l'énergie. AMPK est un maître régulateur du métabolisme et module l'expression de PGC-1 α ainsi que d'enzymes mitochondriales notamment dans le tissu adipeux.

Dans le tissu adipeux blanc, AMPK phosphoryle directement la protéine PGC-1 α (voir Figure.8) au niveau de résidus sérine et thréonine, ce qui contribue à l'homéostasie du glucose. L'inhibition de AMPK diminue l'expression de PGC-1 α et d'autres protéines mitochondriales telles que le cytochrome C, COR E1 ainsi que de PDH-E1 α , sans toutefois affecter l'expression de PPAR γ , la principale cible de PGC-1 α . Une déplétion de AMPK réduit l'induction de l'ARNm de PGC-1 α

médiée par la norépinephrine. AMPK est donc nécessaire au maintien des fonctions mitochondriales et pour l'induction de PGC-1 α par des stimuli physiologiques tels que la signalisation adrénérgique (366).

La phosphorylation de PGC-1 α par AMPK pourrait affecter sa capacité à lier certains facteurs de transcription ou altérer la fonction de coactivateurs de PGC-1 α . En effet, l'activation du promoteur du transcrit de PGC-1 α par AMPK fait intervenir la protéine PGC-1 α et la phosphorylation de cette dernière potentialise l'effet de PGC-1 α sur l'activation de son propre promoteur. De même, PGC-1 α est nécessaire à l'activité de AMPK dans l'oxydation des acides gras et pour l'induction de gènes mitochondriaux par AMPK. L'induction de PGC-1 α par un analogue de l'AMP active AMPK et augmente la respiration mitochondriale, son effet étant marqué dans les cellules exprimant fortement PGC-1 α (367).

1.8.5.2. SUMOylation et ubiquitination

PGC-1 α peut subir une SUMOylation sur le résidu lysine 183 retrouvé au niveau de son site d'activation. La SUMOylation consiste à ajouter de manière covalente un peptide, le petit modificateur de type ubiquitine (SUMO). Les protéines SUMO forment une famille composée de trois membres, SUMO-1, SUMO-2 et SUMO-3. Les protéines SUMO existent sous forme de précurseur qui doit d'abord être clivé par une protéase. De là, la protéine SUMO est prise en charge la protéine activatrice de SUMO (SAE). La protéine SUMO est ensuite transférée vers une conjugase qui interagit avec une ligase afin d'attacher le peptide SUMO à la protéine d'intérêt. La SUMOylation de PGC-1 α inhibe son activité transcriptionnelle en favorisant son interaction avec le corépresseur RIP140. Une altération du profil de SUMOylation de PGC-1 α rétablit son activité transcriptionnelle. La SUMOylation de PGC-1 α peut être renversée par des protéases et ces protéases peuvent également renverser la SUMOylation de corépresseur qui interagissent avec PGC-1 α (368).

PGC-1 α peut également être ubiquitinée, ce qui engendre sa dégradation rapide par le protéasome. L'ubiquitination fait intervenir les mêmes enzymes que la SUMOylation, à l'exception près que, lors de l'ubiquitination, la ligase transfère une ubiquitine à la protéine d'intérêt. Le transfert d'une

ubiquitine à une lysine située à l'extrémité N-terminale de PGC-1 α active la formation d'une chaîne de polyubiquitine et la dégradation de PGC-1 α au niveau du noyau (369). L'inhibition de l'ubiquitination de PGC-1 α induit la biogenèse et la fonction mitochondriale dans le muscle, ce qui augmente la tolérance à l'exercice (370).

1.8.5.3. Désacétylation par les Sirtuines

L'activation de AMPK et de la nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT), ainsi que la privation de nutriments, augmentent les niveaux intracellulaires de NAD⁺ et provoquent un déséquilibre du ratio NAD⁺/NADH, ce qui induit l'activité enzymatique des sirtuines (voir Figure.8). Le NAD est constitué de deux molécules d'adénine retenues entre elles par un groupe phosphaté et une molécule de ribose, un sucre. Les sirtuines (SIRT) sont des désacétylases qui clivent le NAD⁺ et catalysent le transfert d'un groupe acétyle vers la molécule de ribose, ce qui produit une molécule d'O-acétyl-ADP-ribose et une molécule de nicotinamide capable d'inhiber l'activité acétyltransférase des sirtuines.

L'activation de SIRT induit l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α . PGC-1 α induit la biogenèse mitochondriale dans les neurones en induisant les COX via NRF-1. L'acétylation de PGC-1 α peut également être régulée par SAGA (voir section 1.8.3) et l'inhibition de SAGA augmente également la masse mitochondriale. La désacétylation de PGC-1 α par SIRT1 et l'inhibition de SAGA empêche la dégénérescence de la masse mitochondriale observée dans les neurones de modèles de maladie de Parkinson ou de maladie de Huntington et ces effets semblent indépendants de PGC-1 β . Le stress oxydatif et une dysfonction mitochondriale, par exemple une perturbation de la fonction de complexes de l'ETC, sont impliqués dans la pathophysiologie de plusieurs maladies neurodégénératives. Étant donné le rôle de PGC-1 α et de PGC-1 β dans la biogenèse et la fonction mitochondriale, ceci suggère que des activateurs pharmacologiques des PGC-1s pourraient être efficaces pour le traitement de maladies neurodégénératives dans lesquelles les dommages oxydatifs et la dysfonction mitochondriale occupent une partie importante (371).

Tout comme SIRT1, PGC-1 α est induit par une carence de nutriments et une augmentation de la demande énergétique, ce qui suggère une interaction entre SIRT1 et PGC-1 α . En effet, PGC-1 α est directement désacétylé par SIRT1 (voir Figure 8) au niveau de treize résidus lysines, certains au

niveau de son site d'activation, ce qui induit son activité transcriptionnelle (372). Une fois désacétylé, PGC-1 α migre au noyau, ce qui augmente l'expression de la thermogénine (UCP1) impliquée dans le métabolisme mitochondrial, l'oxydation des acides gras et la biogenèse mitochondriale (373, 374). Le récepteur farnésioïde X (FXR) est un facteur de transcription de la superfamille des récepteurs nucléaires qui induit la transcription de gènes régulant le métabolisme des lipoprotéines, des triglycérides et du cholestérol. Il contient des éléments de réponse auxquels se fixe le facteur nucléaire hépatocytaire 4 (HNF4 α), qui peut être co-activé par PGC-1 α (375) afin d'induire l'expression de gènes encodant pour des enzymes impliquées dans la néoglucogenèse et la β -oxydation des acides gras (voir Figure 8), notamment la phosphoenolpyruvate carboxykinase et la glucose-6-phosphatase (G6Pase) (376), cette régulation étant inhibée par l'acétylation de PGC-1 α (377).

Le pyruvate est le principal précurseur utilisé pour la synthèse de glucose par la néoglucogenèse et peut également réguler la glycolyse. En effet, le pyruvate induit l'activation de PGC-1 α par SIRT1 afin d'induire l'expression de G6Pase et ainsi soutenir la néoglucogenèse. À l'inverse, le pyruvate empêche l'induction par PGC-1 α de la glucokinase, une enzyme qui phosphoryle le glucose afin qu'il soit entreposé sous forme de glycogène. Cette inhibition est renversée par SIRT1 (377). Ceci suggère une régulation de PGC-1 α et de SIRT1 par des facteurs issus du microenvironnement afin de faciliter l'adaptation des cellules à une carence en glucose.

1.8.6. Régulation par le microenvironnement

Plusieurs stress issus du TEM peuvent induire l'expression des PGC-1s. La mitochondrie est le principal consommateur d'oxygène et producteur de ROS des cellules. Le métabolisme mitochondrial est modulé en fonction de la disponibilité de l'oxygène et de divers métabolites. Ceci permet d'activer l'OXPPOS ou de rediriger le métabolisme vers la glycolyse en fonction du contexte bioénergétique imposé par le TEM (264, 378). De plus, plusieurs enzymes mitochondriales dépendantes de l'oxygène et d'autres métabolites mitochondriaux induisent des changements épigénétiques (379, 380) et régulent l'activité de HIF (381) de manière à intégrer des signaux provenant du microenvironnement et du métabolisme cellulaire permettant d'induire un programme transcriptionnel favorisant à la réponse à l'hypoxie. Ainsi, l'hypoxie promeut la mitophagie de manière à limiter la consommation d'oxygène et la production de ROS. La

mitophagie permet de maintenir la fonction mitochondriale et engendre un remodelage métabolique en faveur de l'O₂PHOS sans impacter les défenses antioxydantes ou les dommages à l'ADN. Ceci favorise la résistance à différentes thérapies, notamment le cisplatine (382). Ainsi, l'hypoxie induit l'expression ainsi que l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α (voir Figure 8) afin d'induire la biogenèse mitochondriale et la réplication de l'ADN mitochondrial. En effet, PGC-1 α participe à la fusion mitochondriale en situation d'hypoxie afin d'éliminer les organelles dysfonctionnelles et maintenir la fonction mitochondriale. De plus, PGC-1 α induit l'expression de la catalase et de SOD2, ce qui augmente les défenses antioxydantes des cellules et limite la production de ROS. Dans le cancer colorectal, PGC-1 α régule le cycle cellulaire de manière à favoriser la prolifération des cellules cancéreuses en plus de participer à leur migration en situation d'hypoxie (383). L'induction de PGC-1 α en situation d'hypoxie serait un mécanisme d'adaptation des cellules afin de maintenir le métabolisme mitochondrial et d'augmenter son efficacité de manière à maintenir la production d'ATP.

Une diète riche en acides gras saturés induit également l'expression de PGC-1 β . Le foie est le principal site de production des lipoprotéines impliquées dans le transport des lipides. Les lipoprotéines acheminent les triglycérides et le cholestérol vers les tissus périphériques. Les stérols désignent un sous-groupe de lipides, dont fait partie le cholestérol, constitué d'un cœur de stérane (trois cycles à six atomes de carbone et un cycle à cinq atomes de carbone) auquel est lié un groupe hydroxyle. Les protéines de la famille des SREBPs sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la synthèse, l'utilisation et l'entreposage des lipides (384, 385). Une diète riche en acides gras saturés, mais pauvre en cholestérol, induit l'expression d'enzymes impliqués dans la synthèse des lipides, notamment l'HMG-CoA réductase et l'acide gras synthase (FAS), ainsi que PGC-1 β , SREBP1a et SREBP1c dans le foie. PGC-1 β induit directement l'activité transcriptionnelle de SREBP1a, SREBP1c et de SREBP2 (voir Figure 8) en se liant à eux au niveau de l'élément de réponse aux stérols (SRE) présent sur le promoteur des gènes cibles des SREBPs. La surexpression de PGC-1 β et dans une plus faible mesure, PGC-1 α au niveau du foie, active le transport des lipides hors du foie et augmente ainsi les lipides sanguins, notamment le cholestérol. PGC-1 β coactive également les récepteurs des oxystérols (LXRs) et le récepteur x bêta des rétinoïdes (RXR β) (313). Les LXRs sont induits par une augmentation du cholestérol dans les cellules et induisent un programme transcriptionnel permettant l'absorption et

le transport du cholestérol hors de la cellule en plus de favoriser son oxydation sous forme d'acides biliaires dans le foie. Ils jouent un rôle dans la réponse inflammatoire et l'activation des macrophages, indiquant un lien entre le métabolisme des lipides et la réponse immunitaire (386, 387). PGC-1 β se lie directement aux LXRs et à RXR β grâce au motif LXXLL (voir section 1.8.2) présent au niveau de l'extrémité N-terminale de PGC-1 β . Ceci permet alors le recrutement de PGC-1 β au niveau d'éléments de réponse de LXR présents au niveau de gènes cibles (313). Ceci suggère que PGC-1 β pourrait également jouer un rôle dans certaines maladies métaboliques comportant une composante inflammatoire telle que le diabète et l'athérosclérose.

PGC-1 α et PGC-1 β sont fortement exprimés dans le muscle squelettique et sont induits lors d'activités physiques (voir Figure 8). L'activité physique engendre des forces de déchirement au niveau des parois des vaisseaux sanguins, ce qui induit la production d'oxyde nitrique (NO) (388, 389) afin d'induire une vasodilatation (390) au niveau du muscle et d'augmenter l'efficacité du transport de l'oxygène. Le NO est une espèce réactive de l'azote (RNS) qui peut réagir avec les ions superoxydes et activer AMPK (391). L'exercice induit également la production de ROS qui peuvent activer p38 MAPK (392) dans le muscle. La phosphorylation par p38 MAPK (393) et AMPK (366) activent PGC-1 α (voir Figure 8). D'un côté, l'induction de PGC-1 α active des défenses antioxydantes, mais d'un autre côté, PGC-1 α contribue également à la production de ROS lors de l'activité physique. En effet, PGC-1 α induit l'OXPPOS et la biogenèse mitochondriale. Ceci augmente la capacité respiratoire des cellules afin de favoriser la récupération et l'endurance, mais la suractivation de l'ETC provoque la fuite d'électrons et la production d'ions superoxydes (394, 395). La Figure 8 rassemble plusieurs facteurs intrinsèques propres aux cellules pouvant interagir avec des facteurs issus du MET afin de moduler l'activité et l'expression des PGC-1s.

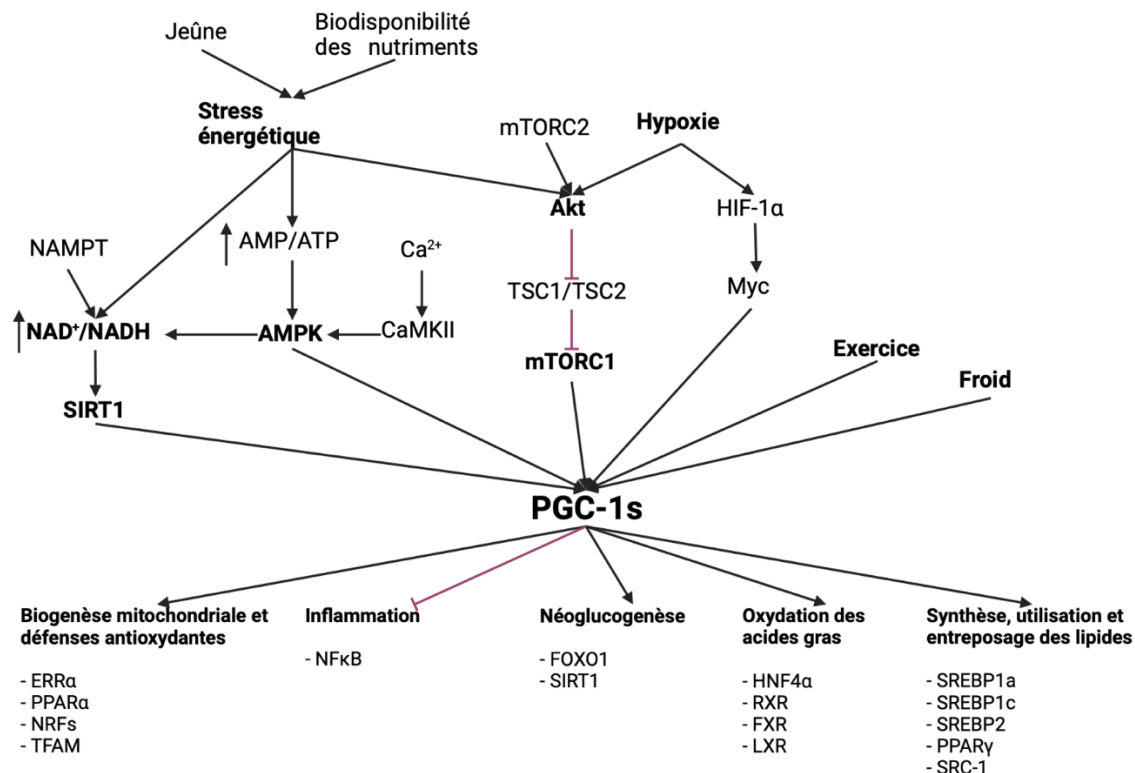


Figure 8 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques pouvant réguler l'expression et l'activité des PGC-1s. Les PGC-1s sont activés par différents facteurs de stress, par des processus transcriptionnels ainsi que par des modifications post-traductionnelles. Ils coactivent alors des facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale, la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial, les défenses antioxydantes, la gluconéogenèse, la lipogenèse, l'oxydation des acides gras et l'inflammation. Les PGC-1s contribuent ainsi fortement au remodelage métabolique des cellules cancéreuses, donc les impacts peuvent se faire sentir jusqu'au niveau du microenvironnement et moduler la réponse immunitaire de manière à favoriser la survie des cellules cancéreuses et la progression tumorale. **NAMPT** : Nicotinamide phosphoribosyltransférase, **NAD⁺** : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé, **NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase, **SIRT1** : Sirtuine 1, **AMP** : Adénosine monophosphate, **ATP** : Adénosine triphosphate, **Ca²⁺** : Ion calcium, **AMPK** : Protéine kinase dépendante de l'AMP, **CaMKII** : Kinase II dépendante de Ca²⁺/calmoduline, **mTORC1** : Cible fonctionnelle du complexe rapamycine 1, **HIF-1α** : Facteur 1-alpha induit par l'hypoxie, **ERRα** : Récepteur alpha lié aux œstrogènes, **PPARα** : Récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxyssomes, **PPARγ** : Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyssomes, **NRFs** : Facteurs de respiration nucléaire, **TFAM** : Facteur de transcription mitochondrial ADN grippant A, **NF-κB** : Facteur de transcription nucléaire κB, **STAT** : Transducteur de signal et activateur de la transcription, **FOXO1** : Facteur de transcription Forkhead de type O1, **HNF4α** : Facteur nucléaire hépatocytaire 4, **RXR** : Récepteur x bêta des rétinoïdes, **LXR** : Récepteur des oxystérols, **FXR** : Récepteur farnésoïde X, **SRC-1** : Coactivateur des récepteurs des stéroïdes. Figure créée à l'aide de Biorender : www.biorender.com

1.8.7. Rôle de PGC-1 α dans le cancer

Tant des niveaux élevés que bas de PGC-1 α sont associés à un mauvais pronostic dans le mélanome. *MITF* régule l'expression de PGC-1 α dans le mélanome et les cellules de mélanome exprimant fortement PGC-1 α présentent une augmentation du métabolisme mitochondrial et ont une meilleure capacité à détoxifier les ROS. Ceci leur permet de mieux résister au stress oxydatif et participe à la résistance à plusieurs formes de chimiothérapies dont les effets cytotoxiques reposent sur la formation de ROS dans le but de provoquer des dommages cellulaires et de perturber le métabolisme des cellules cancéreuses (330, 354). PGC-1 α promeut également la biogenèse mitochondriale et régule la masse mitochondriale. Les ROS sont ainsi engendrés par un déséquilibre ou une augmentation de l'activité mitochondriale et jouent un rôle à la fois pro et anti-tumoral (voir les sections 1.8.4.4 et 1.5.3) (330). La signalisation induite par les PGC-1s augmente la motilité et promeut la métastase, participant ainsi au développement et à la progression du mélanome. Cette voie de signalisation régule l'expression de gènes du métabolisme mitochondrial, de l'OXPPOS ainsi que du métabolisme des lipides, de la glutamine et du glucose (396).

Cependant, la mutation de *BRAF* inhibe *MITF* et diminue l'expression de PGC-1 α (354). La diminution de l'expression de PGC-1 α augmente l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH2) et, par conséquent, augmente la production de ROS. La production de ROS stabilise HIF-1 α par hydroxylation. Ainsi, les cellules qui expriment peu PGC-1 α adoptent donc un métabolisme plus glycolytique et sont moins dépendantes de la fonction mitochondriale. Les cellules qui expriment peu PGC-1 α ont cependant moins de défense antioxydante et sont plus sensibles aux composés induisant des ROS. En inhibant la fonction mitochondriale, HIF-1 α la diminution de l'expression de PGC-1 α limite la production de ROS et favorise la survie des cellules en condition de stress, particulièrement en situation d'hypoxie (353).

1.8.8. Composés modulant l'expression des PGC-1s

Certains composés naturels aux vertus antioxydantes et plusieurs molécules thérapeutiques affectant le métabolisme peuvent moduler l'expression et l'activité des PGC-1s. De tels composés

représentent une manière simple et rapide de moduler l'expression des PGC-1s afin de caractériser leur rôle dans un contexte particulier.

La Metformine est un médicament de la classe des biguanides utilisé dans le traitement du diabète de type II. Il empêche la production de glucose par le foie en inhibant deux enzymes de la néoglucogenèse, soient la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et G6Pase. PGC-1 α induit la néoglucogenèse et augmente l'expression de PEPCK et G6Pase. La metformine, via AMPK, phosphoryle le coactivateur de CREB, désigné TORC2, qui est alors séquestré hors du noyau et augmente l'expression de PGC-1 α . TORC2 module également l'expression de PEPCK et de G6Pase, en plus d'inhiber l'expression de gènes de la néoglucogenèse. LKB1 phosphoryle et active AMPK, et une diminution de l'expression de LKB1 diminue l'expression de PGC-1 α au niveau protéique. De plus, comme mentionné à la section 1.8.5.1, la phosphorylation par AMPK engendre un mécanisme de rétroaction positive permettant à PGC-1 α d'induire l'activation de son propre promoteur et ainsi de participer à sa propre régulation. AMPK peut également augmenter l'expression de SHP, ce qui inhibe à long terme l'expression de PEPCK et de G6Pase (397, 398).

La Nifedipine, un bloqueur des canaux calciques, est le médicament de sa classe le plus utilisé dans l'hypertension. L'entrée de calcium dans la cellule active une protéine kinase dépendante du calcium/calmoduline, ce qui mène à la phosphorylation de p38 MAPK ainsi qu'à l'activation du facteur 2 de stimulation des myocytes (MEF2) et du facteur de transcription activant 2 (ATF2). Ces facteurs de transcription peuvent également être activés par des stimuli physiologiques comme l'exercice, qui provoque une entrée de calcium dans la cellule, ou par des cytokines. Les facteurs de transcription se lient au promoteur de PGC-1 α pour induire son expression. PGC-1 α active à son tour NRF-1 impliqué dans la biogenèse mitochondriale. Vu le rôle des cytokines dans l'activation de p38 MAPK, ceci crée un lien entre les cytokines et la respiration dictée par le profil énergétique de la cellule. Fait intéressant, la Nifedipine ne semble pas moduler l'expression des autres PGC-1s (399, 400).

Le Resveratrol, un composé de la classe des polyphénols, active AMPK, ce qui augmente le ratio NAD⁺/NADH et, par conséquent, active SIRT1 (voir section 1.8.5.3). SIRT1 désacétyle PGC-1 α , ce qui l'active, et augmente l'expression d'enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras.

SIRT1 acétyle également p53, qui peut à son tour induire l'expression de PGC-1 α , ce qui lui confère un rôle dans le métabolisme, l'apoptose et les défenses antioxydante (401). L'augmentation de la masse mitochondriale qui s'en suit protège contre l'obésité et la résistance à l'insuline en plus d'augmenter la consommation maximale d'oxygène (VO₂max). Il fut montré que supprimer l'activité de AMPK empêche l'augmentation de l'expression de protéines mitochondriales induite par Resveratrol, ce qui n'est pas observé lors de l'inhibition de SIRT1 (402, 403).

Le enPGC-1 est un nouveau composé qui induit l'expression de PGC-1 α et de PGC-1 β . C'est un modulateur épigénétique qui agit en modula la liaison d'enzymes régulatrices de la modification des histones aux groupements acétylés des lysines de la queue des histones. Plus précisément, le enPGC-1 permet le recrutement de la machinerie acétyltransférase des histones (p300) au niveau de séquences spécifiques présentes sur le promoteur de PGC-1 α et de PGC-1 β afin d'induire leur transcription. Le enPGC-1 induit également la biogenèse et la respiration mitochondriale, de même que l'expression de cibles des PGC-1s impliquées dans l'OXPPOS et l'oxydation des acides gras dans les lymphocytes T. Ceci promeut la survie et la prolifération des lymphocytes T (404), ce qui fait de enPGC-1 un bon adjuvant à l'immunothérapie (voir section 1.3.7.3).

Une petite molécule, le ZLN005, induit la phosphorylation d'AMPK. AMPK active le promoteur de PGC-1 α dans le muscle, ce qui induit l'expression du transcrit de PGC-1 α . ZLN005 augmente la consommation de glucose via le transporteur de glucose GLUT4, de même que certaines cibles de PGC-1 α impliquées dans le métabolisme mitochondrial comme ERR α , NF1 et l'acyl-coenzyme A oxydase. Le rôle de ZLN005 dans le métabolisme du glucose en fait de ce composé un bon candidat pour le traitement du diabète (405).

Finalement, le benzafibrate est un médicament utilisé pour le traitement des dyslipidémies. Il induit l'expression de PPAR γ qui interagit avec PGC-1 α afin d'induire certaines cibles impliquées dans, par exemple *TFAM*, le cytochrome C et l'ATP synthase, dont l'expression est également induite dans le cerveau et le tissu adipeux brun par le benzafibrate. Le stress oxydatif, la dysfonction mitochondriale, de même qu'une diminution de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme, sont impliqués dans la pathophysiologie de certaines neuropathies, par exemple la maladie de Huntington. Le benzafibrate induit la biogenèse mitochondriale et freine la dégradation des

mitochondries dans le cerveau de souris (406), ce qui suggère que le bezafibrate pourrait contribuer à améliorer les symptômes de patients atteints de maladies neurodégénératives.

1.9. Hypothèse et objectifs de recherche

Les cellules cancéreuses évoluent souvent dans un environnement hostile, pauvre en nutriments et en oxygène, et se protègent en développant une réponse adaptative impliquée dans la métastase et la résistance au traitement. Les coactivateurs 1 du récepteur γ activé par le proliférateur du peroxisome (PPAR γ), ou PGC-1s, sont une famille de coactivateurs transcriptionnels qui régulent la biogenèse et la fonction mitochondriale. Le rôle de PGC-1 α dans la gestion du stress oxydatif et la détoxification des ROS est bien connu, mais ses effets sur la prolifération et la métastase sont variés et ambigus. Ceci suggère que d'autres cibles régulant le métabolisme mitochondrial du mélanome restent à découvrir. Plusieurs études ont déjà montré l'effet anti-inflammatoire de PGC-1 β dans le muscle, mais son rôle dans la prolifération, l'inflammation et la réponse immunitaire du mélanome demeurent inexplorés. Les cellules cancéreuses adaptent leur métabolisme en fonction de la disponibilité en nutriments et en oxygène dans leur environnement afin de produire suffisamment d'énergie pour assurer leur prolifération soutenue et engendrer un environnement immunosuppresseur propice à l'invasion, la métastase et la résistance aux traitements. Le rôle immunomodulateur des PGC-1s est également soutenu par son interaction avec PPAR γ impliqué dans la tumorigenèse. Étant les maîtres régulateurs du métabolisme énergétique et de la biogenèse mitochondriale, les PGC-1s contrôlent la réponse à l'hypoxie ou à certaines carences en nutriments et pourraient ainsi faciliter l'adaptation métabolique des cellules de mélanome en situation de stress.

Le premier volet de ce projet se concentre sur un PGC-1 moins bien connu et très peu caractérisé, soit PGC-1 β . Ce volet porte plus précisément sur le rôle PGC-1 β dans l'immunomodulation et l'inflammation du mélanome pouvant avoir un impact sur la progression tumorale. Nous énonçons donc l'hypothèse suivante :

1. La déplétion de PGC-1 β pourrait réguler la fonction mitochondriale de manière à s'évader du système immunitaire, ce qui s'accompagnerait d'une réponse inflammatoire et impacterait la prolifération des cellules de mélanome. Tout d'abord, nous éclaircirons le rôle des PGC-1s dans le mélanome et la résistance à l'immunothérapie en réalisant des analyses bio-informatiques sur des bases de données de RNAseq regroupant différentes lignées cellulaires de mélanome et des tumeurs exprimant différents niveaux de PGC-1s. Ensuite, nous tenterons de répondre à notre hypothèse en atteignant les objectifs suivants :

1.1 : Étudier par RT-qPCR l'impact d'une déplétion en PGC-1 β sur l'expression de gènes codant pour des cytokines inflammatoires et molécules de co-signalisation inhibitrices

1.2 : Caractériser la réponse inflammatoire et la relâche de cytokine par *cytokine array*

1.3 : Caractériser l'effet d'une déplétion en PGC-1 β sur la prolifération d'une lignée cellulaire par l'étude du cycle cellulaire en cytométrie en flux

1.4 : Caractériser l'effet d'une déplétion en PGC-1 β sur la fonction mitochondriale en étudiant la respiration cellulaire et l'expression de gènes encodant pour des protéines mitochondriales ou des facteurs de transcription régulant la biogenèse, la transcription et le maintien de l'ADNm

1.5 : Élucider, à l'aide d'une banque de composés, les voies de signalisation régulées par une déplétion en PGC-1 β responsables de son rôle dans l'immunomodulation et l'inflammation du mélanome

Puisque les PGC-1s peuvent être régulés par l'hypoxie, une carence en nutriments et le statut énergétique des cellules, nous pensons qu'ils peuvent agir comme un senseur de stress cellulaire pouvant être régulé en contexte physiologique de manière à conférer un avantage de survie aux cellules cancéreuses en situation de stress. Le second volet de ce projet porte donc sur la régulation des PGC-1s par différents stress cellulaires et son rôle dans la survie des cellules cancéreuses en situation de stress. Notre hypothèse est la suivante :

2. Dans le mélanome, différents stress cellulaires, particulièrement le stress du RE, sont susceptibles de diminuer le métabolisme mitochondrial selon un mécanisme impliquant les PGC-1s afin de diminuer le stress oxydatif et d'engendrer un remodelage métabolique participant à l'immunosuppression du mélanome. Dans ce contexte, la régulation des PGC-1s pourrait affecter plusieurs processus clés de la tumorigenèse tels que la prolifération des cellules cancéreuses et l'inflammation. Nous tenterons également de répondre à cette hypothèse au travers des objectifs ci-dessous :

2.1 : Établir une corrélation entre l'expression du transcrit des PGC-1s et celle des marqueurs de stress cellulaire à partir de données de RNA-seq et de transcriptomique provenant de catalogues répertoriant le profil mutationnel de plus de 440 tumeurs cutanées (TCGA, Pan Cancer Atlas)

2.2 : Élaborer une approche de criblage regroupant plusieurs composés induisant différents stress cellulaires afin d'étudier leur impact sur l'expression du transcrit des PGC-1s et de cytokines inflammatoires dans des lignées cellulaires de mélanome par RT-qPCR

2.3 : Déterminer le rôle du stress du RE dans la reprogrammation métabolique du mélanome en étudiant la respiration cellulaire et l'expression de transcrit codant pour des protéines mitochondriales ainsi que des facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale et la transcription de l'ADNm

2.4 : Élucider le mécanisme de régulation des PGC-1s et leur rôle dans la réponse au stress du mélanome en inhibant l'expression d'une protéine de liaison à l'ARN susceptible de réguler la stabilité et la traduction des PGC-1s. Nous étudierons le rôle des protéines de liaison à l'ARN dans la régulation de PGC-1 β en générant des lignées cellulaires de mélanome stables surexprimant LARP1.

2.5 : Étudier le rôle de la régulation de PGC-1s dans la survie des cellules cancéreuses grâce à un essai de viabilité impliquant un indicateur coloré pouvant être détecté en fluorescence.

Chapitre II : Articles scientifiques

Chapitre II : Articles scientifiques

2.1. Préambule

Les résultats générés pendant les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont permis de générer les deux articles présentés dans cette section. Le premier article a été soumis au journal *Cancer Letters* et a été évalué par des pairs. Nous avons reçu leurs commentaires et nous effectuons les révisions. Le second article est en préparation, mais en collaboration avec mon directeur de recherche, nous avons jugé qu'il contenait suffisamment de matériel pour un mémoire de maîtrise.

Dans le premier article, je figure en tant que co-première autrice avec Karl Laurin dû à notre contribution égale et majeure dans la génération des résultats obtenus et l'analyse critique des résultats ainsi que notre participation à la rédaction de ce manuscrit.

J'ai effectué des transfections avec des petits ARN interférents dirigés contre PGC-1 β dans des cellules de mélanome MeWo et SK-MEL-5 puis fait les extractions d'ARN et les qPCR nécessaires à la caractérisation de la réponse inflammatoire et immunosuppressive observée lors de la déplétion de PGC-1 β (Fig 3A). J'ai également fait le décompte de cellules « contrôle » et déplétées en PGC-1 β afin de caractériser l'effet de cette déplétion sur la prolifération (Fig 4A). J'ai ensuite participé à l'optimisation de l'approche de cytométrie en flux utilisée pour étudier l'impact de la déplétion de PGC-1 β sur le cycle cellulaire puis réalisé les transfections et préparé les échantillons nécessaires à l'obtention des résultats présentés (Fig 4C-D). J'ai finalement étudié, par qPCR, l'impact de la déplétion de PGC-1 β sur l'expression de transcrits codant pour des protéines mitochondriales (Fig 5A).

Étienne Audet-Walsh a fourni une expertise très précieuse dans l'obtention de données de transcriptomique de souris traitées avec des anti-PD-L1.

Nour Méribout a contribué de façon significative en effectuant des répétitions de plusieurs expériences importantes présentées dans ce manuscrit.

Concernant le second article, j'ai réalisé un criblage incluant plusieurs composés induisant différents stress cellulaires puis examiné, par qPCR, leur impact sur l'expression du transcrite des PGC-1s. Puisque ce stress a semblé moduler l'expression du transcrite des PGC-1s, j'ai traité des cellules de mélanome MeWo avec différents inducteurs du stress du RE et caractérisé leurs effets respectifs grâce à des essais de viabilité (Fig 2D-E). J'ai extrait l'ARN de cellules soumises au stress du RE, puis caractérisé par qPCR l'effet dépendant de la dose sur l'expression du transcrite des PGC-1s (Fig 2F-G). J'ai ensuite étudié la stabilité du transcrite des PGC-1s en situation de stress du RE en réalisant un essai de poursuite à l'actinomycine D (Fig 3D-E). Ces résultats m'ont amenée à examiner, par qPCR, l'expression de transcrits codant pour des protéines de liaison à l'ARN en situation de stress du RE (Fig 3F). J'ai observé une diminution importante de l'expression de *LARPI*, ce que j'ai confirmé en immunobuvardage (Fig 3G) pour lequel j'ai également réalisé les extractions et préparé les échantillons. Je me suis ensuite intéressée, par qPCR à l'expression de *LARPI* (Fig 3H) chez des cellules traitées avec les mêmes inducteurs de stress utilisés précédemment (voir Fig 1c) afin d'explorer le rôle de *LARPI* dans la régulation des PGC-1s. J'ai transfecté différentes lignées cellulaires de mélanome humain (Fig 5G) et murin (Fig 5H-J) avec de petits ARN interférents dirigés contre *LARPI* et j'ai montré, par qPCR, que *LARPI* module l'expression du transcrite des PGC-1s et de transcrits immunosuppresseurs. J'ai finalement généré un modèle stable de cellules de mélanome MeWo surexprimant *LARPI*. Ce modèle m'a permis de me pencher sur l'impact de la surexpression de *LARPI* sur l'expression du transcrite des PGC-1s (Fig 6A-C) et sur la survie de cellules de mélanome traité avec différents inducteurs de stress (Fig 6D-E), respectivement par qPCR et grâce à un essai colorimétrique.

Pour les deux articles présentés ici, Simon-Pierre Gravel a effectué des analyses bio-informatiques, dirigé l'étude, effectué plusieurs expériences et des analyses statistiques en plus d'avoir largement contribué à la rédaction des manuscrits.

2.2. Article #1: PGC-1 β and mitochondrial biogenesis control MEK and IRF1-dependent pro-inflammatory and immunosuppressive gene expression

Title

PGC-1 β and mitochondrial biogenesis control a MEK and IRF1-dependent pro-inflammatory and immunosuppressive gene expression program in melanoma

Running title:

Mitochondrial biogenesis controls an immunometabolic switch in melanoma

Authors:

Karl M Laurin^{1*}, Katherine Coutu-Beaudry^{1*}, Nour Méribout¹, Étienne Audet-Walsh², Simon-Pierre Gravel^{1,†}

* These authors contributed equally.

Affiliations

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

² Centre de recherche du CHU de Québec, Université Laval, Québec, Canada

† Corresponding author

Correspondence to Simon-Pierre Gravel, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128, succ Centre-Ville, Montréal, Quebec, H3C 3J7. E-mail: sp.gravel@umontreal.ca. Phone: 1-514-343-6525

Competing interests

None

Research Highlights

Mitochondrial biogenesis factors modulate immunosuppression in human melanoma

PGC-1 β controls the immune response of human melanoma cell lines

PGC-1 β depletion leads to cell cycle arrest and reduces mitochondrial respiration

MEK1/2 and IRF1 mediate the immune effects associated with PGC-1 β depletion

Targeting mitochondrial biogenesis may improve the response to immunotherapy

2.2.1. 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 the control of the peroxisome-proliferator activated receptor gamma (PGC-1) transcriptional coactivators. Recent research unveiled the role of PGC-1 α in bolstering mitochondrial oxidative functions and in the suppression of metastasis in melanoma, but the role of PGC-1s in tumor immunology remains elusive. 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 reduces the expression of HSPA9, impairs mitochondrial activity, and leads to cell cycle arrest. Through the use of pharmacological and gene silencing approaches, we further show that MEK1/2 and IRF1 mediate the observed immune transcriptional response. Overall, this research suggests that mitochondrial biogenesis factors can modulate tumor progression, immune evasion, and response to therapeutics through transcriptional control of immune pathways.

Keywords

Melanoma, Mitochondria, Transcription, Immunosuppression, Inflammation

2.2.2. 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 (92, 407, 408). 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 (151, 409-412). 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% (413). Also, precise predictive biomarkers allowing the discrimination between immune checkpoint therapy responders and non-responders are missing (414, 415). 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 (416). 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 (417, 418). Melanoma cells can compete for glucose or amino acids that are essential to bolster T cell functions (417-419), and tumor glycolytic activity was shown to suppress T cell activities (288, 420). 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 (421, 422). 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 (182, 188, 423, 424). 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 PGC-1s are master transcriptional regulators of mitochondrial biogenesis, oxidative phosphorylation, and oxidative stress detoxification (324, 425). 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 (426), 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. We here show that the expression levels of the 3 PGC-1s in human melanoma tumors correlate negatively with a signature of pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts. This signature is increased in low PGC-1s-expressing tumors while mitochondrial protein-encoding transcripts are reduced, which suggests that this immune 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.

2.2.3. Materials and methods

Cell lines and treatments

The human melanoma cell lines MeWo, SK-MEL-5, and A375 were kindly provided by Ian Watson. SK-MEL-28 were kindly provided by Sonia Del Rincon. 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 µg/mL). All cell lines were cultivated in a humidified 37°C 5% CO₂ incubator. Inhibitors and compounds 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).

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, and 87,500 cells/mL media/well for SK-MEL-5 and MeWo (2mL media per well). Cells were incubated for 16-24h before transfection with siRNA. Allstar negative control siRNA (non-targeting, DS NC1) and siRNA against human PGC-1β (FlexiTube Gene Solution 133522, 4 siRNA duplexes) or HSPA9/GRP75 (FlexiTube Gene Solution GS3313, 4 siRNA duplexes) were purchased from Qiagen (Hilden, DEU). Dicer substrate (DsiRNA) non-targeting control and directed against human PGC-1β (TriFECTa, hs.Ri.PPARGC1B.13, 3 DsiRNA 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 the manufacturer's protocol. Media were changed 24h post-transfection and replaced with full media.

Cell counting

For cell counting at the indicated time points, cells grown in 6-well plates were rinsed with PBS 1X, dissociated with trypsin/EDTA, and resuspended in 1 mL of 10% FBS-containing media. 20 µL 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.

Gene expression analysis

RNA was isolated using Aurum Total RNA extraction Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. RNA concentrations were 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 the manufacturer's protocol. Oligonucleotide primers were designed using PrimerBlast software (NCBI, Bethesda, MD, USA). qRT-PCR was performed with the SSo SYBR green mastermix (Bio-Rad Bio-Rad 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). cDNAs 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-step 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 Quantstudio Design and analysis software (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). Gene fold change was determined using the $\Delta\Delta C_t$ calculation method 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 were synthesized by IDT (Coralville, IA, USA) and can be found in **Supplemental Table 1**.

Gene reporter assays

50,000 MeWo cells were seeded per well in 24-well plates. Cells were transfected 16-24 h later with siRNAs using Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and following the manufacturer's protocol, as indicated in the RNA interference section. 48 h later, cells were transfected with reporter plasmids using Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific)

using the manufacturer's protocol. 450 ng of firefly luciferase-encoding plasmids and 50 ng of renilla luciferase-encoding plasmids were co-transfected per well. All constructs were generously provided by Marc Servant. 24 h later, 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 1×10^6 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 parameters 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.

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) on ice for 30 min. Lysates were centrifuged at 17,000 x g for 10 min at 4°C and 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 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at constant 15V, 0.2A for 50 min. Blots were blocked in blotto (5% non-fat dry milk diluted in tris buffer saline with 0.1% Tween-20 (TBST)) and then incubated with primary antibodies overnight at 4°C with slow rocking. Anti-Galectin-9 (54330), anti-STAT1 (14994), anti-p65/RELA (8242), anti-Grp75/HSPA9 (3593), anti-IRF1 (8478), anti-IRF3 (11904), anti-phospho-p42/p44 (ERK1/2) (4370), anti-p100/p52 (4882), and anti- β -actin (3700) were from Cell Signaling Technologies Inc. (Whitby, ON, CA). PVDF membranes were washed 3 times for 20 min with TBST before incubation with horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies (1:10,000 dilution) (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). Densitometric analyses were done with ImageJ (NIH).

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 and gently mixed every 5 min. 15 μ L of NP40 10% (v/v) was added after the incubation period, followed by 10 sec vortex at high speed. Samples were spun down at 17,000 x g for 30 seconds at 4°C and supernatant was collected for each sample. Pellets were rinsed with 200 μ L of buffer A, spun down, and clean 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-X100) supplemented with protease and phosphatase inhibitors as above. Samples 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 for 10 min at 4°C.

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. Cytokines 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 a 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 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.

Oxygen consumption and extracellular acidification

Oxygen consumption rates (OCR) and extracellular acidification rates (ECAR) of MeWo cells were determined with a XFe96 Seahorse extracellular analyzer (Agilent, Santa Clara, CA). The day prior to siRNA transfection, 2,500 or 5,000 MeWo cells were seeded in XFe96 cell plates. Media was replaced with sodium bicarbonate free medium 72h post-transfection. Seahorse injection setup and measurements were based on the Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit but with the use of in-house prepared inhibitors (in DMSO). Inhibitors used were oligomycin (1µM) (04876, Sigma-Millipore), FCCP (0.5µM) and Antimycine A (1µM) (15218, 19433, Cayman Chemicals), and Rotenone (1µM) (143145 Abcam). Cells were washed and lysed with RIPA buffer for determination of protein content (as described in Western blotting section). For the calculation of mitochondrial respiration, non-mitochondrial OCR (after rotenone and antimycine A co-injection) was removed from basal OCR.

Analyses of publicly available RNA-seq and transcriptomic datasets

Human RNA expression datasets used in this study were obtained from the cBioPortal for Cancer Genomics web site, an open-access and open-source resource (427, 428). 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) (429) and contained 48 melanoma cell lines (from 1739 samples). Coefficient of variation (CV) were calculated as standard deviation divided by average and multiplied by 100. 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 mitochondrial biogenesis factor-expressing tumor groups, all tumor samples in datasets were ranked for individual factor expression, and tumors were further sorted according to the summed rank for PGC-1s and other factors, as indicated in figure legends. 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). Similar process was used to generate high and low expressing melanoma cell lines. The list of 1158 mitochondrial proteins was obtained from the Human MitoCarta 2.0 study (430). Venn diagrams were generated with the VIB/Ugent tool available at <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>, and group areas were adjusted proportionally to their relative size. 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 (431), 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. For the mitochondrial-immune switch (MIS) score associated with mitochondrial biogenesis and 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 score suggest downregulation of mitochondrial protein and upregulation of immune genes. Strong positive values for MIS score suggest down regulation of immune genes and upregulation of mitochondrial genes. For the study

of tumor transcriptomics in mice treated with anti-PD-L1, we used the GSE172320 dataset available on Gene Expression Omnibus (GEO) (432). Affy IDs were converted to gene symbols with db2db from bioDBnet (433). Responders and non-responders refer to responsiveness to 10mg/kg anti-mouse PD-L1 mlgG1 D265A in PBS. Spearman's correlations were calculated with GraphPad Prism (San Diego, CA, USA).

Over-representation of transcription factor binding sites

Over-representation of transcription factor binding sites at the promoter of selected immunosuppressive and pro-inflammatory genes was analyzed with PScan (434). Region was -950 to +50 and descriptor was Jaspar 2020_NR. Significant transcription factors were selected with threshold p-value 0.05.

Statistical analyses

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

2.2.4. Results

PGC-1s transcript expression positively correlates with distinct and overlapping sets of mitochondrial protein transcripts in human melanoma

To determine how PGC-1s expression influence gene expression profiles in melanoma, we analyzed the Skin Cutaneous Melanoma (SKCM) RNA-seq dataset from The Cancer Genome Atlas (435). We found that the expression level of PGC-1 α transcript is highly variable in this dataset, as expected for this inducible and labile coactivator, and that of the other PGC-1s was also markedly variable (Coefficient of variation (CV)_{PPARGC1A}: 148.5, CV_{PPARGC1B}: 100.2, CV_{PPRC1}: 39.9) (**Fig. 9A**). We determined the significant Spearman's correlations between PGC-1s transcripts and those encoding for human proteins localized in mitochondria (MitoCarta2.0) (430), and determined overlapping and distinct gene sets between PGC-1s. Among the 1158 mitochondrial proteins, 587 show a positive correlation with PGC-1s, and only a small proportion (36/587, 6.1%) of these mitochondrial protein transcripts are shared between the 3 PGC-1s, suggesting non-overlapping functions of PGC-1s in melanoma (**Fig. 9B**). PGC-1s negatively correlated with as many mitochondrial proteins (**Supplemental Fig. 1A**), which suggests compensatory mechanisms. To further characterize the transcripts that differentially correlate with PGC-1s, we generated a dataset comprising the shared genes from the SKCM dataset that differentially correlate with the 3 PGC-1s and performed gene functional classification. These analyses reveal that PGC-1s positively correlate with processes linked to mitochondrial translation, respiration, and transcription, and also negatively correlate with processes linked to immune response, including TNF signaling, pathogen recognition, chemokines, and matrix metalloproteinases (**Supplemental Fig. 1B**). 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.

To substantiate the relationship between PGC-1s and immune transcripts in human melanoma tumors, we selected 14 transcripts encoding for proteins involved in the control of mitochondrial biogenesis and examined their correlation with 28 mitochondrial and immune transcripts. These analyses confirm that mitochondrial biogenesis modulators negatively correlate with the selected immune transcripts but positively correlate with important mitochondrial transcripts (**Fig. 9C**). To quantify this dichotomy between correlating immune and mitochondrial transcripts, we calculated a mitochondrial-immune switch (MIS) score for each transcription factors (**Fig. 9C**, right graph). The MIS score reflects the sign and magnitude of correlations between transcription factors and mitochondrial or immune transcripts. To determine if the expression level of these mitochondrial biogenesis modulators can influence the expression level of immune transcripts, we separated tumor into groups according to their expression level of mitochondrial master regulators. We found that low PGC-1s/ERR α /TFB2M expression is associated with increased expression of pro-inflammatory and immunosuppressive genes (**Fig. 9D**), which complements the correlation analyses. This immune signature is further increased in tumors that globally show low levels of mitochondrial biogenesis transcripts (**Fig. 9E**, **Supplemental Fig. 1C**). Interestingly, low expression of the PGC-1 β transcript was associated with increased expression of all the tested immune transcripts. We further show with gene functional classification analyses that PGC-1 β negatively correlates with chemokines, TNF signaling, matrix metalloproteinases, and antigen processing and presentation (**Supplemental Fig. 1D**). To further determine if PGC-1s could influence the response to immunotherapy, we analyzed a murine melanoma transcriptomic dataset (GSE172320) (432) and show that tumors that do not respond to anti-PD-L1 therapy have reduced expression of PGC-1 β and PRC transcripts (**Fig. 9F**). The negative correlation between PGC-1 β and PRC with immune genes was strongest in the non-responder group (**Fig. 9G**, **Supplemental Fig. 1E**). Overall, these analyses suggest that reduced expression of PGC-1s in melanoma could impair the response to immunotherapy, possibly through the induction of a multigenic immunosuppressive transcription program.

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

We next asked whether the level of PGC-1s expression level was also associated with a signature of immune transcripts in human melanoma cell lines. The expression profile of PGC-1s in the 48 melanoma cell lines of the Cancer Cell Line Encyclopedia (429) was similar to the one observed in tumors of the SKCM dataset (**Fig. 10A**) ($CV_{PPARGC1A}$: 143.9, $CV_{PPARGC1B}$: 52.6, CV_{PPRC1} : 31.0). Our analyses reveal that mitochondrial biogenesis transcripts negatively correlate with immune transcripts, with strong positive MIS score for PGC-1s, $ERR\alpha$ and TFAM transcripts (**Fig. 10B**). In addition, the immune signature is enhanced in melanoma cells that express low levels of these mitochondrial biogenesis modulators (**Fig. 10C-D**). We then set out to determine whether acute changes in the expression of PGC-1s could affect the expression of immune genes, which is required to show a cause and effect relationship. We selected PGC-1 β for gene silencing given its strong association with the immune signature both in vivo (**Fig. 9D**) and in vitro (**Fig. 10C**). PGC-1 β KD is efficient and accompanied with a concomitant induction of both pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts (**Fig. 11A**). MeWo cells, which were previously characterized as high PGC-1 α -expressing cells ((330) and **Fig. 10D**), are globally the most responsive cells, which suggests that cells with high mitochondrial activity respond more strongly to PGC-1 β depletion. We further show that PGC-1 β KD increases the expression of immune transcripts in a dose-dependent fashion (**Fig. 11B**), and validated the specificity of the approach with distinct dicer-substrate siRNAs (**Supplemental Fig. 2**). We also show that PGC-1 β KD leads to a strong release in MCP-10, IL-10 and IL-8 (**Fig. 11DC-D**) and promotes the expression of the immunosuppressive cell surface protein Galectin-9 (**Fig. 11E**). Overall, these analyses show that PGC-1 β KD can induce a complex gene expression program that can be efficiently translated to modulate the immune phenotype of human melanoma cell lines.

PGC-1 β knockdown blocks proliferation and alters mitochondrial functions in human melanoma cell lines.

The fact that PGC-1 β correlates positively and negatively with mitochondrial and immune transcripts, respectively, suggests that the immune effects associated with its depletion could be caused by mitochondrial defects or metabolic stress. Indeed, PGC-1 β KD reduces the proliferation of all tested melanoma cell lines (**Fig. 12A**). We subsequently set up our tests with MeWo cells given they ranked first out of 48 melanoma cells for the expression of PGC-1s (**Fig. 10D**) and also given their strong reactivity to PGC-1 β KD (**Fig. 11A-B**). Notably, the impact of PGC-1 β KD on the cell proliferation is still visible after 8 days (**Fig. 12B**). The proliferative defects observed in PGC-1 β -depleted cells are linked to cell cycle arrest, as shown by a reduction in cells in G0/G1 states with an accumulation of cells in G2/M compared to control cells (**Fig. 12C-D**). To identify mitochondrial proteins that could be downregulated upon PGC-1 β KD and responsible for cell cycle arrest, we interrogated the SKCM dataset and selected the 10 mitochondrial protein transcripts that positively correlate the most with PGC-1 β transcripts. Of these transcripts, HSPA9 and AFG3L2 are significantly downregulated in PGC-1 β -depleted cells compared to controls (**Fig. 13A**), and PGC-1 β KD also reduced HSPA9 protein level (**Fig. 13B**). We next performed HSPA9 KD to determine if the expression of this mitochondrial protein could impact on the metabolism and immune response of melanoma cells. HSPA9 gene silencing is efficient (**Fig. 13C**) and reduces proliferation (**Fig. 13D**). Both PGC-1 β and HSPA9 KD reduce basal mitochondrial respiration, maximal respiration, and basal extracellular acidification (**Fig. 13E-G**). From the selection of immune genes, HSPA9 KD only induces PD-L2 significantly (**Fig. 13H**), which suggests that other mechanisms could explain the wide impact of PGC-1 β KD on immune gene expression.

A targeted compound screen 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 have selected 15 compounds that inhibit kinases and signaling components that could potentially drive these effects. Our analyses show that MEK1/2 inhibition with 2 distinct inhibitors represses the induction of both IL-8 and

Galectin-9 transcripts (**Fig. 14A-B**). Compounds targeting IKK β and the MAP kinases JNK1/2/3 and p38 α reduced IL-8 expression, but had no effect on Galectin-9. We confirmed the gene-specific effects of MEK1/2 and IKK β inhibition on other immune genes such as *NT5E* and *IL1B* (**Fig. 14C-D**). Conversely, inhibition of mTOR, AKT, Pi3K and TBK1 increased the induction of IL-8 but not Galectin-9 (**Fig. 14A-B**), suggesting induction of the IKK β pathway by these inhibitors. Overall, these analyses show that MEK1/2 and IKK β are important components that differentially drive the expression of immune genes in PGC-1 β -depleted melanoma cells.

Identification of transcription factors that mediate the immune response programs in PGC-1 β -depleted melanoma cells.

Our analysis of over-represented transcription factor binding sites (TFBS) at the promoter of selected genes from the immune signature associated with low mitochondrial biogenesis reveals significant enrichment of the STAT1/2 heterodimer (**Fig. 15A**). 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 and CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs). We next interrogated the SKCM dataset to identify correlations between 28 immune transcription factors and a set of 28 transcripts encoding for immune and mitochondrial proteins. Strikingly, our analyses reveal that a large proportion of these immune transcription factors, most notably STAT1/4 and IRF1/2/8, correlate in an opposite manner to mitochondrial biogenesis factors with a strong negative MIS score (**Fig. 15B**). PGC-1 β KD generally increased the expression of immune transcription factors, among which IRF1 and NFKB2 were the most markedly upregulated ones (**Fig. 15C**). The activity of NF- κ B and IRFs was also found to be induced upon PGC-1 β or HSPA9 gene silencing (**Fig. 15D**). Among the several transcription factors tested, only IRF1 showed increased expression in the nuclear compartment after PGC-1 β KD (**Fig. 15E-F**). Finally, IRF1 knockdown significantly reduced the induction of IL-8 and Galectin-9 transcripts in PGC-1 β -depleted cells (**Fig. 15G**), which suggests that this transcription factor supports the immune effects associated with reduced PGC-1 β expression.

2.2.5. Discussion

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 (436-442). 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 (436). While cancer cell-intrinsic mechanisms such as activation of proto-oncogenes and loss of tumor suppressors can also activate these transcription factors and likely modulate immunosuppressive programs (443), the role of metabolic reprogramming in bolstering these processes remains unknown. Recent evidence suggests that mitochondria are important modulators of the response to immunotherapy. First, immunotherapy responders show increased mitochondrial activity in tumors, which increases melanoma immunogenicity and increases sensitivity to T cell-mediated killing (444). 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 (445, 446). Importantly, STING agonists have recently emerged as modulators of the response to immunotherapy through their capacity to engage IFN signaling and to promote the expression of PD-L1 (447). Very recently, it has been shown that mtDNA damage exposes mtRNAs to the cytosolic sensors Rig-I/MAVS, which leads to STAT-1 phosphorylation and IFN response (448). A variety of mechanisms could also link mitochondrial dysfunction to the activation of innate immune signaling pathways, such as the production of reactive oxygen species (ROS) (449, 450), the alteration of cellular bioenergetics (363, 451, 452), and the production of immunomodulatory metabolites (453-455). Overall, this suggests that mitochondrial dysfunction could modulate the transcription of immunosuppressive programs to bolster immune evasion in melanoma.

While a recent study suggested that a selection of factors involved in mitochondrial biogenesis could be targeted to overcome the resistance to MAPK inhibitors (456), the role of these factors in tumor immunology and response to immune checkpoint inhibitors remains elusive. Several studies in non-cancer models have shown that enforced expression of PGC-1s can potently inhibit NF- κ B and IRF-1/3, while their depletion conversely promotes the activation of these transcription factors (232, 356, 365, 457-460). The observed induction of inflammation in tumors with low

mitochondrial biogenesis might modulate tumor progression through recruitment of immune cells, tumor microenvironment remodelling, and angiogenesis. The concomitant induction of immunosuppressive molecules, on the other hand, will likely help tumor cells to evade T cells. Our analyses of an *in vivo* transcriptome dataset of anti-PD-L1-treated mice revealed that non-responsive tumors have lower PGC-1 β and PRC expression level, which suggests that these mitochondrial biogenesis factors could indeed influence the response to immunotherapy.

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 . In line with the role of PGC-1s in bolstering mitochondrial biogenesis, we found that acute PGC-1 β KD reduces the expression of *HSPA9*. It has been shown that the depletion of HSPA9 induces p21^{CIP}, growth arrest and cell death in a MEK/ERK-dependent fashion in melanoma cell lines (461). As PGC-1 β KD also induces cell cycle arrest in MeWo cells, it is likely that the growth suppressive effects of PGC-1 β are partly driven by HSPA9 depletion. While HSPA9 KD had similar effects to that of PGC-1 β on cell proliferation, mitochondrial respiration, glycolysis, and induction of IRF/STAT/NF- κ B-driven reporter plasmids, the impact on immune gene expression was modest, which suggests that the reduction in HSPA9 is not the sole mechanism by which PGC-1 β modulates the immune response. We have found that MEK1/2 are upstream of the regulation of both pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts, and that the role of IKK β seems more limited to pro-inflammatory gene expression. As BRAF and MEK inhibitors have shown beneficial effects in combination with immunotherapy in melanoma (462, 463), it will be of interest to determine how these treatments impact on the expression of pro-inflammatory and immunosuppressive markers *in vivo*. Our data also indicates that IRF-1 is an important modulator of immune genes expression in melanoma tumors with low mitochondrial biogenesis. Interestingly, a recent article showed that SOX10 modulate PD-L1 expression by increasing the expression of IRF4, a repressor of IRF1 (464). IRF4 was indeed among the very few transcription factors that had a completely opposite correlation signature to that of IRF1 in melanoma tumors (**Fig. 15B**), which suggests that this factor can potentially influence the immune response under low mitochondrial biogenesis in melanoma.

In conclusion, this research unveils largely overlooked roles for the PGC-1 coactivators and other mitochondrial biogenesis factors in the control of inflammation and immunosuppression in

melanoma. Our analyses suggest that metabolic and immune transcriptomic profiles can indicate underlying mechanisms that link metabolic dysfunction to immune programs that can impact on tumor progression and response to immunotherapy (**Fig. 16, model**). Our work reveals that melanoma cells could reduce mitochondrial biogenesis as a strategy to mount a multigenic resistance program, and suggest that therapeutic strategies aiming to rescue mitochondrial biogenesis could increase the efficiency of immunotherapy.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, [S.P.G.], upon reasonable request.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Credit authorship contribution statement

Karl Laurin: Validation, Investigation, Writing – Original Draft, Visualization **Katherine Coutu-Beaudry:** Validation, Investigation, Writing – Original Draft, Visualization **Nour Méribout:** Validation, Investigation **Étienne Audet-Walsh:** Formal analysis **Simon-Pierre Gravel:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – Original Draft, Writing – Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Acknowledgements

This work was supported by from the Cancer Research Society [Grant 840633, 2021]; and start-up funds from the Faculty of Pharmacy of Université de Montréal. We are grateful to Caroline Thivierge for critical reading and comments on the manuscript.

2.2.6. Figure legends

Figure 9. Low expression of mitochondrial biogenesis factors in human melanoma tumors is associated with increased expression of pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts.

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. Each dot represents a sample. Mean and +/- SEM are indicated.

B. 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 dataset.

C. (left) Heatmap of Spearman's correlations between mitochondrial biogenesis factors and selected immune and mitochondrial transcripts in human melanoma tumors described in A. Mitochondrial biogenesis factors have been ordered as a function of their respective Mito-Immune Switch Score shown on the right (see Material and methods). High score corresponds to factors that correlate positively with mitochondrial genes and negatively with immune genes.

D. Heatmap of immune gene expression in tumors with high (upper quartile, n =110) or low levels (lower quartile, n=110) of selected mitochondrial biogenesis factors from C (boxed). Transcript expression is set to 1 (white) in high-level tumors and shown as fold change (red: increase; blue: decrease) in low-level tumors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student's *t*-test.

E. Heatmap of immune gene expression in tumors with overall low expression PGC-1s expression of overall low expression of the 5 factors in D. Data presented as in D.

F. Expression of PGC-1s in melanoma tumors arising from mice treated with anti-mouse PD-L1 antibody (GEO accession: GSE172320). Data from PD-L1 antibody responders (n=26) and non-responders (n=23) are shown as box and whiskers, with ** $p < 0.01$, Student's *t*-test.

G. Spearman's correlation between PGC-1s transcripts and a selection of 18 immune and mitochondrial transcripts in non-responding tumors, as described in F. * $p < 0.05$.

Figure 10. Low expression of mitochondrial biogenesis factors in human melanoma cell lines is associated with increased expression of pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts.

A. 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). **B.** (left) Heatmap of Spearman's correlations between mitochondrial biogenesis factors and selected immune and mitochondrial transcripts in the 48 human melanoma cell lines described in A. Mitochondrial biogenesis factor have been ordered as a function of their respective Mito-Immune Switch Score shown on the right (see Material and methods). High score corresponds to factors that positively correlate with mitochondrial genes and negatively correlate with immune genes. **C.** Heatmap of immune gene expression in cell lines with high (upper quartile, n =12) or low levels (lower quartile, n=12) of selected mitochondrial biogenesis factors from B (boxed). Transcript expression is set to 1 (white) in high-level tumors and shown as fold change (red: increase; blue: decrease) in low-level tumors. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.0001, Student's *t*-test. **D.** Heat-map of ranked expression of PGC-1s transcripts in human melanoma cell lines of the CCLE dataset. PGC-1 (global) is the sum of the individual rank of the 3 PGC-1s divided by 3. Only upper (red) and lower (white) PGC-1s expression quartiles are shown. *NT5E* (CD73) and *CXCL8* (IL-8) are immune transcripts, while *PTCD1* and *TIMM8A* are mitochondrial protein transcript. * indicates cells that are used in subsequent in vitro experiments (except for A375 that do not fall within the shown quartiles).

Figure 11. 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 shown as Log₂ fold change versus non-targeting control siRNA-Ctrl. Cells were analyzed 72h post-transfection. Data are shown as mean + SEM. Group comparison is done between control siRNA-Ctrl and pooled PGC-1 β siRNAs. * p < 0.05, Student's *t*-test (N=3). **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 are expressed as mean + SEM of fold change (Log₂) versus the respective non-

targeting control siRNA treatment for each concentration. Group comparison is done between control non-targeting siRNA and pooled PGC-1 β siRNAs. * $p < 0.05$, Student's t -test (N=3). **C.** 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 D. **D.** Quantification of cytokine release as measured with cytokine arrays (as in C). Relative cytokine release is normalized for cell counts. Data are shown as mean + SEM, * $p < 0.05$, Student's t -test (N=3). **E.** Immunoblotting for Galectin-9 in MeWo cells treated as in A. β -actin serves as loading control.

Figure 12. PGC-1 β knockdown has growth suppressive effects in human melanoma cell lines.

A. Fold change in cell counts of melanoma cells treated for 3 days with control non-targeting siRNA-Ctrl or siRNA pool against PGC-1 β . Data are shown as mean + SEM. * $p < 0.05$, # $p < 0.10$, Student's t -test (N=3). **B.** Proliferation of MeWo cells treated as in A over an 8-day time course. Transfection was done on day 0. Data are shown as mean + SEM. Group comparison is done between control non-targeting siRNA and pooled PGC-1 β siRNAs for individual days. * $p < 0.05$, Student's t -test (N=3). **C.** Representative cell cycle tracing from FACs analyses of MeWo cells treated as in A. Colored areas and gating are automatically generated by the FlowJo software. PE-A: Propidium iodide area. **D.** Cell cycle organization of MeWo cells analyzed as in C. Data are shown as mean + SEM for individual cell cycle phases (G0/G1, S, and G2M). SubG1 represents fragmented cells. * $p < 0.05$, # $p < 0.10$, Student's t -test (N=3).

Figure 13. The mitochondrial protein HSPA9 mediates part of the immunometabolic effects associated with PGC-1 β depletion in human melanoma cells.

A. Gene expression in MeWo cells treated with control or PGC-1 β siRNA for 3 days* $p < 0.05$, Student's t -test. **B.** Immunoblotting of HSPA9 in MeWo cells treated with control non-targeting siRNA-Ctrl or PGC-1 β siRNA pool. **C.** Immunoblotting of HSPA9 in MeWo cells treated with control non-targeting siRNA-Ctrl or HSPA9 siRNA pool. B-C: β -actin serves as loading control. Data shown are representative of 3 independent experiments. **D.** Fold change in cell counts of MeWo cells treated for 3 days as in C. Data are shown as mean + SEM. * $p < 0.05$, Student's t -

test (N=3). **E.** Oxygen consumption rate (OCR) profiles in MeWo cells treated as in A-D. OCR has been normalized for protein content. */# $p < 0.05$, Student's *t*-test, for siRNA-PGC-1 β and siRNA-HSPA9, respectively (N=3). **F.** Mitochondrial respiration under basal conditions in MeWo cells treated as in F. * $p < 0.05$ Student's *t*-test (N=9). **G.** Extracellular acidification rate (ECAR) under basal conditions in MeWo cells treated control and PGC-1 β or HSPA9 siRNA for 72h. ECAR has been corrected for protein content. * $p < 0.05$ Student's *t*-test (N=9). **H.** Heat-map of gene expression in MeWo cells treated as in D. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Student's *t*-test (N=3).

Figure 14. Identification of kinases 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 siRNA-Ctrl and PGC-1 β siRNApool 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. Data are 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 with non-targeting control siRNA-Ctrl and PGC-1 β siRNApool and further treated with a small panel of pharmacological inhibitors. Cells were treated and analyses performed as in A. **C.** Gene expression in MeWo cells treated as in A with an IKK β inhibitor (BI605906 1 μ M, 0.1% DMSO v/v). Data are shown as mean of Log2 fold change + SEM. * $p < 0.05$, Student's *t*-test (N=3). **D.** Gene expression in MeWo cells treated as in B but with a MEK inhibitor (Trametinib, 10 μ M, 0.1% DMSO v/v).

Figure 15. Identification of transcription factors that mediate the immune response associated with PGC-1 β depletion in melanoma cells.

A. Venn diagram of significantly over-represented transcription factor binding sites (TFBS) in a selection of immunosuppressive and pro-inflammatory genes regulated by PGC-1 β in melanoma cells. Selected overlapping and non-overlapping transcription factors are indicated. **B.** (right) Heatmap of Spearman's correlations between immune transcription factors and selected immune

and mitochondrial transcripts in 443 human melanoma tumors (SKCM RNA-seq dataset from TCGA, PanCancer Atlas). Transcription factors have been ordered as a function of their respective Mito-Immune Switch (MIS) Score shown on the left (see Material and methods). High score corresponds to factors that positively correlate with mitochondrial genes and negatively correlate with immune genes. **C.** Gene expression of immune transcription factors in MeWo cells treated with control non-targeting siRNA-Ctrl or siRNA PGC-1 β pool for 3 days. Data are shown as fold change (log2) + SEM (N=3). * $p < 0.05$, # $p < 0.10$, Student's *t*-test. N/A: the corresponding transcript was undetectable in this cell line. **D.** Reporter assays in WeWo cells co-transfected with reporter gene luciferase plasmids (RLU1), control renilla plasmids (RLU2), and non-targeting control siRNA-Ctrl, PGC-1 β , or HSPA9 siRNA pool. Cells were analyzed 72h post-transfection. Promoter activation (NF-(κ B) elements, *CXCL10* physiological promoter, interferon-stimulated response element (ISRE), gamma interferon response element (GAS)) is normalized to renilla signal (RLU1/RLU2). Data are shown as mean + SEM. * $p < 0.05$, Student's *t*-test (N=3). **E.** Immunoblot of nuclear and cytosolic extracts from MeWo cells treated for 3 days as in E. **F.** Quantification of IRF1 by densitometry in cells treated as in E. Data are shown as mean + SEM. # $p < 0.10$. Student's *t*-test. **G.** Gene expression in MeWo cells co-transfected with control non-targeting or PGC-1 β siRNA with control of dicer-substrate siRNA (Dsi) against IRF1. Cells were analyzed 3 days post treatment. Data are shown a mean of Log2 fold change + SEM. * $p < 0.05$, Student's *t*-test.

Figure 16. Model of the immunometabolic switch in melanoma.

(left panel) Schematic depicting the multifaceted impact of low mitochondrial biogenesis enhanced by low expression of PGC-1s coactivators on cell cycle arrest, activation of innate immune signaling pathways, and induction of pro-inflammatory and immunosuppressive gene expression programs. (right panel) Schematic of the immunometabolic switch controlled by mitochondrial biogenesis modulators such as PGC-1s coactivators in melanoma.

Supplemental figures legends

Supplemental Figure 1

A. Venn diagram of negative correlations between PGC-1s transcripts analyzed by RNA-seq from the TCGA PanCancer Atlas human cutaneous melanoma dataset (q-value threshold 0.05) and the 1158 mitochondrial proteins from the MitoCarta2.0 dataset. **B.** Shared positive (left panel) and negative (right panel) significant Spearman's correlations ($q < 0.05$) between the 3 PGC-1s (PGC- α , PGC-1 β , PRC) in the same melanoma dataset as in A. Enrichment scores from DAVID bioinformatics web tool are associated with functional classes. **C.** Immune gene expression in human melanoma tumors (as in A) with high (upper quartile, $n = 110$) or low levels (lower quartile, $n = 110$) of the 3 PGC-1s (determined by the sum of the 3 respective ranks). Data are shown for individual samples with mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, Student's *t*-test. **D.** Gene functional analysis of transcripts that inversely correlate with *PPARGC1B* in human melanoma tumors (as described in A). Only the top 20 enriched groups are shown. A representative GO term was chosen for each group, and groups directly linked to immune processes were underlined. **E.** Spearman's correlation between PGC-1s transcripts and a selection of 18 immune and mitochondrial transcripts in murine melanoma tumors that responded to anti-PD-L1 therapy.

Supplemental Figure 2

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 are shown as mean \pm SEM. Group comparison is done between control non-targeting siRNA and pooled PGC-1 β siRNAs. * $p < 0.05$, Student's *t*-test ($N = 3$).

Figure 9

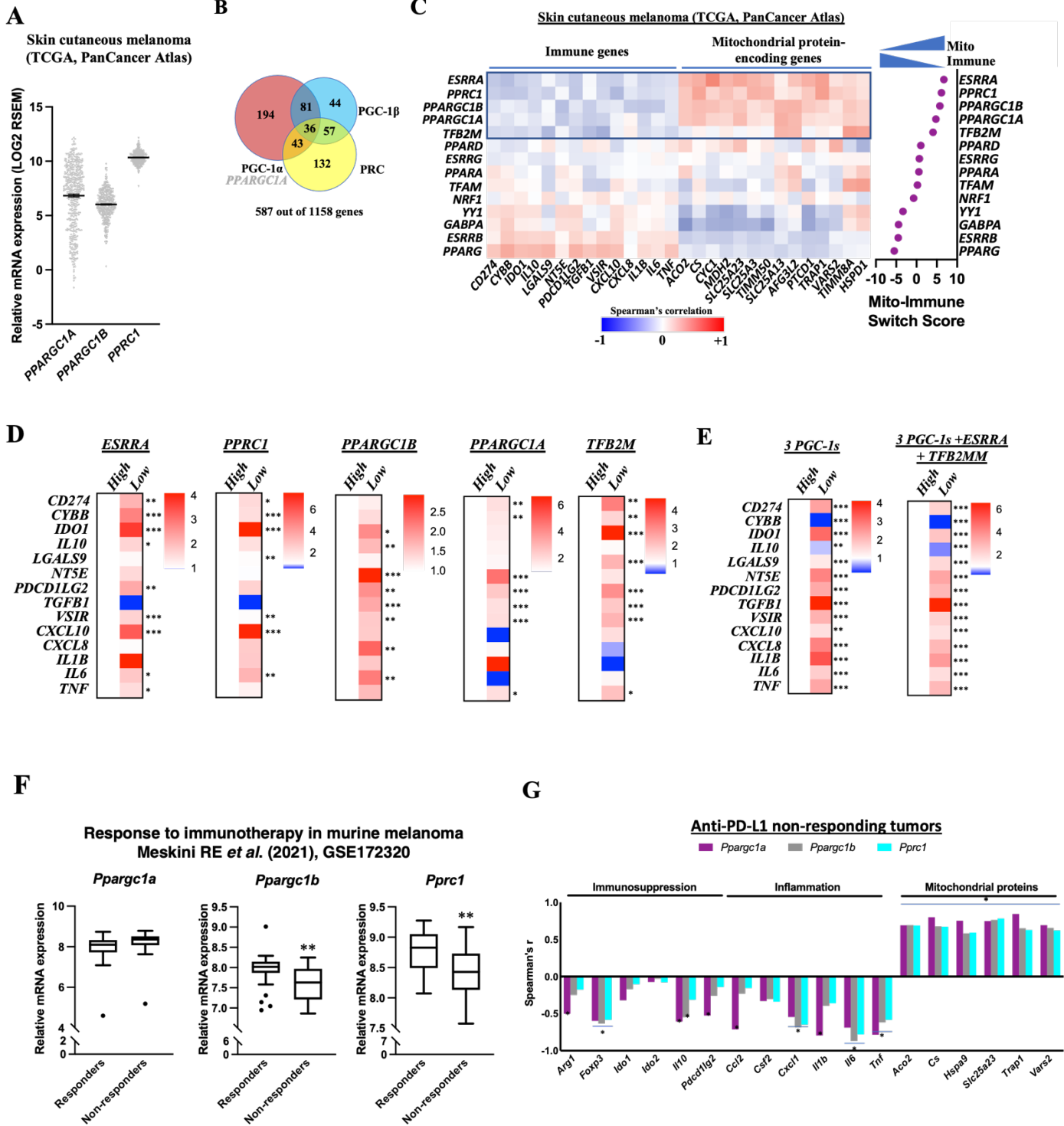


Figure 10

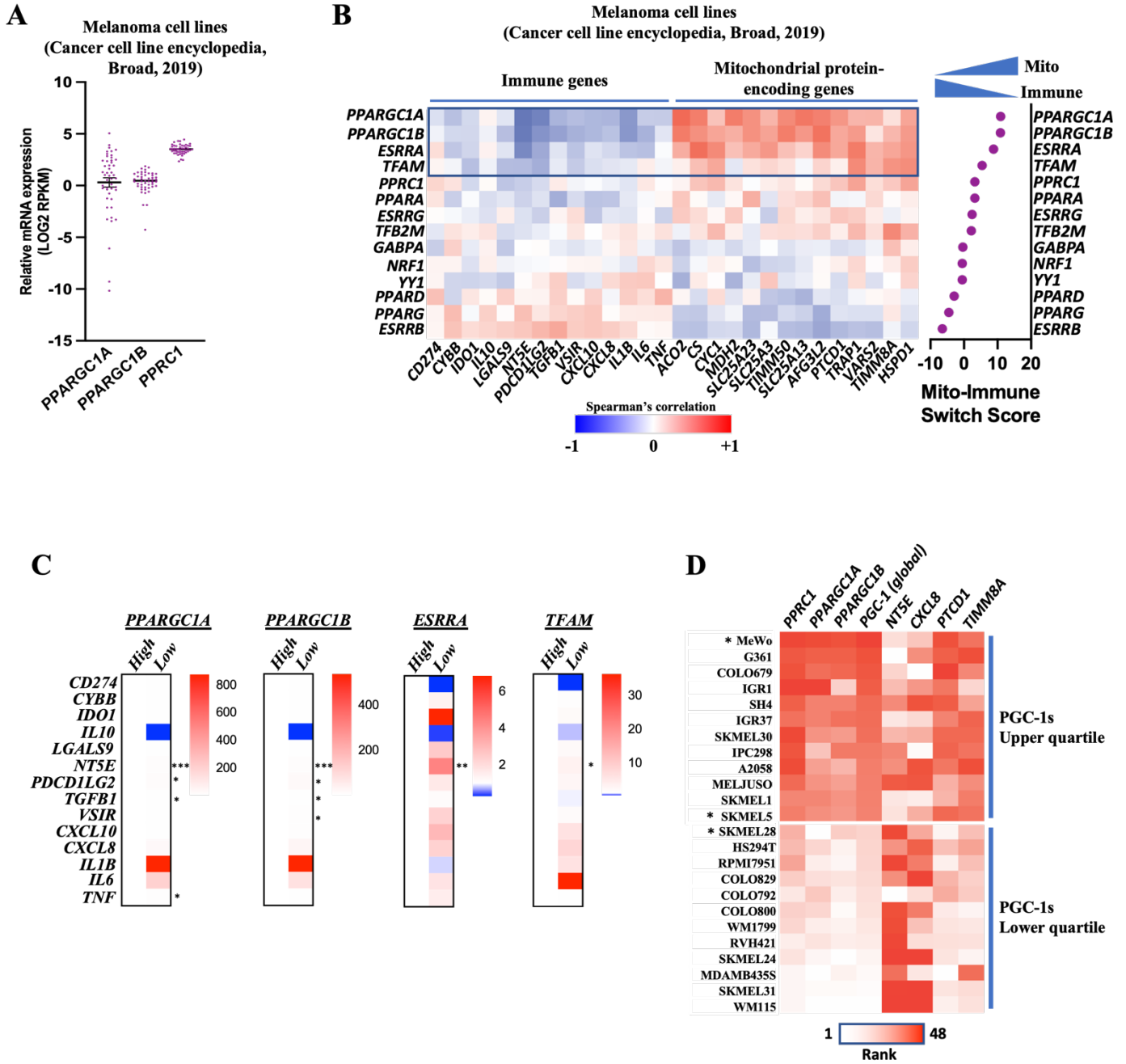


Figure 11

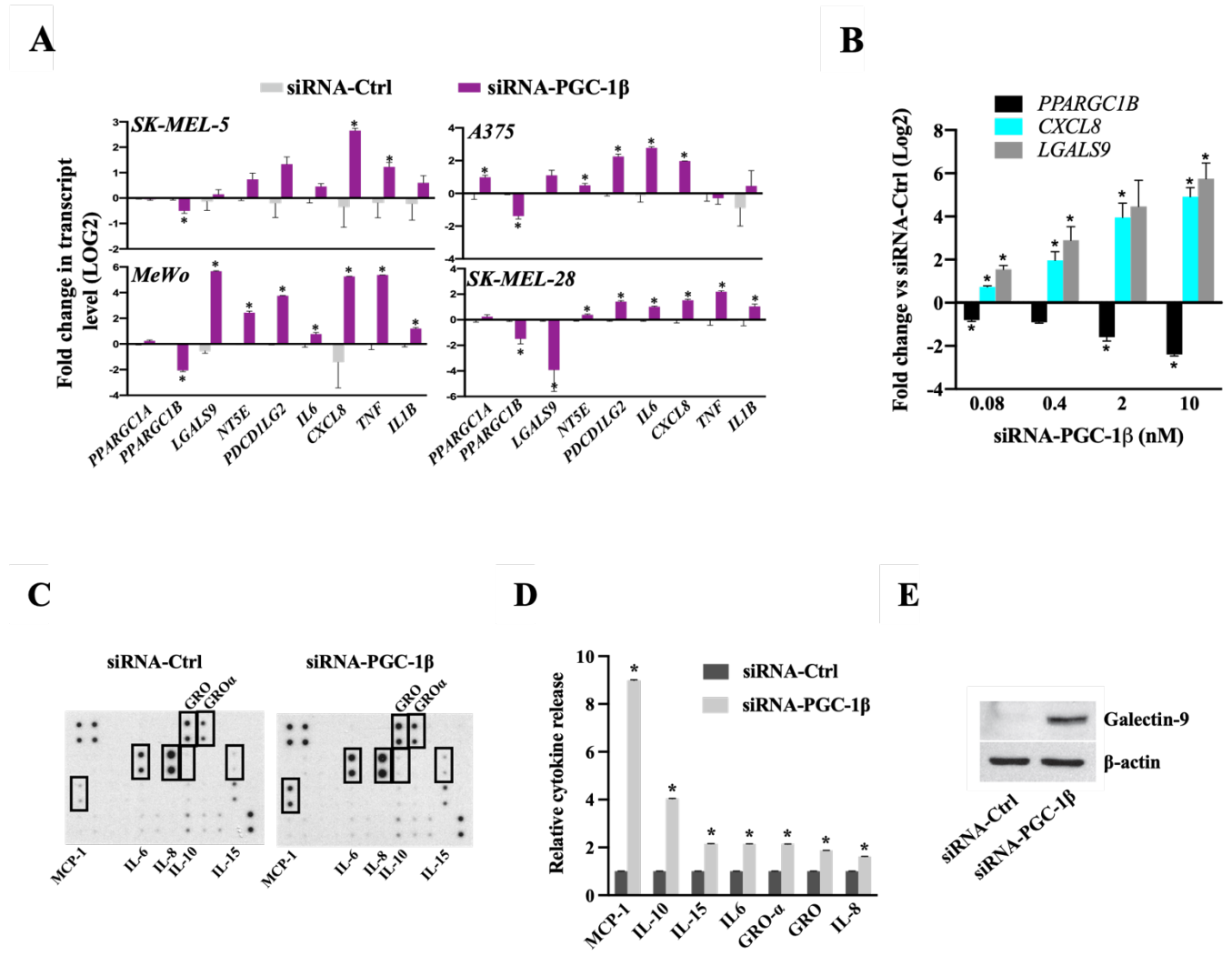


Figure 12

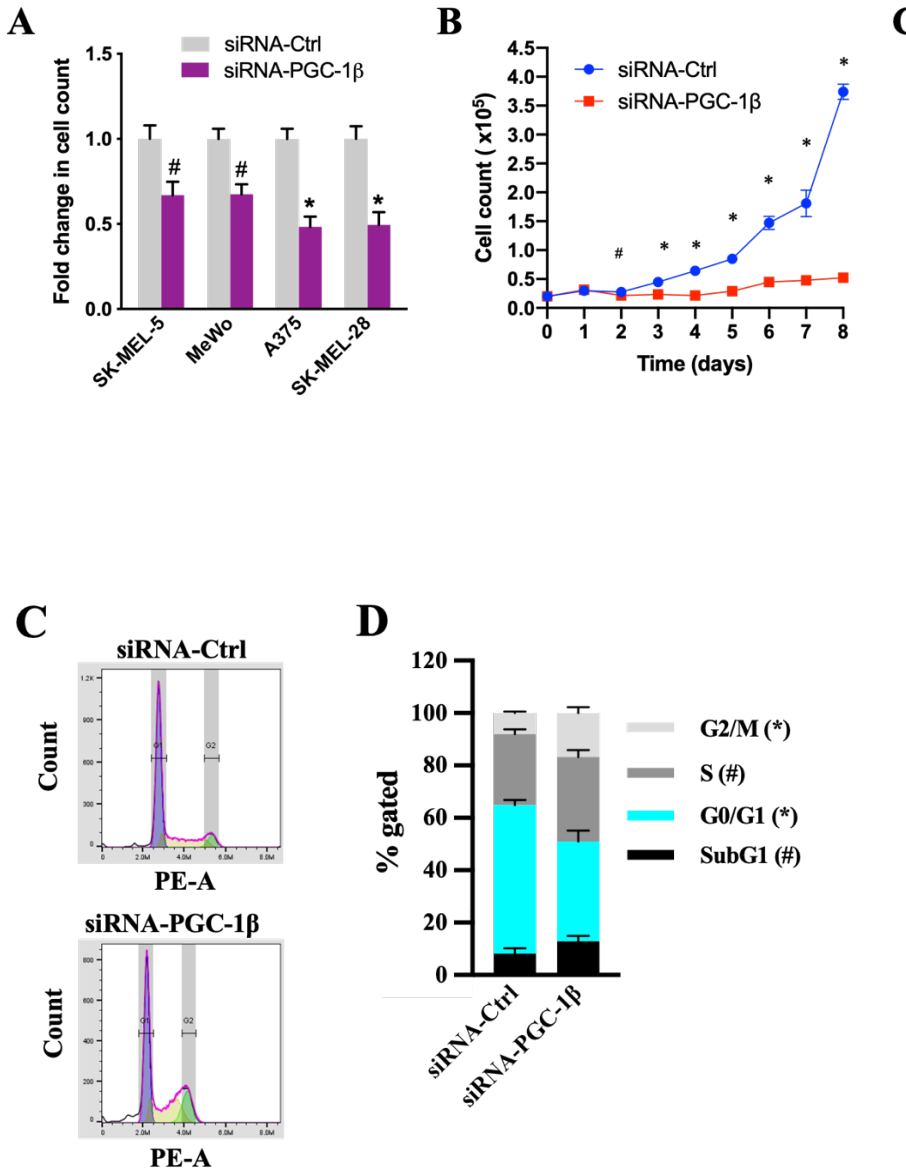


Figure 13

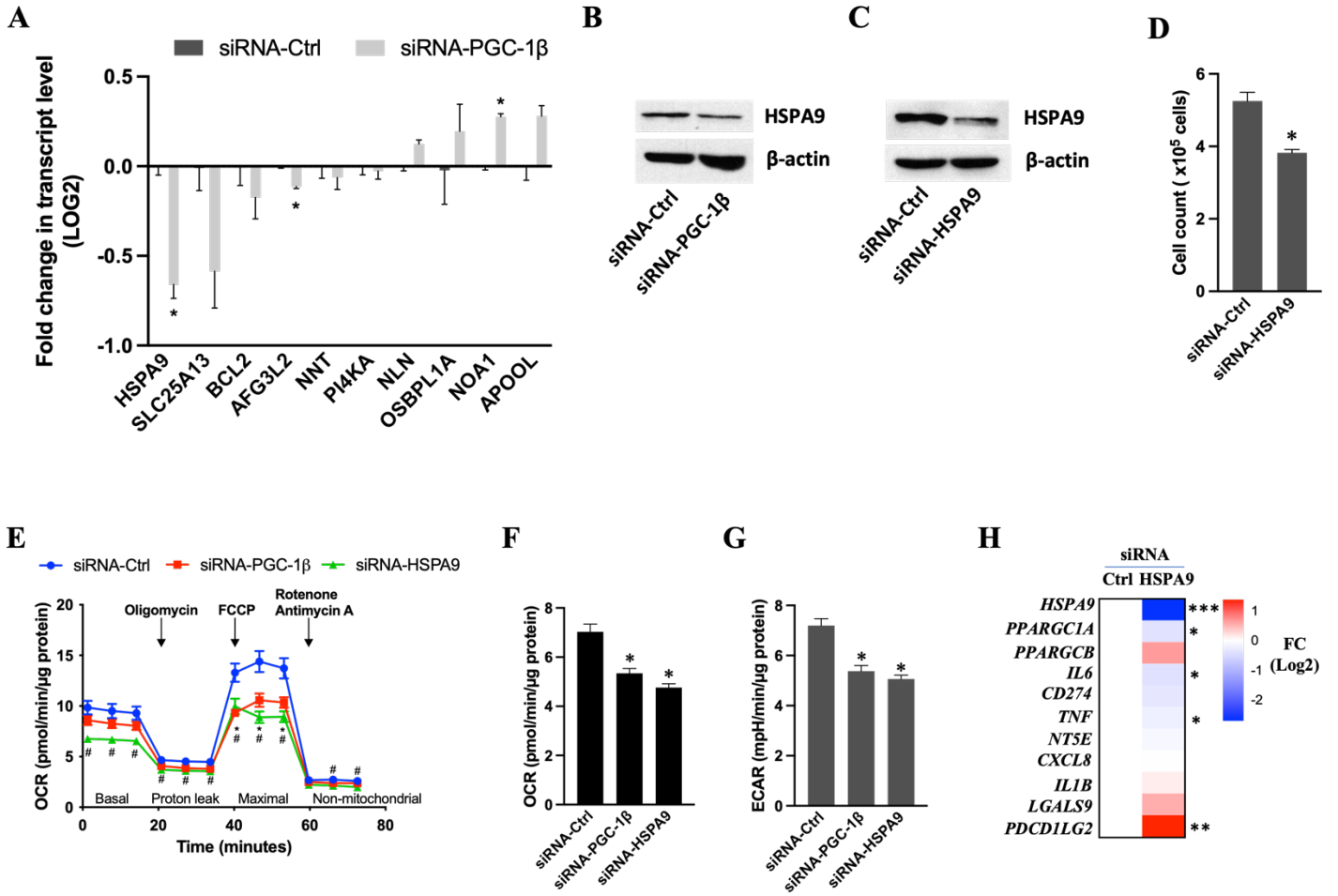


Figure 14

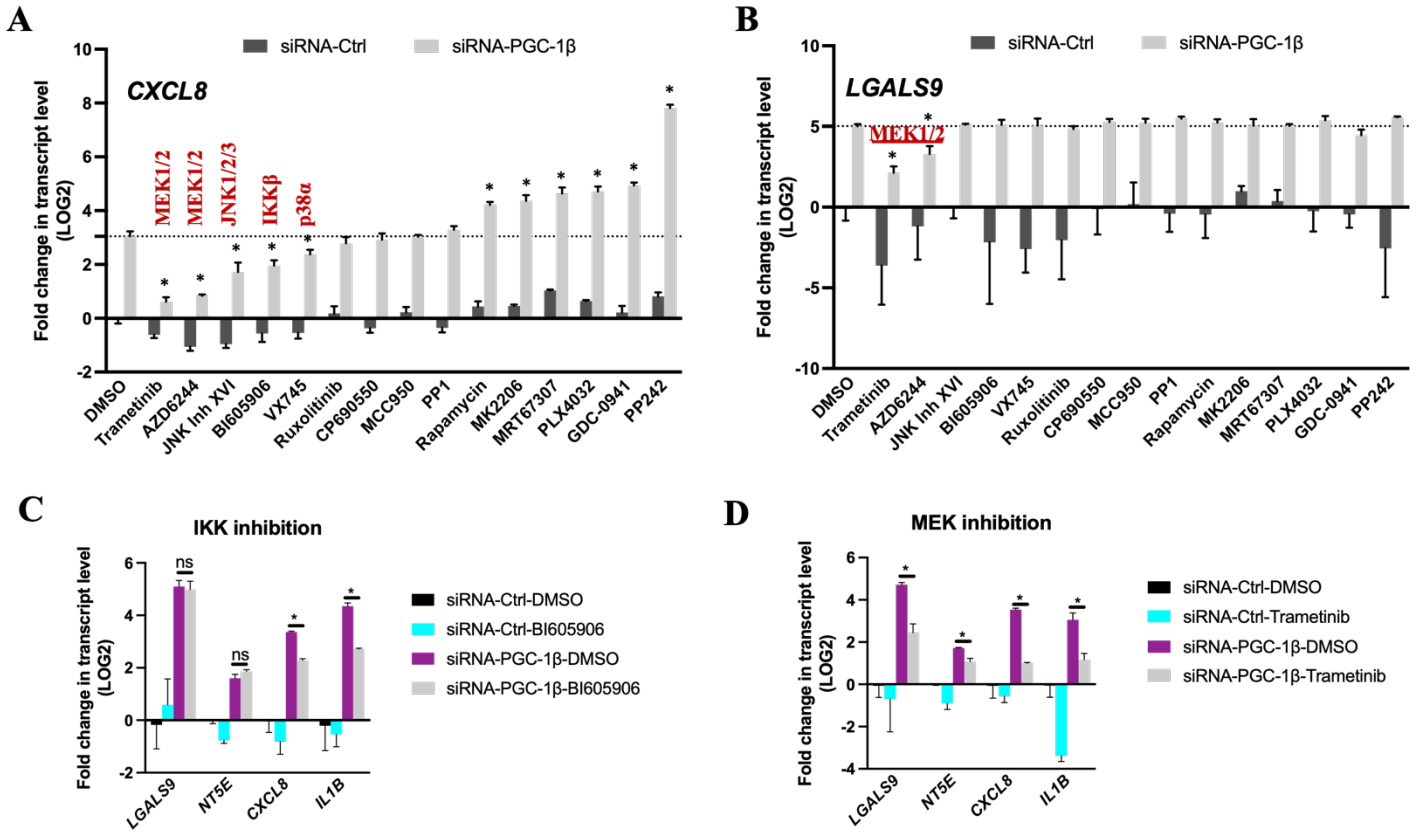


Figure 15

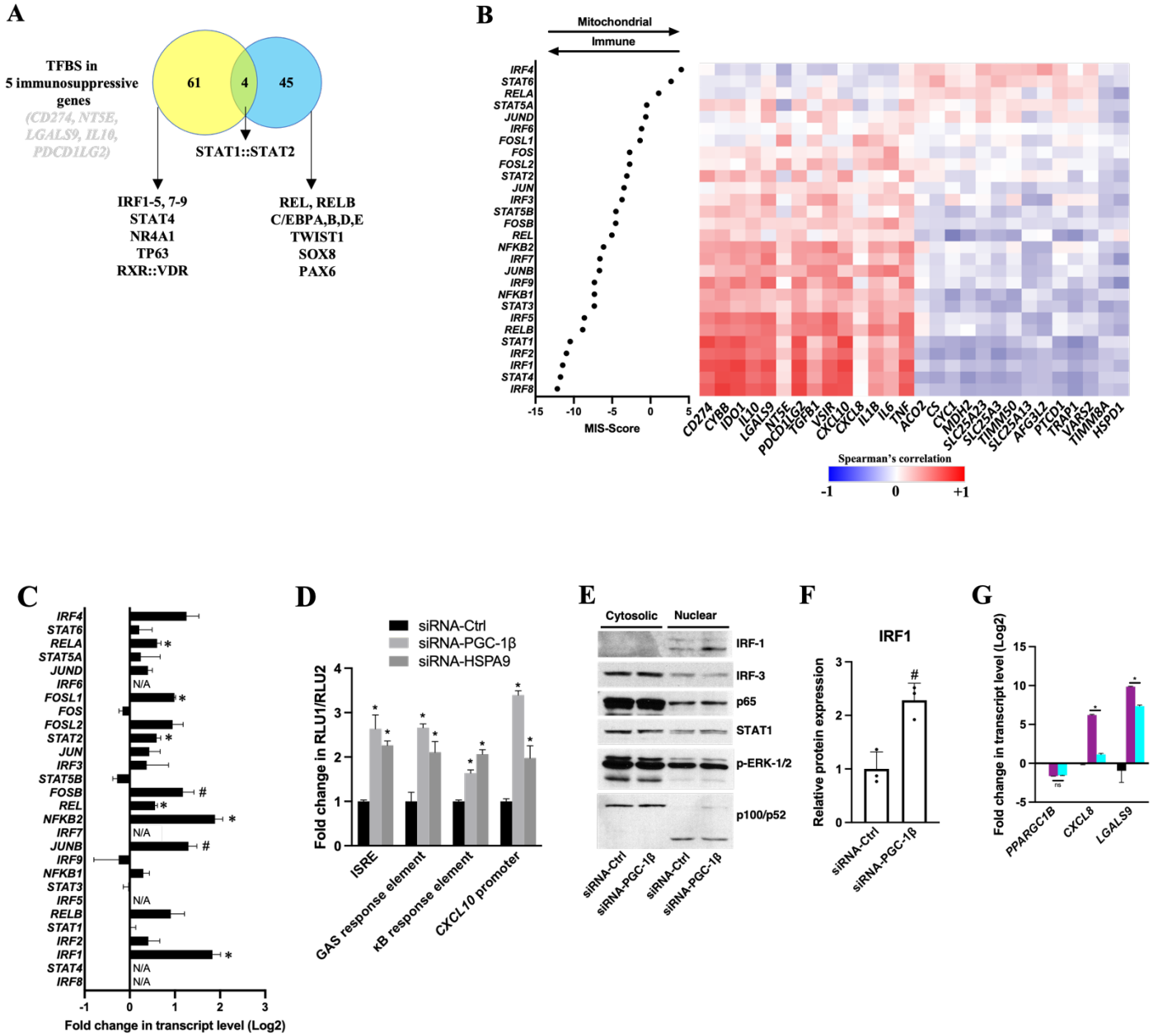


Figure 16

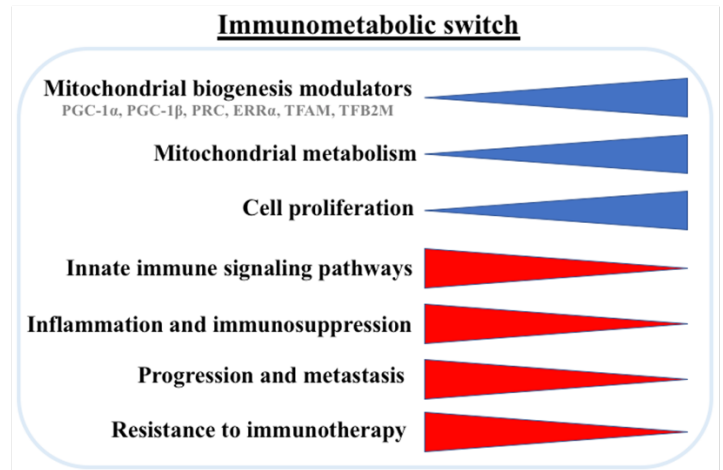
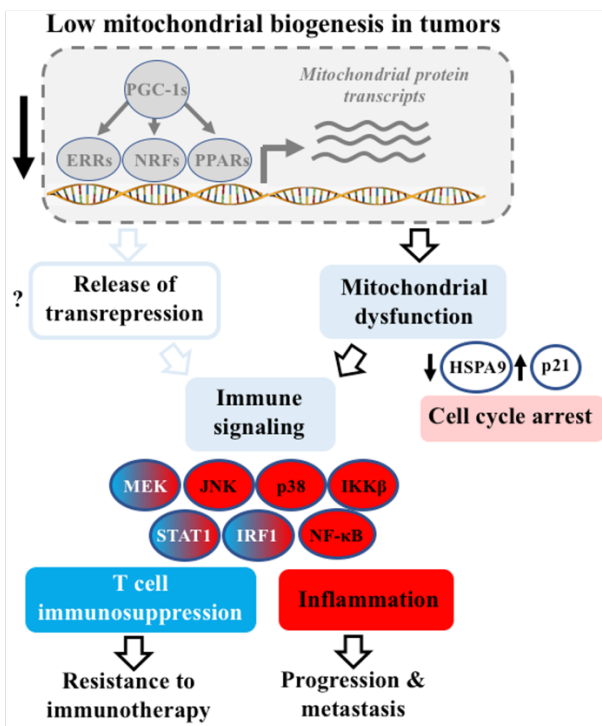


Figure Supplémentaire 1

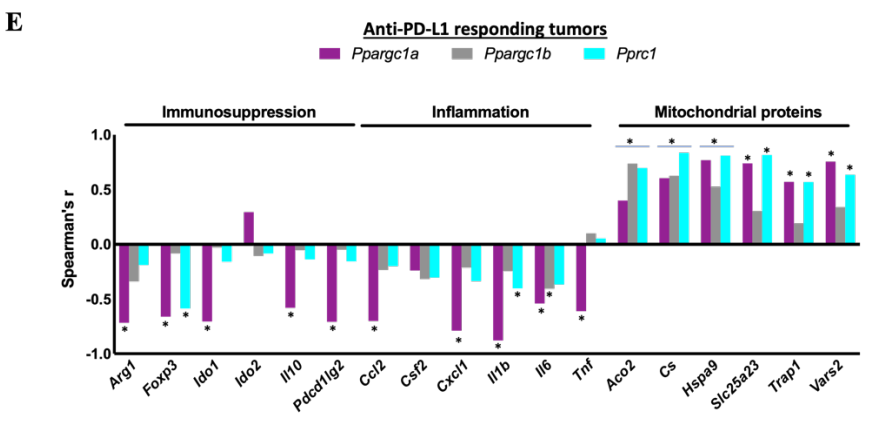
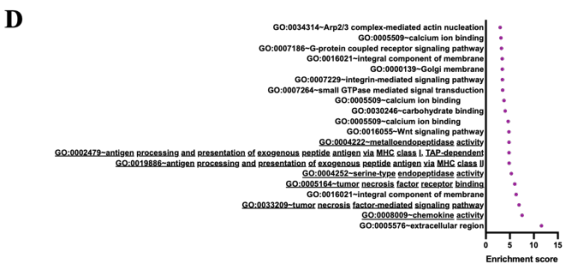
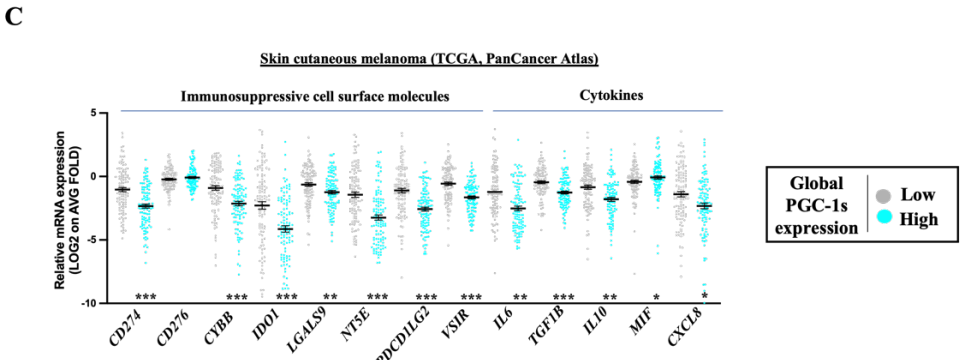
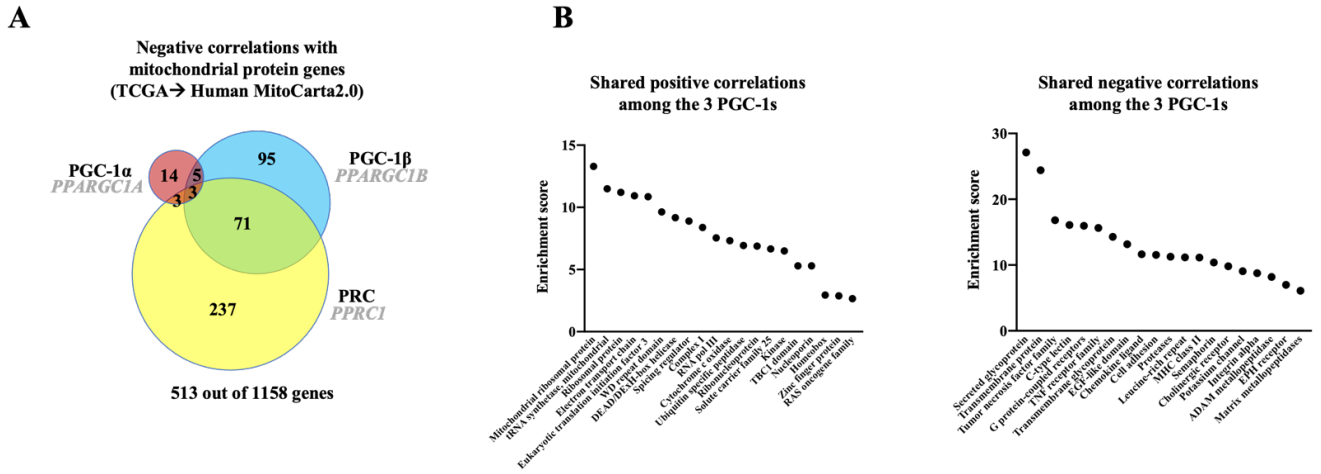
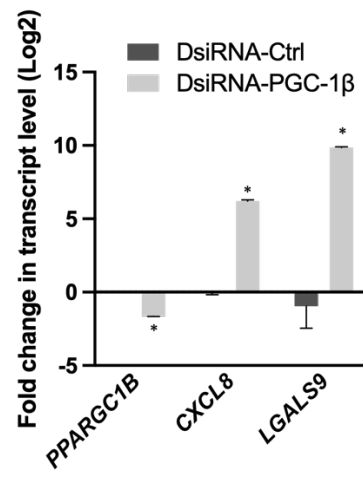


Figure Supplémentaire 2



2.3. Article #2: LARP1 is regulated by endoplasmic reticulum stress and exerts immunometabolic functions in melanoma

Title

LARP1 is regulated by endoplasmic reticulum stress and exerts immunometabolic functions in melanoma

Running title

ER stress and LARP1 in melanoma

Authors

Katherine Coutu-Beaudry¹, Simon-Pierre Gravel^{1,†}

Affiliations

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

² Centre de recherche du CHU de Québec, Université Laval, Québec, Canada

† Corresponding author

Correspondence to Simon-Pierre Gravel, Faculty of pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128, succ Centre-Ville, Montréal, Quebec, H3C 3J7. E-mail: sp.gravel@umontreal.ca. Phone: 1-514-343-6525

Competing interests

None

Research Highlights

- The expression level of LARP1 and PGC-1s is associated with several stress responses
- ER stress represses the expression of and LARP1 and PGC-1s in melanoma
- LARP1 regulates PGC-1s and mitochondrial functions in melanoma
- Low LARP1 expression is associated poor response to immunotherapy
- LARP1 functions as an immunometabolic switch in melanoma

2.3.1. Abstract

Metabolic rewiring and mitochondrial functions have pivotal roles in the establishment of a therapeutic resistance and progression of metastatic disease in melanoma. Ongoing research aims the understanding of the mechanisms that bolster metabolic adaptation in melanoma and the discovery of new metabolic-oriented strategies that could enhance the efficacy of targeted therapy and immunotherapy. We have recently found that the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivators family (PGC-1s) controls an immunometabolic switch in melanoma that could influence tumor immunogenicity and response to immunotherapy. As the expression of PGC-1-associated transcripts is highly variable in melanoma tumors, we hypothesized that macroenvironmental and cellular stresses could modulate the expression of these transcripts. Our analyses of publicly-available human melanoma tumors RNA-seq datasets and in vitro experiments with human melanoma cell lines reveals that endoplasmic reticulum (ER) stress can repress the expression of PGC-1s, but the mechanisms mediating these effects remain elusive. We have found that ER stress represses the expression of La-related protein 1 (LARP1), an important modulator of the translation of mRNA transcripts containing 5' terminal oligopyrimidine tracts (5'TOP), a motif that is particularly enriched in transcript encoding ribosomal proteins. LARP1 expression correlates with the one of PGC-1s and its knockdown recapitulates the effects of PGC-1s on mitochondrial respiration. The impact of LARP1 knockdown on immune gene expression is not marked as the one observed with PGC-1s knockdown, which suggests the existence of context-specific or compensatory mechanisms. LARP1 overexpression also confers some growth advantages to stressed melanoma cells. Overall, this research reveals that LARP1 expression can influence melanoma metabolism and immune response as a function of stress, which suggests that this protein could be targeted to polarize melanoma tumors and unveil vulnerabilities that could be exploited by therapeutics.

Keywords

Melanoma, Immune response, Metabolism, ER stress, LARP1

2.3.2. Introduction

In the past years, avoidance or protection against ultraviolet radiations and early diagnostic and resection of primary melanoma have successfully reduced melanoma-linked morbidity and mortality (465). Nevertheless, melanoma cases are constantly increasing and advanced stage melanoma is a fatal disease that remains a considerable therapeutic challenge due to poor response to therapy or the acquisition of therapeutic resistance (466, 467). To enhance the efficacy of antimelanoma therapy or block compensatory pathways, it is now common practice to design combinatory therapeutic approaches (468). Thus, a fundamental understanding of interconnection between signaling and metabolic pathways appears of the highest importance for the rational design of therapies that can expose vulnerabilities in cancer cells and block their abilities to adapt to stressful contexts. It is now well appreciated that metabolic reprogramming in melanoma cells can participate at all stages of tumor progression and shape the resistance to therapeutics (92, 182, 188, 407, 408, 423, 424). Mitochondria, the main bioenergetic organelles of the cell, can modulate cell survival in hostile environment and can exert important immunomodulatory functions in tumors. Importantly, the control of mitochondria biogenesis and mitochondria functions can modulate the resistance to directed therapies and tumor recognition by the immune system (444, 456). Targeting mitochondria thus appears as a promising approach to fight refractory late-stage disease and improve the efficacy of antimelanoma therapies.

We have recently found that the control of mitochondrial biogenesis is also linked to pro-inflammatory and immunosuppressive transcription programs in melanoma, and that these pathways are controlled by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivators (PGC-1s) (Laurin K. *et al.*, under review). The PGC-1s are master transcriptional regulators of mitochondrial biogenesis, oxidative phosphorylation, and oxidative stress detoxification (324, 425). The 3 family members, 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 (469). Our work supports the notion that PGC-1s expression level modulate a complex immune response that could have an impact on the response to immunotherapy and likely other immune-related processes. Although

PGC-1s appear as nodal factors that can control both the immune and metabolic states of melanoma cells, little is known about the mechanisms and conditions that lead to their downregulation in melanoma tumors.

PGC-1 α has been by far the most studied family member in cancer due to its highly inductive nature and correlation with mitochondrial functions (we reviewed in (426)). PGC-1 α can be regulated by multiple post-translational modifications and by transcriptional regulation, but much of this work has been done in other contexts than cancer (399). Although we were successful in depleting PGC-1s mRNA in melanoma cells, which recapitulated the *in vivo* immune signature, our previous work did not examine the underlying causes of the depletion of these transcripts. We hypothesized that low PGC-1s transcript expression in melanoma tumors could be the result of a response to cell-intrinsic or microenvironmental stress. Melanoma tumors are indeed known to experience a variety of stresses such as oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress, nutrient and oxygen deprivation. Mitochondrial OXPHOS is an important source of ATP and metabolites that drives anabolic processes such as mRNA translation, amino acid and nucleotide biosynthesis. In response to specific stressful situations that could compromise the proper function of biosynthetic pathways and cell division, a reduction in mitochondria functions could represent an efficient way to save on energy costs and promote survival. Herein, we analyzed transcriptomics datasets of human melanoma tumors and performed *in vitro* experiments to identify stress pathways that regulate PGC-1s and immune response in melanoma. This work shows that ER stress is a potent repressor of PGC-1s and mitochondrial functions, and reveals the unexpected contribution of specific mRNA translation processes in the control of melanoma immunometabolism.

2.3.3. Materials and methods

Cell lines and compounds

The human melanoma cell lines MeWo and the murine melanoma lines B16F10 and YUMMER1.7 were obtained with the generosity of Ian Watson (Rosalind and Morris Goodman Cancer Research Institute, McGill University). Murine melanocytes, as well as HEK293 Phoenix cells, were kindly provided by Philippe Roux (Institute for Research in Immunology and Cancer, University of Montreal). The human melanoma lines were maintained in culture in RPMI 1440 1X with L-glutamine (350-000-CL, Wisent inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CAN) supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS) Premium Quality (080 -150, Wisent inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CA) as well as a 100 U / mL penicillin-streptomycin solution (450-200-EL, Wisent inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CA). The murine melanocytes and melanoma cell lines were maintained in culture in 1X DMEM medium with L-glutamine and sodium pyruvate (319-005, Wisent inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CA) supplemented with 5% FBS and a solution. of penicillin-streptomycin (100 U / mL). The HEK293 Phoenix cells are maintained in culture in 1X DMEM medium with L-glutamine and sodium pyruvate supplemented with 10% FBS and a solution of penicillin-streptomycin (100 U / mL). MRC5 human lung fibroblasts were obtained with the generosity of Sylvain Meloche (Institute for Research in Immunology and Cancer, University of Montreal) and are maintained in culture in 1X DMEM medium with L-glutamine and sodium pyruvate supplemented with 5% FBS and a solution of penicillin-streptomycin (100 U / mL). During subculture, cells were washed with PBS (Wisent inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CA) then harvested using 0.25% trypsin with 2.21 mM EDTA and HBSS (325-045-EL, Wisent inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CA). All cell lines are cultured in a humidified incubator at 37 ° C with an atmosphere of 5% CO₂. All compounds used in this study were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA), except for Metformin (ab120847), 2-Deoxy-D-Glucose (ab142242), Staurosporin (ab120056) and Bleomycin (ab14977), which were purchased from Abcam (Cambridge, UK).

Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) analysis

RNA was extracted using Monarch Total RNA Miniprep Kit (T2010, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), according to the manufacturer's instructions and RNA samples were quantified using VarioSkan Lux microplate reader (N16044, ThermoFisher Scientific, Waltham,

MA, USA). For each sample, reverse transcription was performed with 1µg of RNA using LunaScript RT Supermix Kit (E3010, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) or iScript Reverse Transcription Supermix (1708840, Biorad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The qPCR reaction was performed in a MicroAmp Fast Optical 96 well Plate, 0,1 mL (4346907, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) using Luna Universal qPCR Master Mix (M3003, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's instructions in the QuantStudio5 0,1 mL Real-Time PCR system (A28568, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cDNA samples were diluted in a ratio of one to eight and were loaded in triplicates onto the plate. The qPCR reaction was performed following a two-step protocol in which the DNA was initially denatured at 95 °C for three minutes. The samples were then amplified for 45 cycles, each cycle consisting in a denaturation step at 95 °C for 15 seconds followed by an extension step at 60°C for 30 seconds. After the 45 amplification cycles were complete, a melt curve was performed, starting at 60°C and going up to 95 °C at a speed of 0,1°C /s. Data were extracted using the Design and Analysis Software and Rox normalization was removed. Relative mRNA for all transcripts was normalized using TBP as a housekeeping gene. The following primers were used in this study (5' → 3').

Normalization transcripts

TBP FWD: TGCCACGCCAGCTTCGGAGA

TBP REV: ACCGCAGCAAACCGCTTGGG

PGC-1s Transcripts

PPARGC1A FWD: CCTGTGATGCTTTTGCTGCTCTTG

PPARGC1A REV: AA ACTATCAA AATCCAGAGAGTCA

PPARGC1B FWD: AGGGAGTGAAGGTTGGGAATAG

PPARGC1B REV: AGCTGGAAATGGCTTTGACATC

PPRC1 FWD: GGG ACG GAG AGA CGGAG

PPRC1 REV: GAGAGACTGACAAAGCCAGA

RNA Binding Proteins Transcripts

KHSRP FWD: GCAGCAGGCTCAATGAATCG

KHSRP REV: TCGCTCTCTCGCCAAACAAA
PABPC4 FWD: TGGCTATGGACTTTGGTGGG
PABPC4 REV: ATTTGTAGGGGGCAACAGCC
PTBP1 FWD: TGACAAGAGCCGTGACTACAC
PTBP1 REV : GGCTGAGATTATACCAGGTGC
LARP1 FWD: AGCTGTGCGATCTGGATGTA
LARP1 REV: AAAGCATGGAGTGACCAGGG
YBX3 FWD: ACCGTAGCAGGGGACCTC
YBX3 REV: CGACGCCGGTAATTGTAGGG
PABPC1 FWD: ACTTTGAGACGCAGGAAGCA
PABPC1 REV: CACTTAAGGCAGGCCCAAAC
SUPV3L1 FWD: TCCGGTGGCTCCAAAATACC
SUPV3L1 REV: TCTTTACTTCATTCTTGTCCAGAGG
PCBP4 FWD: AGACGGCCAAGTCTACCTCT
PCBP4 REV: AGGGAGATGGCATAGGGTGT
PABPN1 FWD: AGCCAAGAGGAGGAGGAGG
PABPN1 REV: TAGATGGAACGGGCATCAGC
HNRNPD FWD: CTCCCCACGACACTCTGAAG
HNRNPD REV: TCCCAGCTAAGGCCTCCTAT
HNRNPC FWD: GTCCCCTCTACTCAGCTCCT
HNRNPC REV: ACGTTTCGAGGGCACTACAG
EXOSC9 FWD: TGGAACCAGACAAGAATCCAA
EXOSC9 REV: ACAACTGTTAGCTTTAATTGGCA
LARP4 FWD: CAAGGCGAGTGTGTGTCCTT
LARP4 REV: TGCTACCTGCTCCACGAAAA
TARDPBP FWD: TCAAGGAGCCCAGGGGTAAG
TARDPBP REV: ACCCGTATCTATGCAGTACCA
SSB FWD: GTCGTTGCTGTTGCTGTTTGT
SSB REV: ATTTTCAGCCATTGCGGCTATC
FMRI FWD: CCAGAAACCTGAACTCAAGGC
FMRI REV: ATCTCTCCAAACGCAACTGG

PUM2 FWD: CCCTGGCTACTCGTATTCGT
PUM2 REV: GACCATCCAGCTCCTTTACC
MBNL1 FWD: GCAGCTGAATGAGTTGTGGC
MBNL1 REV: CCAAGGCATTGTGGGAGTCA

Pro-inflammatory transcripts

CXCL8 FWD: TGATTTCTGCAGCTCTGTGT
CXCL8 REV: AAACCTTCTCCACAACCCTCT
IL6 FWD: CAG AGC TGT GCAGATGAGTA
IL6 REV: GCGCAGAATGAG ATGAGTTG
IL1B FWD: GCTCGCCAGTGAAATGATG
IL1B REV: GTAGTGGTGGTCGGAGATTC
TNF FWD: AAGAGAATTGGGGGCTTAGG
TNF REV: GTTTCGAAGTGGTGGTCTTG
IRF1 FWD: GCCCTCCACCTCTGAAGCTA
IRF1 REV: TACCCCTTCCCATCCACGTT

Immunosuppressive transcripts

CD274 FWD: CAGCCGCGCTTCTGTCC
CD274 REV: ACATATAGGTCCTTGGGAACCG
CD276 FWD: TCCCTGAGTCCCAGAGTCG
CD276 REV: CTCCTGTGAGGCAGAACCAC
LGALS9 FWD: AGTCCAGCTGTCCCCTTTTC
LGALS9 REV: CACACCACGTACCCTCCATC
PDCD1LG2 FWD: AAGAGGGAAGTGAACAGTGCT
PDCD1LG2 REV: GCCAGGTGTTGGCTAGTCTT
NT5E FWD: CTCCTCTCAATCATGCCGCT
NT5E REV: AGCCAGGTTCTCCCAGGTAA
IDO1 FWD: TTGCTAAAGGCGCTGTTGGA
IDO1 REV: GTCTGATAGCTGGGGGTTGC
VSIR FWD: CCCATCCTCCTCCCAGGATA

VSIR REV: TCCCTTGAATGTTGCTGTCCA
IL10 FWD: TGAATCCAGAATCGAAGGCCA
IL10 REV: TGCATCGATTTTGCTCCCCT
TGFB1 FWD: TTATTGAGCACCTTGGGCAC
TGFB1 REV: TGGGCTTGTTTCCTCACCTTT
CCL2 FWD : AGAGGCTGAGACTAACCCAGA
CCL2 REV : TTTCATGCTGGAGGCGAGAG

Nucleus Encoded Mitochondrial Protein Transcripts and Transcription Factors

HSPA9 FWD: GGACTATCGCTCCATGCCAA
HSPA9 REV: CTTTACTTGGGGCTCTGCCA
SLC25A13 FWD: GCCGCCAAGGTGGCTTT
SLC25A13 REV: TTGGTCTGATCCACCACTCC
SLC20A1 FWD: GAACTGATAAAAATTGTGATGTCTTGG
SLC20A1 REV: GCTCGCAAACCATTAGGAAC
TFAM FWD: GAA CAA CTA CCC ATA TTT AAA GCT CA
TFAM REV: GAA TCA GGA AGT TCC CTC CA
NOA1 FWD : ACGCGAGCTTCCTTATGACC
NOA1 REV : AAAACGCTCCTGCATGTCAC
NNT FWD : AGAGAGGACATCACGCTTTG
NNT REV : GCTAAGTAGAGGACAGCAGCA
OSBPL1A FWD : CTCCAGGAGAGGGCCGAG
OSBPL1A REV : GGACTGCTCCTTGGGCTCTA
APOOL FWD : ACTTGAGCTTGGCTTTGTCC
APOOL REV : AGCAGTATTAGGAAGCCTGTGT
CS FWD : CAACTCAGGACGGGTTGTTCCAGG
CS REV : GTAGTAATTCATCTCCGTCATGCC
NLN FWD : TGATGGAAGCCGGATGATGG
NLN REV : GTAAGTCCTCACCTCGTCGT

Cell Metabolism and Hypoxia Response

HIF1A FWD : TGC TCA TCA GTT GCC ACT TCC

HIF1A REV : CGC TGT GTG TTT TGT TCT TTA CCC

Mouse Transcripts

Larp1 FWD: GGTGAACCCGTGGACGAA

Larp1 REV: TCTCCAAAATCACCAACCTTGC

Ppargc1a FWD: TGTGTGCTGTGTGTCAGAGT

Ppargc1a REV: ACCAGAGCAGCACACTCTAT

Ppargc1b FWD: AGATGGAACCCCAAGCGTCC

Ppargc1b REV: AACCGTGTCTCTGGCCTCTTTT

Pdcd1lg2 FWD : GTGCTGGGTGCTGATATTGAC

Pdcd1lg2 REV : AAAATCGCACTCCAGGCTCA

Cd274 FWD : CAGCAACTTCAGGGGGAGAG

Cd274 REV : TTTTGCGGTATGGGGCATTG

Nt5e FWD : TCCTCTCAAATCCAGGGACA

Nt5e REV : ACGATGTCCACACCTCGAAC

Lgals9 FWD: GGGGCGCAAACAGAAAACCTC

Lgals9 REV: CTTGGACGGGTAAAGCCCAT

Tbp FWD: CTGGCGGTTTGGCTAGGTTT

Tbp REV: ACCATGAAATAGTGATGCTGGG

Cell viability assay

Cells were plated 16 to 24 hours before treatment in a 96-well cell culture plate at a density of 76 000 cell/mL for MeWo, 30 000 cell/mL for A375, 70 000 cell/mL for RPMI7951, 10 000 cell/mL for MRC5, 15 000 cell/mL for Yumner1.7 and B16F10, and 16 800 cell/mL for mouse melanocytes in 100 μ L complete growth medium (see Cell Lines and Culture above). Compounds used for cell treatments in this study were resuspended in sterile Dimethyl Sulfoxide (DMSO) [DMS666.100, BioShop, Burlington, On, CAN] or sterile, molecular grade distilled, deionized water (609-115-CL, Wisent Inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CAN) accordingly. Growth medium was changed one hour before treatment. For each compound resuspended in DMSO, a 2X master mix

of complete growth medium at a concentration of 0,2% (V/V) DMSO was prepared and added onto the cells to obtain a final concentration of 0,1% DMSO (V/V). Seventy-two hours after treatments, 10 μ L of PrestoBlue HS (P50201, Invitrogen, Waltham, MA, USA) were added in each well containing 100 μ L of growth medium. The plate was incubated in the dark in a humidified incubator at 37 ° C with an atmosphere of 5% CO₂ for 30 minutes. The VarioSkan Lux microplate reader (N16044, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) allowed to read the fluorescence of each well, using an excitation wavelength of 560 nm and an emission wavelength of 590 nm. Fold change for each condition were calculated using DMSO or water accordingly. Data were plotted in GraphPad Prism software and, when indicated, the “*growth inhibition 50*” (GI50) dose was determined using the “log(inhibitor) vs response analysis”.

RNA interference

Cells were plated in a six-well cell culture 16 to 24 hours before transfection at a density of 100 000 cell/mL for MeWo, 21 000 cell/mL for Yummer1.7 and B16F10, and 22 500 cell/mL for mouse melanocytes in 2 mL of complete growth medium (see Cell Lines and Culture above) 18-24 hours before transfection. Growth medium was changed one hour before transfection. Cells were then transfected using Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (13778075, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Reduced Serum Opti-MEM (31985062, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer’s protocol. Cells were transfected with either All Star negative control siRNA or a mix of four siRNA targeting human or mouse LARPI transcript at a final concentration of 2,4 nM. All siRNA were resuspended in sterile, molecular grade distilled, deionized water (609-115-CL, Wisent Inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CAN). The four siRNAs targeting human *LARPI* (GS23367 FlexiTube GeneSolution) or murine *Larpl* (GS73158 FlexiTube GeneSolution) were purchased from QIAGEN (Hilden, DE). AllStars negative control siRNA was also purchased from QIAGEN (1027280, QIAGEN, Hilden, DE). Growth medium was changed 24 hours after transfection. Cells were frozen in liquid nitrogen 72 hours after transfection for subsequent qPCR and Western Blot analysis.

SDS-PAGE and Western Blot

Cells were lysed on ice in Triton X-100 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,40, 5 mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100) supplemented with protease and phosphatase inhibitors

(2mM Aprotinine (ab146286), 1 mM Pepstatine A (ab141416), 5 mM Leupeptine hemisulfate (ab141404), 1 mM PMSF (ab141032), 1 mM Sodium orthovanadate (ab120386), 5 mM NaF) all purchased from Abcam (Cambridge, UK). Protein lysates were centrifuged at 17 000 g at 4° C for 10 minutes. Supernatant was collected and dosed with the Pierce BCA protein Assay Kit (23227, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions, using a BSA standard curve (800-096-EG, Wisent Inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CA). Equal amounts of proteins were denatured in 2X Laemmli Buffer (124,8 mM Tris pH 6,8, 20% Glycerol, 4% Sodium Dodecyl Sulfate, 10 % β -mercaptoethanol) in for 5 minutes at 95 °C. Samples were resolved on a 8% polyacrylamide gel at 200 V and transferred with Pierce Methanol-free Western Blot Transfer Buffer (35040, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) on a Pierce PVDF transfer membrane (88518, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) previously activated in methanol. Transfer occurred at 15V and 0,24 mA using the Trans-Blot SD Semi-Dry transfer system (170-3940, Bio Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were then blocked in Blotto Buffer (5% Non-Fat Dry Milk, 20 mM Tris Base [600-125-LG, Wisent Inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CA], 137 mM NaCl [600-082-WG, Wisent Inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CA], 0,1% Tween [TWN510, BioShop, Burlington, On, CAN]). Membranes were then incubated with anti-LARP1 (A302-087A, Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX, USA), or anti-Actin (3700S, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA) prepared in either 5% BSA-TBST solution or in Blotto Buffer supplemented with 0,02% Sodium Azide in a ratio of one to 1,000 for LARP1, and one to 10,000 for β -Actin. All incubations were carried on overnight at 4°C with gentle rocking. Membranes were washed three times for 15 minutes in TBST (20 mM Tris Base [600-125-LG, Wisent Inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CA], 137 mM NaCl [600-082-WG, Wisent Inc, Saint-Jean-Baptiste, Qc, CA], 0,1% Tween [TWN510, BioShop, Burlington, On, CAN]). Following the supplier's recommendations, membranes were then incubated with either a goat anti-rabbit (LIC-926-80011, Mandel Scientific Inc, Guelph, ON, CA) or a goat anti-mouse (LIC-926-80010, Mandel Scientific Inc, Guelph, ON, CA) antibody coupled with horseradish peroxidase activity and prepared in Blotto Buffer at a ratio of 1 to 10 000. Incubation was carried on at room temperature for one hour. Following incubation with secondary antibody, membranes were washed three times in TBST for 10 minutes. Signal was revealed using Western Lighting Plus ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate (NEL103001EA, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and printed on Blu-Lite UHC autoradiography films (062667, Dutscher, Bernolsheim, FR). Films were developed in a dark room

at the Institute for Research in Immunology and Cancer of the University of Montreal using the Mini-Med 90 X-Ray film processor (AFP manufacturing, Peachtree city, GA, USA).

Viral infection and LARP1 overexpression

pBAPE-Puro and pBAPE-mycLARP1 vectors were kindly provided by Philippe Roux (Institute for Research in Immunology and Cancer, University of Montreal). Each vector was transformed in One Shot Stbl3 Chemically Competent *E. coli* (C737303, Invitrogen, Waltham, MA, USA) on ice. Heat shock was performed by putting the bacteria in a water bath at 42°C for 30 seconds before putting the bacteria back on ice for five minutes. Bacteria were then incubated in 1 mL of LB Broth growth media without antibiotic for one hour at 37 °C with shaking at 250 revolutions per minute (RPM). Fifty µL of pre-culture were deposited on a LB agar plate containing 10 µg/mL of ampicillin overnight at 37 °C. Positive clone was selected and incubated in 1 mL of LB Broth growth media with 10 µg/mL of ampicillin for eight hours at 37 °C with shaking at 250 RPM. Twenty-five µL of culture was incubated in 25 mL of LB Broth growth media containing 10 µg/mL of ampicillin overnight at 37 °C with shaking at 250 RPM. Plasmid DNA was then extracted using Plasmid Plus Midi Kit (12945, QIAGEN, Hilden, DE) following manufacturer's protocol and quantified using VarioSkan Lux microplate reader (N16044, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

HEK293 Phoenix cells were seeded in a 60 mm cell culture petri dish at a density of 500 000 cells/mL in complete growth media (see section Cell Lines and Culture above) 16-24 hours before transfection. Media was changed one hour before transfection. Cells were transfected with 1 µg of either pBAPE-Puro or pBAPE-mycLARP1 vector using Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (11668019, Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. Cells were then moved in a humidified incubator at 34 °C with an atmosphere of 5% CO₂. Media was changed 24 hours after transfection. Virus was collected 48 hours after transfection and purified by centrifuging at 200 x g for five minutes.

For short term analyses, MeWo cells were seeded in a six-well cell culture plate at a density of 125 000 cells/mL in complete growth media (see section "Cell Lines and Culture" above) 16-24 hours before infection. Master mix containing the appropriate volume of either pBAPE-Puro or pBAPE-

mycLARP1 viral preparation, as mentioned in figures legend, and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Polybrene Infection Reagent (107689, Millipore Sigma, St-Louis, MI, USA) was laid onto the cells and mixed by gentle shaking every 15 minutes. Two hours after infection, viral media was removed and replaced with complete RPMI 1440 1X growth medium (see section “Cell Lines and Culture” above). Seventy-two hours after infection, cells were frozen in liquid nitrogen for subsequent qPCR and Western Blot analysis.

To produce stable cells overexpressing LARP1, MeWo cells were seeded in a six-well cell culture plate in complete growth media at a density of 125 000 cells/mL 16-24 hours before infection. Cells were infected with 1 mL either pBAPE-Puro or pBAPE-mycLARP1 viral preparation containing 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Polybrene Infection Reagent following the protocol detailed above. Once confluence was reached, infected cells were selected with 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Puromycin for four days.

Actinomycin D chase

MeWo cells were seeded in a six-well cell culture plate at a density of 100 000 cells/mL in complete growth media (see section “Cell Lines and Culture” above) 16-24 hours before treatment. Media was changed one hour before treatment with 1 μM Thapsigargin (0,1% DMSO) for 24 hours. Cells were then treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ actinomycine D (0,1% DMSO). Growth media was removed. Cells were washed in 1X ice cold PBS 1X and frozen in liquid nitrogen for subsequent qPCR and Western Blot analysis.

Seahorse assays

Oxygen consumption rates (OCR) and extracellular acidification rates (ECAR) of MeWo cells were determined with a XFe96 Seahorse extracellular analyzer (Agilent, Santa Clara, CA). The day prior to siRNA transfection, 2,500 or 5,000 MeWo cells were seeded in XFe96 cell plates. Media was replaced with sodium bicarbonate free medium 72h post-transfection. Seahorse injection setup and measurements were based on the Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit but with the use of in-house prepared inhibitors (in DMSO). Inhibitors used were oligomycin (1 μM) (04876, Sigma-Millipore), FCCP (0.5 μM) and Antimycine A (1 μM) (15218, 19433, Cayman Chemicals), and Rotenone (1 μM) (143145 Abcam). Cells were washed and lysed with RIPA buffer for determination of protein content (as described in Western blotting section). For the calculation

of mitochondrial respiration, non-mitochondrial OCR (after rotenone and antimycin A co-injection) was removed from basal OCR.

Analyses of publicly-available transcriptomic datasets

Human RNA expression datasets used in this study were obtained from the cBioPortal for Cancer Genomics web site, an open-access and open-source resource (427, 428). 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) (429) and contained 48 melanoma cell lines (from 1739 samples). Homo sapiens genes associated with specific stress response biological processes were retrieved from Amigo2 from the Gene Ontology (GO) consortium (470-472). For the calculation of correlation scores, a number was associated with the magnitude of significance for Spearman's r (1 for $p < 0.05$, 2 for $p < 0.01$, 3 for $p < 0.001$, 4 for $p < 0.0001$) between PGC-1s transcripts level and genes from given GO term, and this number was multiplied to the percentage of corresponding genes within this GO term. The obtained products were summed up for positive and negative correlations, and negative correlation products were subtracted from the positive ones. The resulting score reflects the overall positive or negative correlation of GO terms with individual PGC-1 transcripts. 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. 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). Venn diagrams were generated with the VIB/Ugent tool available at <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>, and group areas were adjusted proportionally to their relative size. 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 (431), and stringency setting was set as highest. For heatmap representations, Spearman's coefficients grids or relative mRNA expression levels were automatically colored by the GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). The list of ER resident proteins was retrieved from The Human Protein Atlas (Human Protein Atlas proteinatlas.org) with criteria

subcell_location:Endoplasmic reticulum (473). For the study of tumor transcriptomics in mice treated with anti-PD-L1, we used the GSE172320 dataset available on Gene Expression Omnibus (GEO) (432). Affy IDs were converted to gene symbols with db2db from bioDBnet (433). Responders and non-responders refer to responsiveness to 10mg/kg anti-mouse PD-L1 mlgG1 D265A in PBS. Spearman's correlations were calculated with GraphPad Prism.

Statistical analyses

Statistical analyses were done with Microsoft Excel or GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). Statistical tests are indicated in figure legends. All experiments are shown as mean + SEM of independent experiments, or as mean + SD of biological replicates.

2.3.4. Results

The expression of PGC-1s transcripts correlates with multiple stress response pathways in human cutaneous melanoma.

We have previously shown that low PGC-1s expression in human melanoma is associated with immunometabolic gene expression programs that could influence tumor progression and response to therapeutics (Laurin K *et al.*, under review). To determine if the activation of stress pathways could be responsible of the downregulation of PGC-1s transcripts in melanoma, we examined the correlation between PGC-1s transcripts in human cutaneous melanoma (RNA-seq dataset of 443 samples from The Cancer Genome Atlas, TCGA) and those encoding for proteins associated with Gene Ontology (GO) cellular processes linked to endoplasmic reticulum (ER) stress, osmotic stress, response to metal ion, to nutrient levels, amino acid starvation, DNA damage, oxidative stress, heat, and hypoxic stress (AmiGO 2). These analyses show that the 3 PGC-1s significantly correlate with ~30-60% of the genes composing these processes, some of which correlate positively and others negatively with the 3 PGC-1s (**Fig. 17A**). PRC was overall correlating with more stress response genes, following by PGC-1 β . To determine if PGC-1s correlate more positively or negatively with these GO stress response processes and if they show similar correlative trends, we calculated for each PGC-1 a correlation score that multiplies a Spearman's p-value score to the percentage of genes that fall within that p-value range (see **Materials and Methods**). These

analyses show that the 3 PGC-1s correlate more negatively with response to metal ions, response to ER stress, and response to osmotic stress, while they all correlate more positively with a single process, response to heat (**Fig. 17B**). To determine if PGC-1s could indeed be sensitive to stress in melanoma, we treated MeWo human metastatic melanoma cells with vehicle or compounds that can induce a variety of stress responses (translation inhibition: cycloheximide, blasticidine, G418; proteasome inhibition: MG-132; metabolic stress: 6-aminonicotinamide, BPTES, 2-deoxy-D-glucose, 3-Bromopyruvate, cerulenin, metformin; DNA damage: bleomycine; oxidative stress: staurosporine, as well as other compounds). These analyses show that PGC-1s can be downregulated by a variety of compounds, but that the impact of each PGC-1 can differ dramatically for a given treatments (**Fig. 17C**). PGC-1 α transcript was induced by metformin, as expected (474). Notably, the 3 PGC-1s were downregulated by cycloheximide, bleomycine and MG-132, which suggests that stresses affecting protein synthesis or proteostasis could be linked to the suppression of PGC-1s. Taken together, these analyses show that PGC-1s expression level is linked to the activation of stress pathways in human melanoma. Our results suggest that in vitro approaches can help characterize the mechanisms that link stress responses to immunometabolic rewiring in melanoma.

Endoplasmic reticulum stress represses the expression of PGC-1s in melanoma

We have shown that the expression of PGC-1s is strongly linked to the response to ER stress in melanoma (**Fig. 17A-B**). Given that ER stress is associated with protein synthesis and proteostasis(475) and that it is known to contribute to melanoma progression and response to therapeutics(476, 477), we have decided to further explore this pathway to investigate the regulation of PGC-1s in melanoma. To complement correlation analyses from the previous section, we generated high and low PGC-1 expressing groups of human melanoma cell lines (Cancer Cell Line Encyclopedia, Broad) and evaluated the expression of 235 transcripts of the endoplasmic reticulum stress response (GO:0034976, AmiGO2) in these groups. These analyses show that a low expression of any PGC-1 family member downregulates the expression of many ER stress-associated transcripts while upregulating the expression of other ER stress-associated transcripts (**Fig. 18A**). Importantly, ~36% of these transcripts were modulated significantly between groups (Student's *t*-test, $p < 0.05$), and there was minimal overlap between shared genes, except for genes

that are modulated according to both PGC-1 α and PGC-1 β levels (**Fig. 18B**). Indeed, the analysis of the 15 genes that are the most affected (magnitude of fold change in expression) by PGC-1s levels show similar associations with PGC-1 α and PGC-1 β (**Fig. 18C**). To determine if ER stress can affect the expression of PGC-1 α and PGC-1 β in melanoma cells, we first evaluated the impact of various concentration the ER stress inducer thapsigargin (TSG) in melanoma cell lines with high (MeWo) or low (A375, RPMI7951) PGC-1 α/β expression (Laurin K *et al.*, under review) as well as normal human fibroblasts (MRC-5). TSG repressed cell proliferation in all the tested cell lines in a dose-dependent fashion, and MeWo cells had the highest IC50 for the drug (**Fig. 18D**). Other compounds that induce ER stress by distinct mechanisms such as brefeldin A, tunicamycin, and A23187 also efficiently reduced MeWo cell proliferation (**Fig. 18E**), which suggests that this cell line is appropriate for the study of ER stress. Intriguingly, we were not able to detect activation of the unfolded protein response (UPR) in MeWo cells treated with TSG and other ER stress inducers (immunoblotting of CHOP, IRE1 α , PARP, phospho-eIF2 α , unpublished data). This suggests that UPR-independent pathways might be engaged upon ER stress and be responsible for proliferation arrest. TSG dose-dependently reduced the expression of PGC-1 α (**Fig. 18F**) and PGC-1 β (**Fig. 18G**) transcripts in MeWo cells, which supports the regulation of PGC-1s by ER stress in melanoma cells. As low PGC-1 expression is linked to reduced mitochondrial functions in melanoma cells (Laurin K *et al.*, under review), we examined the impact of ER stress on MeWo cells with Seahorse technology (**Fig. 18H**). While TSG had minimal impact on mitochondrial respiration (**Fig. 18I**), it had a significant and dose-dependent impact on maximal mitochondrial respiration of MeWo cells (**Fig. 18J**). This suggests that ER stress will reduce the ability of these cells adapt to metabolic stress, and that reduced expression of PGC-1s might be responsible of these reduced capacities. Interestingly, TSG also repressed extracellular acidification rate of MeWo cells, suggesting that it also impairs glycolysis (**Fig. 2I**). Taken together, these analyses reveal an important association between ER stress and PGC-1 α/β expression in melanoma cell lines, supporting a role of PGC-1s in adaptation to stress in melanoma.

LARP1 expression is altered by endoplasmic reticulum stress in melanoma.

We hypothesized that change in the abundance of proteins localized in the endoplasmic reticulum could impact on the expression of PGC-1s in melanoma, and thus that PGC-1s could act as sensors

of ER stress. To determine if such an association exists in human melanoma, we analyzed the expression of 471 known ER-resident proteins (Protein Atlas database) in cutaneous melanoma tumors (TCGA, as in **Fig. 17A-B**) with high or low expression of PGC-1 α , PGC-1 β , or PRC) and their correlation with PGC-1s (**Fig. 19A**). These analyses revealed significant correlations between PGC-1s and ER-resident proteins (**Fig. 19B-C**). As expected, gene functional classification revealed that most of the correlating proteins were involved in ER and Golgi processes (**Fig. 19B-C**, lower panels). Interestingly, ER protein transcripts that are involved in translation initiation and ribosome constitution were strongly enriched in transcripts that positively correlate with PGC-1s, and notably showed shared correlations with both PGC-1 β and PRC. Among the 26 shared transcripts, we found 14 transcripts encoding for ribosomal proteins and La Ribonucleoprotein 1 (LARP1), an RNA-binding protein (RBP) that regulates translation of specific target mRNA ((478)). Since all our correlation analyses were made on PGC-1s transcripts, and that PGC-1s transcripts are downregulated upon ER stress, PGC-1s expression could either be regulated at the level of transcription or at the level of mRNA stability. To evaluate if ER stress can affect PGC-1s transcript stability, we performed actinomycin D chase in MeWo cells treated with vehicle or TSG. These experiments reveal that ER stress does not affect the stability of both PGC-1 α and PGC-1 β mRNA (**Fig. 19D-E**), which suggests that PGC-1s are necessarily regulated by transcriptional control. Among several RBPs that correlate with PGC-1s in human melanoma tumors (TCGA) or that are associated with PGC-1s transcripts (CLIP-seq databases), we have found that LARP1 was the most downregulated one in MeWo cells treated with TSG (**Fig. 19F**) stress induction with TSG, which also resulted in dramatic reduction in LARP1 protein levels (**Fig. 19G**). LARP1 transcript regulation was not specific to ER stress, as many other stresses, including cycloheximide, were able to reduce its expression in MeWo cells (**Fig. 19H**). Taken together, these results show that ER stress can reduce the expression of LARP1 in melanoma cells and suggest that a transcriptional mechanism could link the expression of LARP1 with those of PGC-1s.

LARP1 expression level is linked to a mitochondrial immunometabolic switch in human and murine melanoma.

To determine if LARP1 expression level could modulate PGC-1s and associated immunometabolic programs in melanoma, we performed correlation analyses between LARP1 and a set of 28

mitochondrial and immune transcripts that we previously used to characterize the immune-metabolic switch driven by PGC-1 expression (Laurin K *et al.*, under review). Our analyses of the human cutaneous melanoma RNA-seq dataset (TCGA) reveal strong positive correlation between LARP1, PGC-1 α/β and nearly all mitochondrial transcripts (**Fig. 20A**). Strikingly, LARP1 correlated negatively with all the selected pro-inflammatory and immunosuppressive transcripts. Unbiased analyses of significantly correlated transcripts by gene functional classification revealed that positively correlating genes were strongly associated with translation and metabolic processes (**Fig. 20B**), while negatively correlating transcripts were particularly enriched in immune processes (cytokines, immune signaling, antigen presentation and processing)(**Fig. 20C**). This very similar correlation pattern is highly reminiscent with the PGC-1 immune-metabolic switch in melanoma, which suggests that LARP1 can regulate PGC-1s. We further show that LARP1 correlates positively with ~20% of transcripts that encode for mitochondrial proteins (**Fig. 20D**), which highlight a possible role of LARP1 in mitochondrial biogenesis and the regulation of mitochondrial functions. We have previously shown that the immune-metabolic changes associated with the expression level of PGC-1 could impact on the response to immunotherapy (Laurin K *et al.*, under review). To determine if LARP1 could exert similar functions, we examined the expression of LARP1 in a publicly-available transcriptomics dataset from melanoma tumors in a murine model treated with anti-PD-L1 immunotherapy(432), GSE172320. Our analyses show that there is a small but highly significant decrease in LARP1 expression in the non-responder group (**Fig. 20E**), suggesting the induction of a multigenic resistance or immunosuppressive program. LARP1 correlates positively with mitochondrial transcripts and negatively with immune transcripts in both responders and non-responders, but the correlations appear globally stronger in non-responders (**Fig. 20F**). Interestingly, LARP1 correlates positively with Stat6 and Rela, 2 transcription factors that appear to oppose the immune-metabolic switch driven by PGC-1 depletion in melanoma (Laurin K *et al.*, under review). Taken together, these analyses reveal that LARP1 expression is associated with metabolic and immune transcriptomic profiles that are similar to those regulated by PGC-1s, which suggests that LARP1 could be a modulator of PGC-1s in melanoma.

LARP1 knockdown impacts on mitochondrial respiration and innate immune transcriptional response in melanoma cell lines.

To determine the role of LARP1 in the control of melanoma cell metabolism and immune response programs, we performed RNA interference in MeWo cells, which resulted in a 90% decrease in LARP1 protein level (**Fig. 21A**). LARP1 knockdown (KD) reduced the proliferation of MeWo cells (**Fig. 21B**) and strongly impacted on cellular respiration (**Fig. 21C**). Specifically, LARP1 KD reduced both basal and maximal mitochondrial respiration (**Fig. 21D-E**), and also reduced ECAR (**Fig. 21F**), which suggests a reduction in glycolytic activity. Unexpectedly, LARP1 KD in MeWo cells lead to an upregulation in PGC-1 α and a reduction in PGC1 β and PRC expression (**Fig. 21G**). Notably, a large number of immunosuppressive transcripts were downregulated upon LARP1 KD. Further LARP1 gene silencing in 2 murine melanoma cell lines with distinct response to immunotherapy (YUMMER1.7 high response(479); B16F10 poor response(480, 481)) and melanocytes reveal strong cell-specific impact on PGC-1s and immunosuppressive gene expression (**Fig.21 H-J**). Primary melanocytes were insensitive to KD, while the impact on immunosuppressive transcript was very distinct between the 2 melanoma cell lines. Overall, these results reveal novel immunometabolic functions of LARP1 in melanoma and suggest that the ultimate impact of LARP1 depletion could be context-specific or dependent on the expression pattern of the different PGC-1 family members.

LARP1 ectopic expression provides minor advantages in melanoma cells under stressful conditons.

We hypothesized that increasing LARP1 expression could restore the expression of PGC-1s and provide growth advantage in stressful environments. We thus forced LARP1 expression ectopically in MeWo cells and examined the expression of PGC-1s. We could not detect any induction of PGC-1s 3 days post-infection with lentiviral particles (**Fig. 22A**) or after antibiotic selection and establishment of stable populations (**Fig. 22B**). Since LARP1 could exert its functions in a context-specific manner, we examined its role on gene expression in TSG-treated cells. Interestingly, we have found that cells stably expression LARP1 were more responsive to TSG treatment compared to control cells, with significant increase in PGC-1 α , IL-8, and PD-L2 transcripts (**Fig. 22C**). LARP1 ectopic expression slightly increases the IC50 of MeWo cells for TSG (**Fig.22D**), suggesting a protective role against ER stress. LARP1 ectopic expression also slightly but significantly diminishes the growth inhibitory effects of a variety of compounds such as

cycloheximide, 6-aminonicotinamide, bleomycine, and C646 (**Fig. 22E**), which support a role of LARP1 in other contexts that ER stress. Taken together, these results suggest that high LARP1 expression could provide growth advantage and control immune expression programs under various stressful environments in melanoma.

2.3.5. Discussion

During the course of tumor progression, cancer cells encounter various intrinsic and extrinsic stresses such as oxidative stress, DNA damage, proteostasis defects, and limitation in oxygen or nutrient supply. Cancer cells must adapt to these stresses to survive, and this adaptation process is intimately linked to the acquisition of tumorigenic, metastatic, and therapeutic resistance properties. Cells respond to ER stress by activating the Unfolded Protein Response (UPR), a complex and multifaceted signaling pathways that originates from the ER and disseminates in the cell to modulate both translation and transcription programs. ER stress, which is typically induced by the accumulation of unfolded and/or misfolded protein in the ER lumen, can be induced under a large number of situations including nutrient deprivation, hypoxia, genome instability and cytotoxic compounds, which makes it a very common stress in cancer, notably in melanoma. In melanoma, it has been shown that most cell lines are intrinsically bolstering the UPR, which suggests they constantly respond to or have adapted to ER stress. Although the UPR appears as an advantageous process to cancer cells through the restoration of ER homeostasis, induction of survival, angiogenesis, as well as immunosuppression, this adaptation response can also lead to cell death. It is important to appreciate that ER stress and UPR may have different outcomes depending on both intrinsic and extrinsic determinants. Thus, it appears crucial to characterize the mechanisms that regulate the response to ER stress in melanoma cells, and to determine the impact of ER stress on cancer immunometabolism.

We have previously shown that low expression of PGC-1s in melanoma is associated with increased expression of various immune response genes, ranging from pro-inflammatory to immunosuppressive transcripts (Laurin K et al, under review). While the knockdown of PGC-1s is growth suppressive and recapitulates the immunometabolic transcript expression signature in vitro, the mechanisms that lower the expression of PGC-1 in tumors remains elusive. We here show that

ER stress-associated transcripts negatively correlate with PGC-1s in human melanoma tumors (**Fig.17B**), and that ER stress induction with TSG can potentially repress the expression of PGC-1 α and PGC-1 β in vitro (**Fig. 18F-G**). We observed similar effects with other ER stress inducers (brefeldin A, tunicamycin, A23187, unpublished). This is to our knowledge the first evidence that ER stress can lead to repress the expression of PGC-1s and mitochondrial respiration in melanoma (**Fig. 18H-J**). We have previously proposed a co-dependency between ATP production (by OXPHOS) and ATP consumption (by translation)(482). Since global protein synthesis is repressed under ER stress (through eIF-2 α phosphorylation), an efficient mechanism that could maintain translation inhibition or lock the cell into a low translation state would be to reduce mitochondrial biogenesis through repression of PGC-1s. Since mTORC1 can modulate the translation of mitochondrial protein transcripts and modulate the expression of PGC-1 α through YY1(482, 483), it is possible that mTORC1 inhibition upon ER stress may be responsible for the repression of PGC-1s. It will be important to determine how ER stress modulates the activation of the mTOR pathways in melanoma cells, and to characterize the role of mTOR in shaping the immunometabolic landscape of melanoma cells in relationship with the acquisition of therapeutic resistance.

Changes in the expression of the transcript level of PGC-1s could be caused by transcriptional and post-transcriptional mechanisms that affect mRNA stability. We showed that ER stress does not decrease the stability of PGC-1 α and PGC-1 β transcripts (**Fig.19D-E**), which suggests that transcriptional mechanisms are involved. In melanoma, PGC-1 α transcription has been shown to be regulated by MITF(330), BRD4(484) and more recently by promoter H3K27 trimethylation(485). In the melanoma cell line used in this study, MITF was undetectable (unpublished observation), which suggests that other mechanism could regulate the expression of PGC-1 α and the other PGC-1s. Since the 3 PGC-1 genes (*PPARGC1A*, *PPARGC1B*, *PPRC1*) have distinct genomic localization with no homology in proximal promoter regions, it is likely that shared epigenetics mechanisms such as histone and DNA modifications are involved. Interestingly, we have found that the DNA methyltransferase inhibitor decitabine was a potent suppressor of PGC-1 α and PGC-1 β expression in melanoma cells (unpublished observation), which supports a functional epigenetics regulatory axis in these cells. It will be important to further characterize the transcriptional and epigenetic mechanisms that can contribute to PGC-1s suppression in melanoma,

and to determine impact of PGC-1s loss under ER stress. It is tempting to speculate that maintaining PGC-1 expression in melanoma cells undergoing ER stress could lead to major bioenergetics imbalance, which could sensitize to cell death. On the other hand, increased PGC-1s expression may also promote advantages such as restoring proteostasis and alleviating ER stress. Indeed, it has been shown that PGC-1 α can regulate in the nucleolus the transcription of ribosomal RNAs(486). Besides, the role of the PGC-1s in the regulation of ribosome biogenesis remain unknown in melanoma.

While our analyses suggest transcriptional regulation of PGC-1s by ER stress in melanoma cells, our data revealed the unexpected role of the RNA-binding protein LARP1 in the regulation of immunometabolism in melanoma. LARP1 is most known for its ability to bind the 5'TOP of mRNA and to act as a mTORC1-sensitive switch able modulate their translation. Mechanistically, when mTORC1 is inhibited, LARP1 suppresses the translation of 5'TOP mRNA, but when it is activated, LARP1 represses their translation (reviewed in (487)). 5'TOP motifs are mainly found in housekeeping and ribosomal protein transcripts, but are not found in PGC-1s transcripts. This suggests that the transcriptional regulation of PGC-1s could be an indirect process in response to LARP1 repression. Since LARP1 is also known to be regulated through promoter methylation(488), it is also possible that LARP1 does not act upstream of PGC-1s but in parallel, and that common epigenetic mechanism regulate all these genes in response to ER stress. While we are the first to reveal a positive correlation between LARP1 and PGC-1s in melanoma tumors, other teams have recently shown that LARP1 can modulate mitochondrial biogenesis(489-491). LARP1 knockout in K562 lymphoblastic cells appears to repress mitochondrial translation without impacting on mtDNA copy number, which supports a role in translation. Interestingly, LARP1 loss also affected the expression of nuclear-encoded mitochondrial proteins, but PGC-1s have not been examined in that study(491). Our LARP1 KD approach in human melanoma cells was growth suppressive (**Fig. 21B**) and reduced mitochondrial respiration (**Fig. 21C-E**). LARP1 KD had an unexpected impact on PGC-1s, mitochondrial and immune transcripts in melanoma cells (**Fig.21G**) which could not recapitulate the metabolic and immune signature associated with low LARP1 expression in melanoma tumors (**Fig.20A**). Interestingly, LARP1 KD lowered the expression of PGC-1 β and PRC-1 transcript but significantly induced the expression of PGC-1 α (**Fig. 21G**). PGC-1 α was also induced upon LARP1 KD in murine melanoma cells lines but not in murine

melanocyte (**Fig.21H-J**), which suggests a tumor and context-specific role for LARP1. The induction of PGC-1 α may explain the ambiguous impact of LARP1 on mitochondrial and immune transcripts. Additional in vitro experiments will be necessary to determine the microenvironmental and cellular factors that shape the role of LARP1 in melanoma cells. It will be particularly interesting to evaluate its role in conditions of mTOR inhibition, and how targeting LARP1 could potentiate the immune phenotype of low PGC-1-expressing cells. Further studies in vivo will be needed to determine how mTOR, LARP1 and PGC-1s control transcription and translation during tumour progression and how they can modulate tumor immunology and therapeutic response.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, [S.P.G.], upon reasonable request.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

CRediT authorship contribution statement

Katherine Coutu-Beaudry: Validation, Investigation, Writing – Original Draft, Visualization

Simon-Pierre Gravel: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – Original Draft, Writing – Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Acknowledgements

This work was supported by from the Cancer Research Society [Grant 840633, 2021]; and start-up funds from the Faculty of pharmacy of Université de Montréal. We are grateful to Caroline Thivierge for critical reading and comments on the manuscript.

2.3.6. Figure legends

Figure 17. The expression of PGC-1s transcripts correlates with multiple stress response pathways in human cutaneous melanoma.

A. Spearman's correlation between PGC-1s transcripts and genes from diverse stress response pathways in human cutaneous melanoma. Stress response pathways correspond to gene ontology (GO) pathways with a specified number of genes (above the bars). Gene expression is from the cutaneous melanoma RNA-seq dataset of PanCancer Atlas (The Cancer Genome Atlas). Correlating genes are indicated as % of total. Genes are stacked, from the most positive correlations to the most negative. Significance (p-values) are color-coded (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Grey indicates non-correlating transcripts (non-significant p-values, ns).

B. Correlation score of data in A. See Materials and methods for details on calculations. **C.** Gene expression in MeWo cells treated for 3 days with vehicle control (DMSO (0.1% v/v) or sterile water) or indicated drugs. Data are shown as mean+ SEM (N=3). One-Way ANOVA with comparison to appropriate vehicle control. # $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 18. Endoplasmic reticulum stress represses the expression of PGC-1s in melanoma cell lines.

A. Fold change in transcripts associated with the biological process Response to endoplasmic reticulum (ER) stress (Gene Ontology (GO):0034976) in human melanoma cells with low expression of PGC-1s versus tumors with high expression. Gene expression is from the Broad Cell Line Encyclopedia. High and low expression groups represent the highest and lowest quartiles, respectively. **B.** Venn diagram of significantly regulated genes from A. Significance threshold $p = 0.05$, Student's *t*-test (performed on fold change between high and low expression groups). **C.** Gene expression for the ER stress-associated transcripts that show the strongest fold change in low versus high PGC-1-expressing melanoma tumors from B. * $p < 0.05$, Student's *t*-test. **D.** Relative cell counts of human cell lines treated with various concentrations of thapsigargin for 72h. IC50 for thapsigargin in the tested cell lines is shown in the legend on the right. Data are shown as mean + SEM for MeWo cells (N=5). For the other cell lines, data are shown as mean (N=2). **E.** Relative

cell counts of MeWo cells treated with different ER stress inducers for 72h. Thapsigargin is the same as presented in D and is included for comparison purposes. Data are shown as mean + SEM (N=5 for Thapsigargin, N=4 for the other compounds). IC50 values for each drug are shown in the legend on the right. **F.** PGC-1 α transcript expression in MeWo cells treated with various concentrations of thapsigargin (TSG) for 72h. Data are shown as mean + SEM (N=3). * $p < 0.05$, One-Way ANOVA. **G.** PGC-1 β transcript expression in MeWo cells treated with various concentrations of thapsigargin (TSG) for 72h. Data are shown as mean + SEM (N=3). * $p < 0.05$, One-Way ANOVA. **H.** Oxygen consumption in MeWo cells treated with vehicle control or thapsigargin for 72h. Data are normalized for protein content. Data are shown as mean + SEM (N=5). **I.** Basal mitochondrial respiration of MeWo cells treated with vehicle control or thapsigargin for 72h (data from H). Data have been normalized for protein content. Non-mitochondrial respiration has been subtracted. Data are shown as mean + SEM (N=5). **J.** Maximal mitochondrial respiration of MeWo cells treated with vehicle control or thapsigargin for 72h (data from H). Data have been normalized for protein content. Non-mitochondrial respiration has been subtracted (see H). Data are shown as mean + SEM (N=5). **K.** Extracellular acidification rate (indirect assessment of glycolytic activity) of MeWo cells treated with vehicle control or thapsigargin for 72h (paired with data from H). Data have been normalized for protein content. Data are shown as mean + SEM (N=5). For I-K, * $p < 0.05$, Student's *t*-test.

Figure 19. LARP1 expression is altered by endoplasmic reticulum stress in melanoma.

A. Strategy to identify putative proteins that regulate the expression of PGC-1s under endoplasmic reticulum (ER) stress in melanoma. A transcript was associated with each protein known to be localized in the ER (Protein Atlas), and tested for correlation with PGC-1s or for differential expression in high or low PGC-1-expressing melanoma tumors (PanCancer Atlas RNA-seq dataset). **B.** (upper panel) Venn diagram of ER-localized proteins that significantly and positively correlate with PGC-1s and whose expression is reduced in low-PGC-1-expressing melanoma tumors. (lower panel) Gene functional classification of all significant genes. The number of genes per group is indicated in braces. **C.** (upper panel) Venn diagram of ER-localized proteins that significantly and negatively correlate with PGC-1s and whose expression is induced in low-PGC-1-expressing melanoma tumors. (lower panel) Gene functional classification of all significant

genes. The number of genes per group is indicated in braces. **D.** Expression level of PGC-1 α transcripts during an actinomycin D chase in MeWo cells. Data are shown as mean + SEM (N=3). **E.** Expression level of PGC-1 β transcripts during an actinomycin D chase in MeWo cells. Data are shown as mean + SEM (N=2- 6 depending on time points). **F.** Gene expression of 18 RNA-binding proteins that significantly correlate with PGC-1s or that are found to be linked to PGC-1s in CLIP-seq databases. MeWo cells were treated for 72h with DMSO (0.1% v/v) or thapsigargin (1 μ M). Data are shown as mean + SEM (N=4). # $p < 0.10$, * $p < 0.05$, Student's *t*-test. **G.** Immunoblotting of whole cell extracts from MeWo cells treated with thapsigargin (1 μ M) for 72h. The 150kDa LARP1 band is the longest isoform, the 130kDa is a truncated isoform. **H.** Gene expression in MeWo cells treated with the indicated vehicles or compounds for 72h. Data are shown as mean + SEM (N=2).

Figure 20. LARP1 expression level is linked to a mitochondrial immunometabolic switch in human and murine melanoma.

A. Heat-map representation of Spearman's correlations between LARP1 and mitochondrial or immune transcripts in human cutaneous melanoma (PanCancer Atlas). Mitochondrial proteins refer to transcripts encoding for proteins localized in mitochondria (MitoCarta 2.0). Immune refers to transcripts encoding pro-inflammatory or immunosuppressive proteins. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ are computed p values for Spearman's correlations. **B.** Gene functional classification of transcripts that significantly correlate positively with LARP1 in human cutaneous melanoma (PanCancer Atlas) (2818 transcripts, which represents $q < 0.05$). Only processes related to metabolism are shown (no process related to immune response was found). **C.** Gene functional classification of transcripts that significantly correlate negatively with LARP1 in human cutaneous melanoma (PanCancer Atlas) (2818 transcripts). Only processes related to immune response are shown (no process related to metabolism was found). **D.** Venn diagram of transcripts that correlate with LARP1 in human cutaneous melanoma (PanCancer Atlas) and those that encode for proteins localized in mitochondria (MitoCarta 2.0). Positively correlating transcripts with mitochondrial metabolic functions are particularly enriched. **E.** Expression of LARP1 transcript in melanoma tumors arising from mice treated with anti-mouse PD-L1 antibody (GEO accession: GSE172320). Data from PD-L1 antibody responders (n=26) and non-responders (n=23) are shown as box and

whiskers, with ** $p < 0.01$, Student's t -test. **F.** Spearman's correlation between LARP1 and immune or mitochondrial transcripts in murine melanoma tumors from E. ns: non-significant ($p \geq 0.05$), all other transcript show significant correlation.

Figure 21. LARP1 knockdown impacts on mitochondrial respiration and innate immune transcriptional response in melanoma cell lines.

A. Immunoblotting of whole cell extracts from MeWo cells treated with control non-targeting siRNA or LARP1 siRNA pool for 72h. The 150kDa LARP1 band is the longest isoform, the 130kDa is a truncated isoform. 3 independent experiments are included on the same gel. **B.** Relative cell count of MeWo cells treated with control non-targeting siRNA or LARP1 siRNA pool for 72h. Data are shown as mean + SEM. * $p < 0.05$, Student's t -test (N=3). **C.** Oxygen consumption in MeWo cells treated with control non-targeting siRNA or LARP1 siRNA pool for 72h. Data are normalized for protein content. Data are shown as mean + SEM (N=5). **D.** Basal mitochondrial respiration of MeWo cells treated with control non-targeting siRNA or LARP1 siRNA pool for 72h. Data have been normalized for protein content. Non-mitochondrial respiration has been subtracted. Data are shown as mean + SEM (N=5). **E.** Maximal mitochondrial respiration of MeWo cells treated with control non-targeting siRNA or LARP1 siRNA pool for 72h. Data have been normalized for protein content. Non-mitochondrial respiration has been subtracted (see C). Data are shown as mean + SEM (N=5). **F.** Extracellular acidification rate (indirect assessment of glycolytic activity) of MeWo cells treated with control non-targeting siRNA or LARP1 siRNA pool for 72h (paired with data from C). Data have been normalized for protein content. Data are shown as mean + SEM (N=5). For D-F, * $p < 0.05$, Student's t -test. **G.** Gene expression in MeWo cells treated with control non-targeting siRNA or LARP1 siRNA pool for 72h **H.** Gene expression in YUMMER1.7 cells treated with non-targeting siRNA or LARP1 siRNA pool for 72h. **I.** Gene expression in B16F10 cells treated with non-targeting siRNA or LARP1 siRNA pool for 72h. **J.** Gene expression in murine melanocytes treated with non-targeting siRNA or LARP1 siRNA pool for 72h. For G-J, data are shown as mean + SEM, with * $p < 0.05$, Student's t -test (N=3)

Figure 22. LARP1 ectopic expression provides minor advantages in melanoma cells under stressful conditions.

A. Gene expression in MeWo cells 3 days after infection with control lentiviral particles (empty vector) or encoding for human full-length LARP1. 250 and 500 refer to microliters of viral suspensions used for transduction. Data are shown as mean + SD (N=2). **B.** Gene expression in control (empty vector) and MeWo cells stably expressing human full-length LARP1 under puromycin selection. Data are shown as mean + SD (N=2). **C.** Gene expression in control (empty vector) and MeWo cells stably expressing human full-length LARP1 treated with DMSO vehicle (0.1% v/v) or thapsigargin (TSG, 1 μ M) for 72h. Data are shown as mean + SEM. * $p < 0.05$, Student's *t*-test (N=3). **D.** Relative cell counts of MeWo cells stably expressing human full-length LARP1 and treated with various concentrations of thapsigargin. IC50 values are shown in the legend in the right. Data are shown as mean (N=2). **E.** Relative viability of control (empty vector) and MeWo cells stably expressing human full-length LARP1 treated with vehicles (H₂O or DMSO 0.1% v/v) or indicated compounds for 72h. Data are shown as mean + SEM. # $p < 0.10$, * $p < 0.05$, Student's *t*-test (N=3).

Figure 17

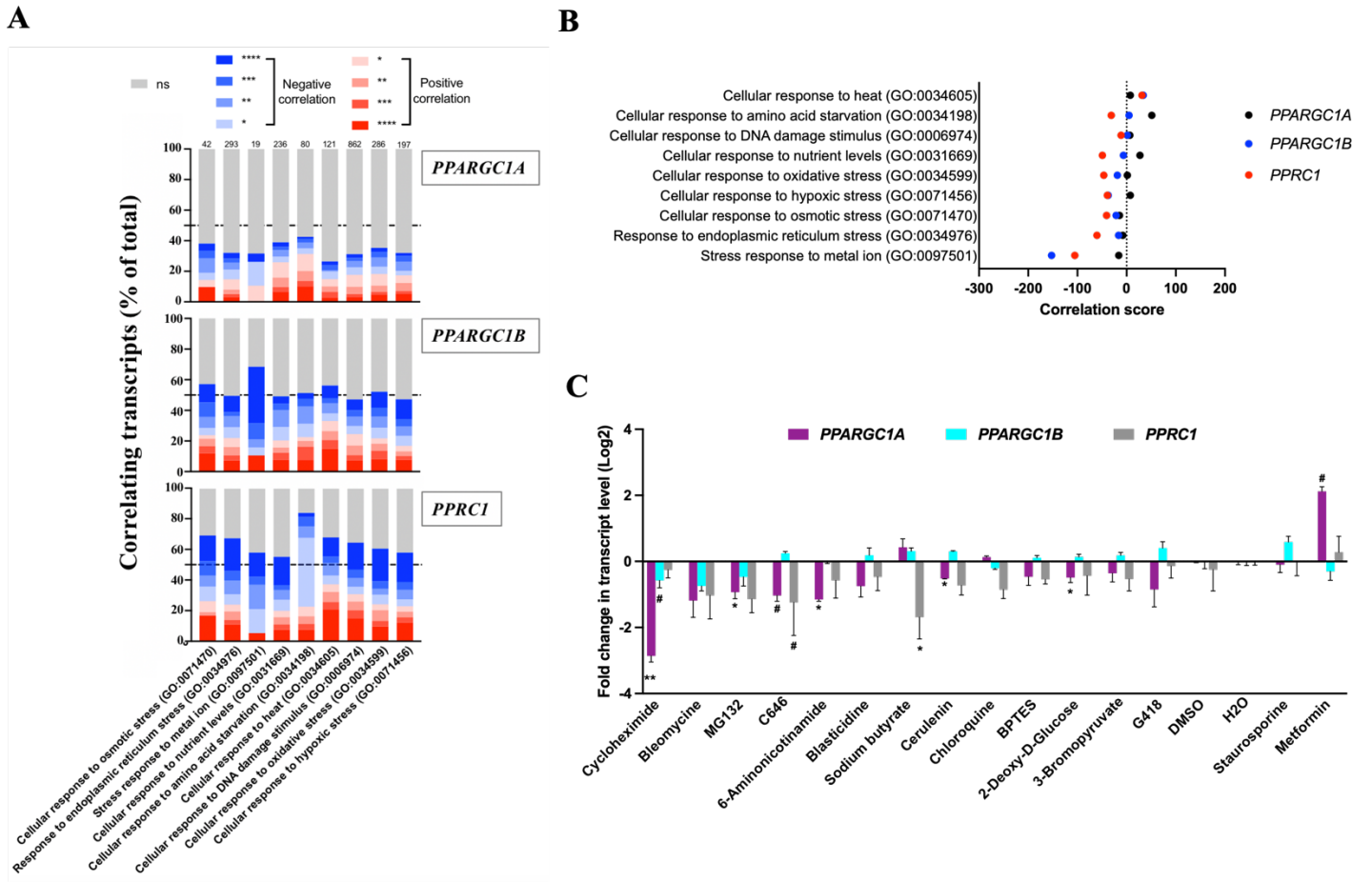


Figure 18

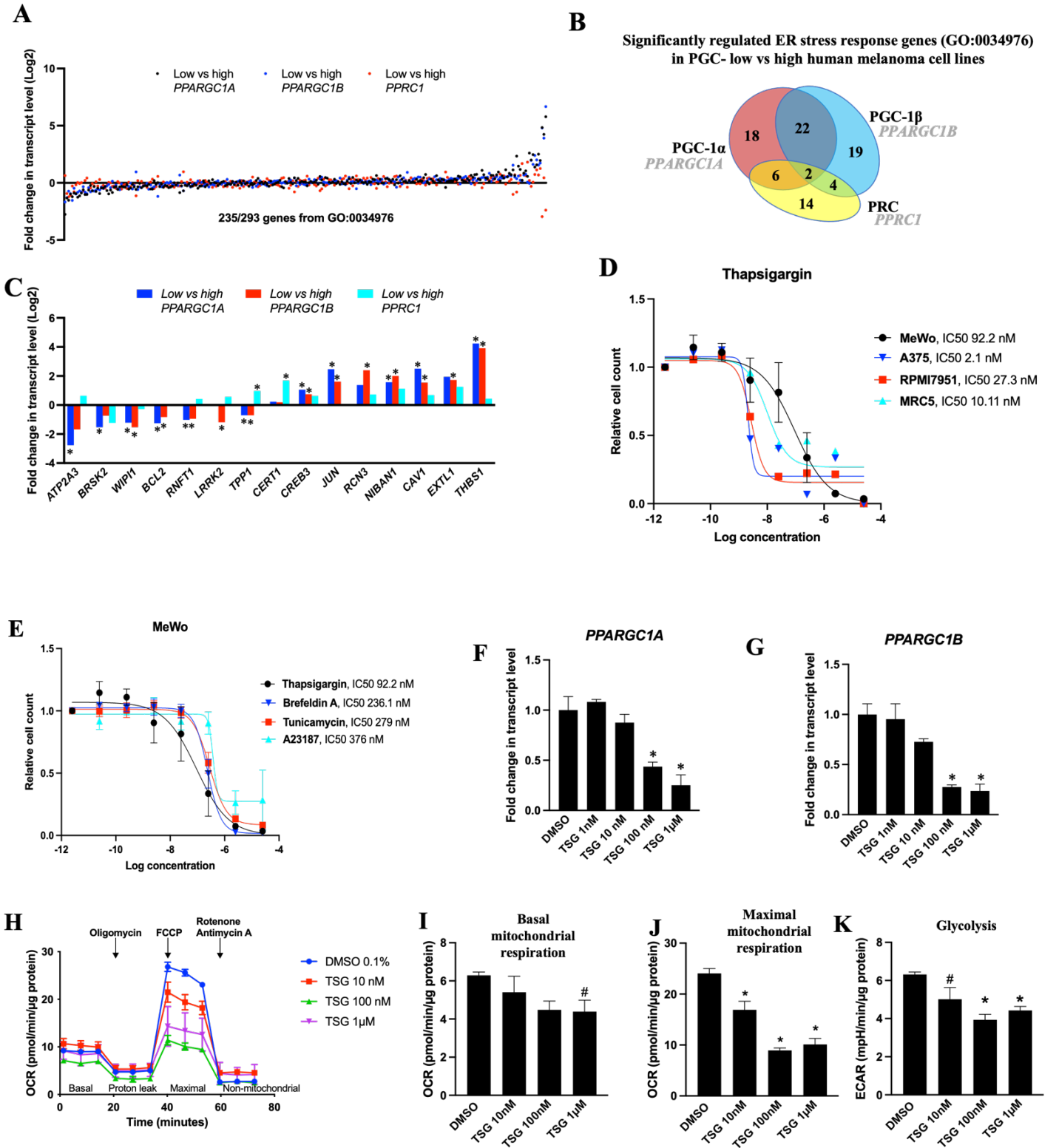


Figure 19

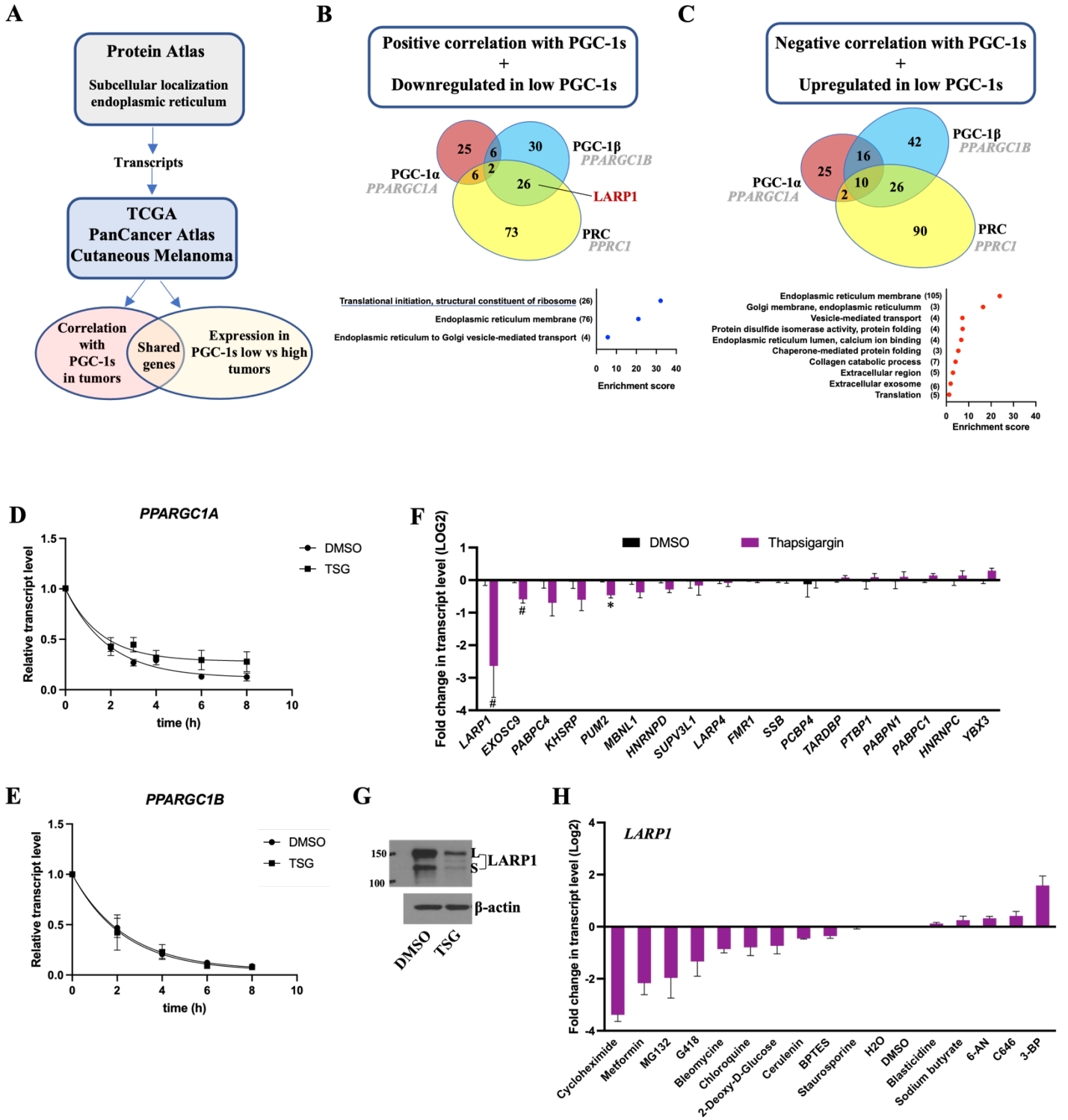


Figure 20

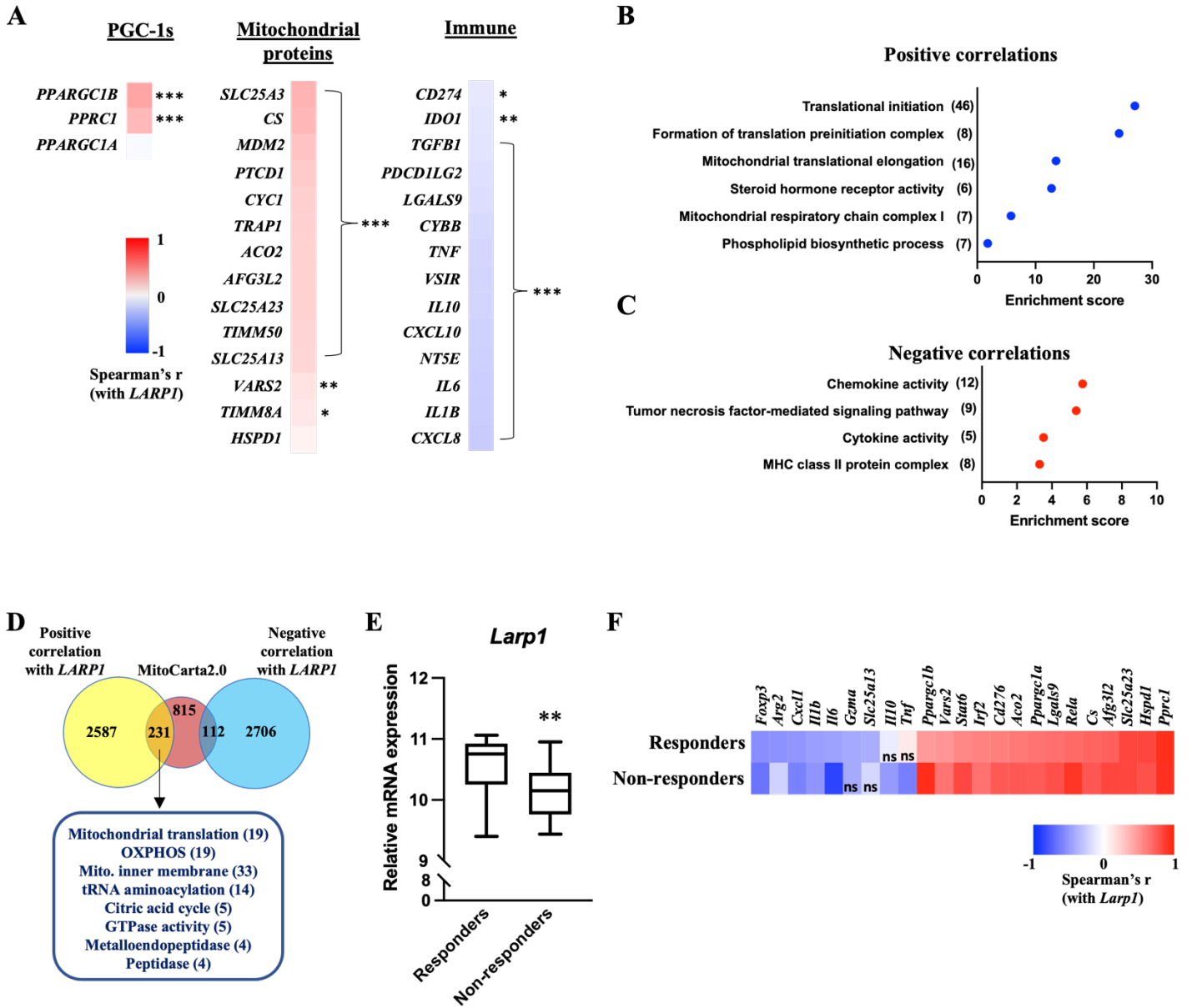


Figure 21

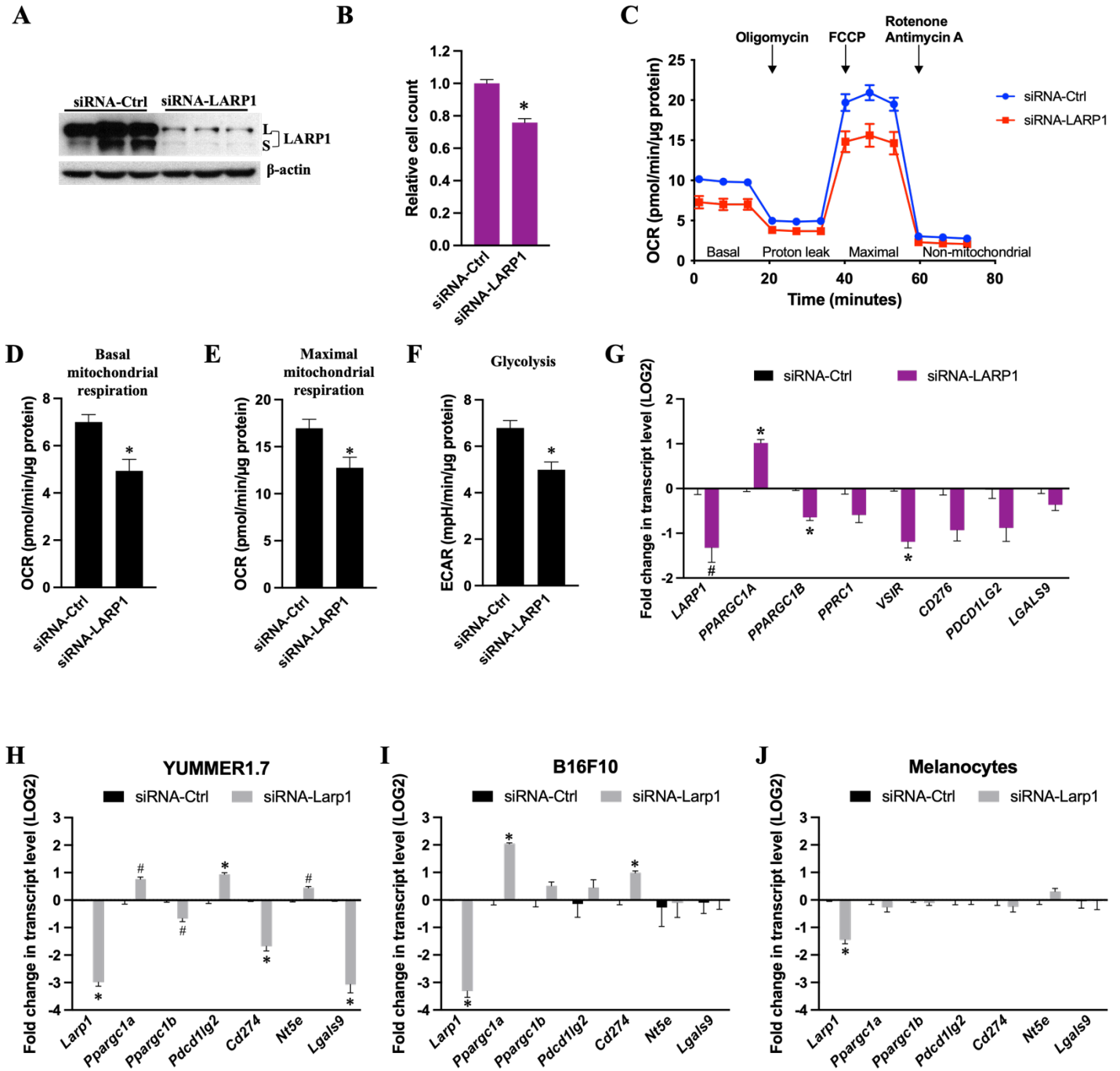
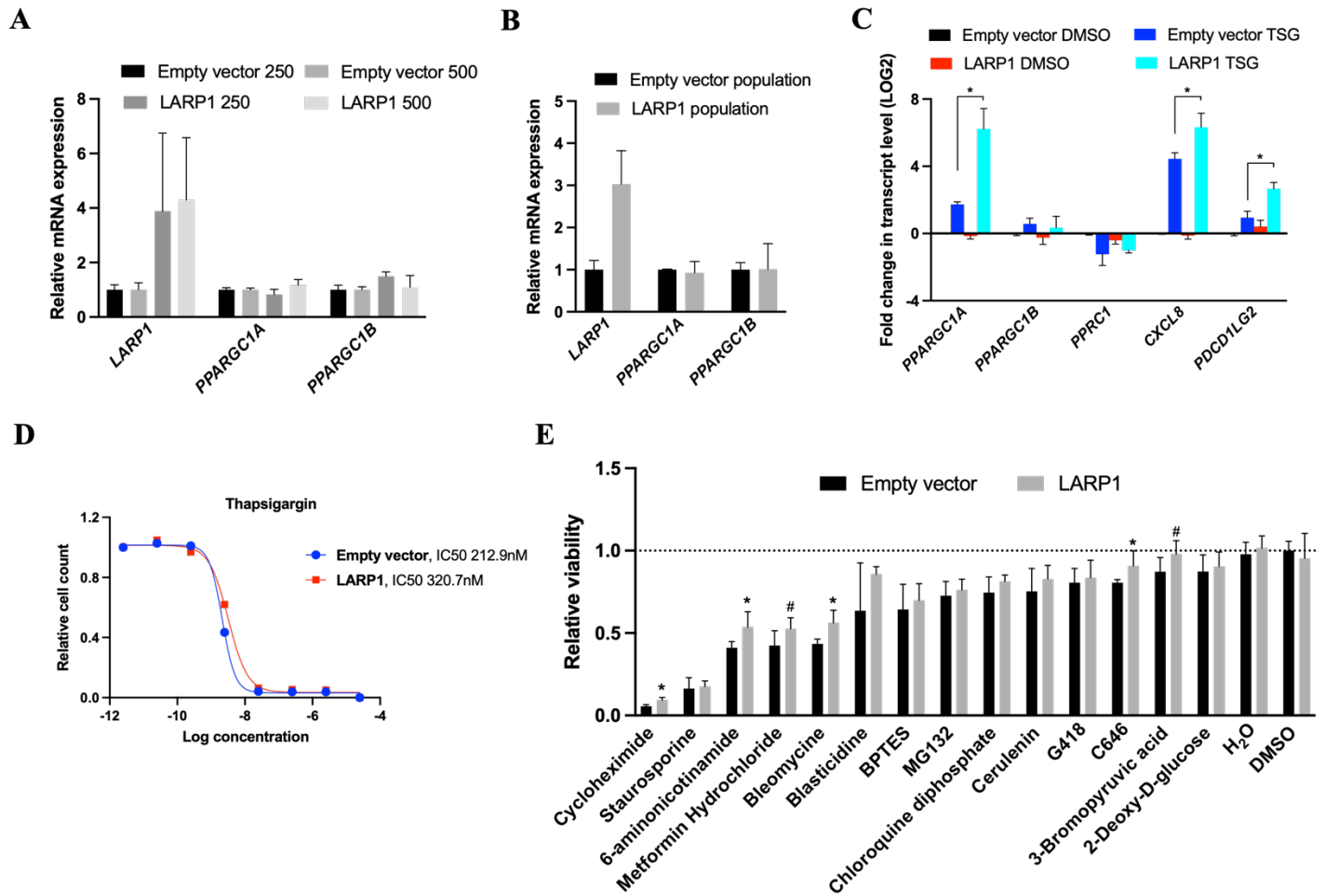


Figure 22



Chapitre III : Discussion

Chapitre III : Discussion

Importance de la mitochondrie dans le métabolisme des cellules cancéreuses et la réponse à l'immunothérapie

La reprogrammation métabolique, caractéristique importante des cellules cancéreuses, leur permet de survivre et de proliférer dans des endroits isolés et souvent mal perfusés du corps, donc dans un environnement appauvri en nutriments et en oxygène (426). L'effet Warburg, qui désigne la tendance des cellules cancéreuses à augmenter leur consommation de glucose et à favoriser la glycolyse (177), constitue un élément central de cette reprogrammation (voir section 1.4.1). Cependant, certains sous-types de cellules cancéreuses, notamment dans le mélanome, dépendent toujours d'un métabolisme mitochondrial oxydatif, ce qui favorise l'invasion, la métastase et la résistance à plusieurs thérapies, par exemple des inhibiteurs de kinase utilisés en thérapie pour cibler des mutations affectant la signalisation de AMPK (492). Ceci suggère l'implication des mitochondries dans la réponse à différents stress cellulaires. De plus, la mitochondrie est un important régulateur du métabolisme cellulaire, ce qui nous amène à penser que la mitochondrie pourrait également jouer un rôle dans la réponse à l'immunothérapie.

Afin d'identifier les principaux régulateurs du métabolisme mitochondrial dans le cancer, nous avons interrogé des bases de données de séquençage d'ARN du Cancer Genome Atlas (TCGA). Les PGC-1s apparaissent comme un marqueur important du métabolisme mitochondrial et leur expression varie grandement entre les différentes tumeurs, ce qui est caractérisé par un coefficient de variation élevé ($CV_{PPARGC1A}$: 148.5, $CV_{PPARGC1B}$: 100.2, CV_{PPRC1} : 39.9) (**Fig. 9A**). Nous nous sommes ensuite intéressés à la corrélation entre l'expression du transcrite des différents PGC-1s et celle de transcrits encodant pour 1158 protéines mitochondriales. Parmi celles-ci, 587 corrélaient positivement avec l'expression des PGC-1s (**Fig. 9B**).

Description d'une « switch » immuno-métabolique activée par les PGC-1s et qui participe à l'inflammation et l'immunosuppression dans le mélanome

Enfin, pour mieux caractériser la fonction des PGC-1s dans le mélanome, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle des gènes identifiés par le CGA comme corrélant significativement avec les PGC-1s. Ces analyses révèlent que l'expression des PGC-1s corrèle de façon positive avec des gènes du métabolisme et de la biogenèse mitochondriale et corrèle de façon négative avec des gènes encodant pour des chimiokines, des cytokines et des molécules de cosignalisation immunosuppressives ainsi que des métalloprotéinases (**Fig. 9C**). Une analyse approfondie des facteurs de transcription régulant la fonction mitochondriale et dont l'expression corrèle fortement avec celle de transcrits immunosuppresseurs et pro-inflammatoires montre que les tumeurs qui expriment le moins les PGC-1s sont immunosuppressives et pro-inflammatoires, ce qui est caractérisé par une induction notamment de IDO1, PDCD1LG2 et de VISIR ainsi que par la relâche de cytokines telles que IL-6 et TNF (**Fig. 9D-E**). Ceci suggère qu'une déplétion des PGC-1s peut engendrer une dysfonction mitochondriale provoquant une réponse inflammatoire. Comme décrit à la section 1.5.3, l'inflammation peut réguler la réponse immunitaire de manière à influencer le développement du cancer de manière positive ou négative.

La mitochondrie est la principale source de ROS. L'accumulation de ROS engendre un stress oxydatif important et ce phénomène est exacerbé lors d'une dysfonction mitochondriale selon un cycle vicieux dommageable (voir les sections 1.5.3 et 1.8.4.3). Les ROS sont souvent considérés comme des résidus nuisibles, mais ce sont également de précieux messagers impliqués dans l'immunité innée et adaptative ainsi que dans la détection de signaux de danger et l'activation de l'inflammasome. L'inflammasome regroupe plusieurs complexes protéiques cytoplasmiques activés par des récepteurs de type NLR (voir section 1.7) en réponse à des signaux de danger associés à une infection par un pathogène (PAMP) ou à des dommages cellulaires (DAMP) (493). Un exemple d'un tel signal est la relâche d'ADN mitochondrial au niveau du cytosol (494). Ce processus fait intervenir des ROS mitochondriaux afin d'oxyder et de stabiliser l'ADN mitochondrial, ce qui facilite la liaison de la cryopyrine (NLRP3) (495). Les ROS endommagent également

les mitochondries, qui produisent alors davantage de ROS, engendrant ainsi un cercle vicieux contribuant à l'activation de l'inflammasome. L'isoforme 2 de la NADPH oxydase (NOX2) représente également une source importante des ROS puisqu'elle catalyse l'oxydation du NADPH en NADP^+ et transfère les électrons du NADPH à l'oxygène moléculaire (O_2), ce qui produit un ion superoxyde (O_2^-) (496) pouvant être converti en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD). Finalement, un dérèglement de l'ETC (497) ou de la mitophagie (302), qui permet d'éliminer les mitochondries endommagées, induit également la production de ROS pouvant activer l'inflammasome.

Les ROS ainsi produits sont détectés par la thiorédoxine (TRX), une oxydoréductase qui facilite la réduction de protéines oxydées. La forme réduite de TRX forme un pont disulfure avec la forme oxydée de la protéine interagissant avec la thiorédoxine (TXNIP) (498). Les ROS permettent à TXNIP de se dissocier de TRX afin d'interagir avec NLRP3. Ceci active NLRP3 qui induit la caspase-3 ainsi que la sécrétion des formes actives des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (499). D'autres signaux de dommages mitochondriaux, par exemple la relâche d'ATP par les cellules nécrotiques ou la cardiolipine, un phospholipide retrouvé dans la membrane interne des mitochondries et relâché lors de l'apoptose, peuvent aussi induire NLRP3 (500) et activer l'inflammasome. Les lipopolysaccharides (LPS), principaux constituants de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, sont reconnus par les caspases et peuvent activer l'inflammasome (501). Ceci induit une mort cellulaire inflammatoire qualifiée de pyroptose. Dans ce processus, la cascade de caspases participe à la maturation de protéines de la famille de la gasdermine. Celles-ci engendrent la formation de pores provoquant la rupture des membranes et la relâche de cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1 β et IL-18, dans l'espace extracellulaire (502). Les cellules infectées gonflent et éclatent, ce qui facilite le recrutement de macrophages et de neutrophiles (503) au site d'infection afin de détruire le pathogène. À cet effet, les sérines protéases sécrétées par les neutrophiles, ainsi que la caspase-1 exprimée par les monocytes circulants, permettent de cliver le précurseur d'IL-1 β afin de sécréter la forme active de la cytokine. La sécrétion d'IL-1 β est finement régulée par l'activité de la caspase-1 (504), induite lorsque l'ouverture de canaux potassiques fait chuter les niveaux de potassium intracellulaire.

En plus de leur rôle dans la détection des signaux de danger et l'activation de l'inflammasome, les ROS participent à la réponse anti-bactérienne et anti-virale. En effet, les PAMPs bactériens activent des récepteurs de type Toll (TLR) (505), qui font partie de la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR). Une fois activés, TLR-1, TLR-2 et TLR-4 interagissent avec le facteur 6 associé au récepteur TNF (TRAF6), ce qui promeut la translocation de ce dernier vers la mitochondrie. TRAF6 interagit alors avec l'intermédiaire évolutivement conservé dans la voie Toll (ECSIT), ce qui induit la production de ROS mitochondriaux (506) et l'expression de cytokines inflammatoires, notamment $\text{INF}\gamma$. Ce dernier promeut l'activation des macrophages selon un mécanisme encore mal compris qui pourrait impliquer l'activation de $\text{ERR}\alpha$ et de $\text{PGC-1}\beta$ en réponse à l'IL-4 afin d'induire un programme transcriptionnel favorisant un métabolisme oxydatif et la reprogrammation métabolique des macrophages vers un profil anti-inflammatoire réparateur (232). Ces observations illustrent bien le rôle de la dysfonction mitochondriale et des ROS dans l'inflammation et l'immunité innée.

Rôle de l'inflammation dans l'immunosuppression du TME et la réponse à l'immunothérapie

L'inflammation est également intimement liée à l'immunosuppression dans le cancer. En effet, l'inflammation est un mécanisme naturel de défense du corps pour combattre les infections et réparer certains dommages à l'organisme. Cependant, dans le cancer en général, et le mélanome en particulier, l'inflammation exerce des effets complexes et parfois contradictoires. Bien que l'inflammation puisse activer une réponse immunitaire antitumorale, elle peut également activer la libération de cytokines générant un environnement immunosuppresseur propice à la métastase et à la résistance au traitement (voir section 1.5.3).

L'immunothérapie vise à rétablir la réponse immunitaire anti-tumorale en ciblant, grâce à des anticorps, les points de contrôle immunitaire, notamment PD-1, CTLA-4 et PD-L1, exprimées par les lymphocytes T, les cellules tumorales et les APC (voir section 1.3.7.3).

Les points de contrôle immunitaire consistent en des récepteurs qui émettent des signaux inhibiteurs afin d'empêcher la suractivation du système immunitaire et l'auto-immunité. Dans le cancer, cependant, l'expression de ces récepteurs est dérégulée, et les tumeurs surexpriment souvent PD-L1 afin d'induire la signalisation PD-1 et inhiber l'activité des lymphocytes T. Les anticorps anti-PD-1/PD-1, la forme d'immunothérapie la plus efficace d'immunothérapie, a déjà été approuvée pour le traitement de cancers des poumons, du foie, de la vessie, du rein et de la peau (507). Le taux de réponse à l'immunothérapie varie cependant grandement en fonction de l'expression de PD-L1, du CMH de classe I et de l'interféron. L' $\text{INF}\gamma$ est sécrété par les lymphocytes T et les cellules NK en réponse à une stimulation par des cytokines inflammatoires telles que IL-12 (508) et IL-18 (509) dans le cadre de la réponse immunitaire innée. L' $\text{INF}\gamma$ active les Janus kinase 1 et 2 (JAK1/2) qui phosphorylent STAT1. Ce dernier migre alors au noyau afin d'induire la transcription de gènes de la réponse immunitaire tels que des molécules présentatrices d'antigènes (CMH), des facteurs de transcription (IRF), ainsi que facteurs antibactériens et antiviraux en plus de réguler le cycle cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse. L' $\text{INF}\gamma$ est un suppresseur de tumeur participant à la réponse anti-tumorale de l'immunothérapie. D'ailleurs, les patients dont le mélanome résiste à l'immunothérapie présentent souvent des mutations au niveau du récepteur de l' $\text{INF}\gamma$ ou d'autres mutations ayant un impact délétère sur la présentation antigénique régulée par l' $\text{INF}\gamma$.

Mis ensemble, ces observations suggèrent un rôle des PGC-1s dans la fonction mitochondriale, laquelle exerce des effets dans l'immunosuppression et la réponse inflammatoire. La réponse immunosuppressive et inflammatoire peut être exploitée en clinique pour sensibiliser le mélanome à l'immunothérapie. Ce projet est structuré en deux volets. Le premier consiste à étudier le rôle d'une déplétion en PGC-1 β dans la mise en place d'un programme transcriptionnel pro-inflammatoire et immunosuppresseur dans le mélanome, alors que le second volet se penche sur la régulation de PGC-1 β en situation de stress cellulaire ainsi que son rôle dans l'immunosuppression et l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses en situation de stress.

Exploration du rôle des PGC-1s dans la mise en place d'un programme transcriptionnel pro-inflammatoire et immunosuppresseur favorisant la résistance à l'immunothérapie

Puisque les PGC-1s corrélaient avec plusieurs molécules immunosuppressives, nous avons exploré le rôle des PGC-1s dans la mise en place d'un programme transcriptionnel immunosuppresseur pouvant altérer la réponse à l'immunothérapie. L'analyse de données de transcriptomique de mélanome murin (GSE172320) révèle que les tumeurs résistantes aux inhibiteurs de PD-L1 expriment peu PGC-1 β et PRC sans affecter l'expression de PGC-1 α (**Fig. 9F**). Dans ces tumeurs, PGC-1 β corréle négativement avec des transcrits immunosuppresseurs, notamment *Foxp3*, *Il10* et *Pdcd1lg2*, ainsi que des cytokines inflammatoires telles que *Cxcl1*, *Il1b*, *Il6* et *Tnf* (**Fig. 9G**). Autrement dit, les tumeurs résistantes à l'immunothérapie expriment peu PGC-1 β et sont immunosuppressives et pro-inflammatoires. Ceci suggère un rôle de PGC-1 β dans la mise en place d'une réponse inflammatoire activant un programme transcriptionnel immunosuppresseur diminuant la réponse aux inhibiteurs de PD-L1.

Bien que l'expression des deux varie dans le mélanome, suggérant qu'ils peuvent être modulés suivant certains contextes et interventions, l'expression de PGC-1 β est légèrement moins variable que celle de PGC-1 α . Ceci suggère que l'expression de PGC-1 β n'est pas exclusive à certains sous-groupes de mélanome. Ainsi, la suite des travaux présentés ici se concentre particulièrement sur PGC-1 β . Nous avons comparé l'expression des PGC-1s dans plusieurs lignées humaines de mélanome tirées du Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE), puis avons identifié deux lignées exprimant peu les PGC-1s (SKMEL28 et A375) ainsi que deux lignées exprimant fortement les PGC-1s (MeWo et SKMEL5).

Un traitement par ARN interférence dirigé contre PGC-1 β diminue de façon significative l'expression de ce dernier (**Fig. 11A**) de manière dépendante de la dose (**Fig. 11B**), ce qui s'accompagne d'une induction de transcrits immunosuppresseurs tels que LGALS9, NT5E et PDCD1LG2, ainsi que de cytokines inflammatoires, particulièrement CXCL8 et TNF (**Fig. 11A**). Les MeWo, qui expriment fortement PGC-1 α (330), se sont révélées

particulièrement intéressantes puisqu'elles présentent une forte dichotomie entre les fonctions mitochondriales et l'immunosuppression (**Fig. 10D**). Cette lignée génère par ailleurs la plus forte réponse inflammatoire, caractérisée par l'induction de *CXCL8*, de toutes les lignées étudiées. Ceci suggère que les cellules qui expriment fortement PGC-1 α dépendent de leur fonction mitochondriale afin de favoriser un métabolisme oxydatif, ce qui les rend particulièrement sensibles à une déplétion de PGC-1 β . Par conséquent, c'est cette lignée que nous avons exploitée pour la suite des travaux. Dans les MeWo, la déplétion en PGC-1 β induit la relâche de cytokines pro-inflammatoires telles que MCP-1, IL-6 et IL-8 (**Fig. 11C-D**) en plus d'induire la protéine de surface immunosuppressive Galectine-9 (**Fig. 11E**), encodée par le gène *LGALS9* chez l'humain. Ces résultats appuient le rôle de la déplétion en PGC-1 β dans l'immunosuppression du mélanome.

L'IL-8 est une chimiokine produite par plusieurs types de cellules, dont les kératinocytes et les monocytes. En réponse à différents stimuli inflammatoires, IL-8 lie les récepteurs des chimiokines CXC (CXCR) 1 et 2, ce qui permet le recrutement de neutrophiles, de basophiles et de lymphocytes. La surexpression d'IL-8 par les kératinocytes contribue au développement de certaines maladies inflammatoires de la peau, notamment le psoriasis et l'eczéma (510, 511). D'un autre côté, IL-8 peut également favoriser le recrutement des kératinocytes et ainsi contribuer à la cicatrisation (510, 512). L'expression d'IL-8 dans le TME corrèle avec la formation de pièges extracellulaires des neutrophiles (NET) (513). Ces derniers sont produits en réponse à des signaux de dangers (DAMP, voir section 1.5.1) ou d'autres signaux infectieux. Ils contiennent du matériel génétique provenant des neutrophiles granulocytes ainsi que des histones et des peptides antimicrobiens. Les NET emprisonnent les bactéries et les Fungi puis libèrent des ROS ainsi que des granules contenant des facteurs antimicrobiens (514). Avec la phagocytose, les facteurs libérés par les NET permettent d'éliminer les pathogènes (515). Les NET occupent donc une place importante dans l'immunité innée. Outre leur rôle dans la réponse immunitaire, les NET jouent un rôle dans le diabète (516, 517), l'athérosclérose (518), certains troubles de la coagulation (519), l'arthrite rhumatoïde, la fibrose kystique (520, 521) et le lupus érythémateux (522). Plus récemment, certaines études ont révélé un rôle des NET dans l'immunoédition et la progression du cancer de même que la métastase. En effet, les MMP

que contiennent les NET dégradent la matrice extracellulaire et les NET peuvent agir comme substrat permettant l'adhésion des cellules cancéreuses. Tout ceci favorise le caractère invasif des tumeurs (523). À l'inverse, d'autres composantes des NET, par exemple des peroxydases, des protéinases ou des histones, provoquent une cytotoxicité affectant particulièrement les cellules épithéliales et empêchant la croissance tumorale (524). L'induction d'IL-8 combinée à la déplétion de PGC-1 β pourrait favoriser le recrutement de neutrophiles au site tumoral et dérouter la réponse immunitaire de manière à favoriser la métastase et la progression tumorale.

La déplétion en PGC-1 β est anti-proliférative et corrèle avec un arrêt du cycle cellulaire à un point de contrôle compatible avec des dommages mitochondriaux

Un traitement par ARN interférence dirigé contre PGC-1 β diminue la prolifération de lignées cellulaires de mélanome en culture (**Fig. 12A**) indépendamment du niveau d'expression de PGC-1 α et l'effet perdure jusqu'à huit jours (**Fig. 12B**). La tendance observée est la même tant dans les SKMEL28 et les A375, qui expriment peu PGC-1 α , que dans les MeWo et les SKMEL5, qui expriment fortement PGC-1 α , ce qui suggère que l'effet antiprolifératif de la déplétion en PGC-1 β est indépendant de PGC-1 α . L'effet antiprolifératif observé est marqué, avec une diminution de près de moitié selon la lignée, et ce malgré une déplétion parfois modeste de PGC-1 β (**Fig. 11A**). Ces résultats suggèrent un rôle spécifique de PGC-1 β dans la prolifération des cellules de mélanome qui ne peut pas être comblé par PGC-1 α . L'effet antiprolifératif de la déplétion en PGC-1 β peut s'expliquer soit par une augmentation de la mort cellulaire, soit par un arrêt du cycle cellulaire. Un essai de prolifération réalisée avec les mêmes lignées de cellules de mélanome mentionnées plus haut (voir Figure 12), montre que la déplétion en PGC-1 β n'augmente pas la mortalité de façon significative. Plutôt, un essai de cytométrie en flux montre que la déplétion en PGC-1 β provoque un arrêt du cycle cellulaire en G2/M et une diminution du nombre de cellules au point G0/G1 (**Fig. 12C-D**). Le passage d'une phase à l'autre du cycle cellulaire est finement régulé par l'expression et l'activation successives de cyclines et de CDK spécifiques pouvant être inhibées par P-21 (voir les sections 1.3.6 et 1.3.7.2). Des dommages à l'ADN activent des points de contrôle arrêtant

momentanément le cycle cellulaire dans le but de permettre à la cellule de réparer les dommages. Si les dommages sont trop importants, la cellule meurt par nécrose ou apoptose. L'arrêt du cycle cellulaire peut être médié par P-53, P-21 et les CDK (525). P-53 est un maître régulateur qui induit l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ou dans la réparation des dommages à l'ADN, de même que des gènes induisant l'apoptose ou la nécrose lorsque P-53 détecte des dommages cellulaires (526). Le stress oxydatif, notamment provoqué par une augmentation de la production de ROS par des mitochondries dysfonctionnelles ou endommagées, induit l'activation de P-53, qui migre alors au niveau de la matrice et de la membrane externe mitochondriale (527). P-53 se lie alors à sa cible P-21 et l'active. P-21 empêche la phosphorylation et inhibe l'activité kinase de CDK1 et CDK2 ce qui prévient l'entrée en mitose et bloque les cellules à la phase G2 du cycle cellulaire (528, 529). Ainsi, l'arrêt du cycle cellulaire observé lors de la déplétion de PGC-1 β pourrait correspondre à un point de contrôle régulé par les dommages à l'ADN mitochondrial et faisant intervenir P-21. Étant donné le rôle des PGC-1s dans la régulation de l'OXPLOS et de la biogenèse mitochondriale, nous avons exploré l'hypothèse selon laquelle la déplétion en PGC-1 β engendrerait une dysfonction mitochondriale pouvant activer une réponse inflammatoire et immunosuppressive influençant la réponse à l'immunothérapie.

Parmi les dix transcrits encodant pour des protéines mitochondriales dont l'expression corrèle le plus fortement avec les PGC-1s, la déplétion en PGC-1 β diminue de manière significative l'expression des transcrits de HSPA9 et de AFG3L2, ainsi que SLC25A13 (**Fig. 13A**). La diminution de l'expression du transcrit de HSPA9 se reflète également au niveau de la protéine (**Fig. 13B**). Nous avons ensuite voulu savoir si HSPA9 pouvait être impliqué dans l'effet de la déplétion en PGC-1 β sur le métabolisme et l'immunosuppression du mélanome. Un traitement par ARN interférence dans des cellules MeWo diminue l'expression de HSPA9 (**Fig. 13C**) et exerce des effets anti-prolifératifs (**Fig. 13D**) évoquant les effets observés lors de la déplétion en PGC-1 β .

La déplétion en PGC-1 β corrèle avec la diminution de l'expression du transcrit codant pour la protéine mitochondriale HSPA9 qui supporte le rôle de PGC-1 β dans la reprogrammation métabolique du mélanome

Tant la déplétion de PGC-1 β que de HSPA9 diminuent la respiration maximale, la respiration mitochondriale et l'acidification extracellulaire (**Fig. 13E-G**). Les cellules assurent leurs besoins énergétiques principalement par l'O₂PHOS et la glycolyse. Dans la mitochondrie, l'O₂PHOS permet, comme décrit plus haut, de réduire l'oxygène sous forme de molécule d'eau, ce qui génère un gradient électrochimique qui alimente la production d'ATP. Plus le métabolisme mitochondrial est sollicité, plus la consommation d'oxygène (OCR) est importante, et cette dernière peut être mesurée par un essai « *Seahorse* ». Un tel essai utilise différents composés qui inhibent chacun un complexe de la chaîne de transport des électrons puis mesure la consommation d'oxygène et l'acidification du milieu extracellulaire afin d'étudier les principales voies métaboliques des cellules. Le *Seahorse* permet d'étudier la dépendance des cellules envers l'O₂PHOS ou la glycolyse et de déterminer les capacités d'adaptation des cellules en situation de stress métabolique. Tant la déplétion de PGC-1 β que de HSPA9 diminuent la respiration mitochondriale basale (**Fig. 13F**) et maximale (**Fig. 13E**), ce qui suggère que la déplétion en PGC-1 β engendre une dysfonction mitochondriale qui pourrait être médiée par HSPA9.

La glycolyse est également largement utilisée pour la production d'ATP. Elle consiste à fermenter le pyruvate formé lors de la dégradation du glucose sous forme d'acide lactique. Ce processus libère des protons sous forme de H⁺ provenant du NADPH (530), ce qui contribue largement à l'acidification du milieu extracellulaire (ECAR). Ce paramètre peut également être mesuré et représente la capacité glycolytique des cellules. Cependant, d'autres processus métaboliques, notamment le CAC, peuvent altérer l'ECAR. En effet, le CAC produit du dioxyde de carbone (CO₂) pouvant être converti en ion bicarbonate (HCOO⁻) et ainsi également contribuer à l'acidification du milieu (531). Soulignons que l'ECAR basal est très faible, à moins de 10 mpH/min, et ce même dans les cellules « contrôles ». En effet, on recommande de travailler à une confluence suffisante pour obtenir un ECAR supérieur à 20 mpH/min afin de respecter la linéarité de l'augmentation

de l'ECAR (532). Bien sûr, la méthode de normalisation influence beaucoup l'interprétation des résultats. Nous avons choisi de normaliser par rapport à la quantité de protéines plutôt que le nombre de cellules et notre expérience nous a appris que les MeWo sont de grosses cellules avec un petit cytoplasme par rapport à leur taille qui produit peu de protéines. Cependant, d'autres groupes ont également montré que les cellules de mélanome en général, et les MeWo en particulier, ont un ECAR basal très bas, entre 5 et 10 mpH/min et, dans les MeWo, l'ECAR ne semble pas être affecté par la privation de glucose (533, 534). Par opposition, les A449, reconnues pour favoriser la glycolyse, ont un ECAR basal de près de 50 mpH/min (531, 535). Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par d'autres groupes et suggèrent que les cellules de mélanome MeWo dépendent très peu de la glycolyse, mais plutôt d'un métabolisme mitochondrial oxydatif (OXPHOS). Toutefois, les cellules cancéreuses sont flexibles et ont la capacité d'adapter leur métabolisme au contexte bioénergétique du TME afin de continuer à soutenir leur prolifération rapide, leur croissance et leur survie.

En effet, les cellules cancéreuses ont un métabolisme élevé, ce qui nécessite une importante production d'ATP pour assurer leurs besoins énergétiques ainsi que la biosynthèse de macromolécules qui supportent ces voies métaboliques (408). De plus, les concentrations de glucose, de glutamine et d'oxygène varient dans le temps à l'intérieur d'une même tumeur (536), ce qui constitue également une source de stress contribuant au remodelage métabolique des cellules cancéreuses. Ainsi, certains oncogènes, notamment HIF-1 α , induisent l'expression de transporteurs de glucose et d'enzymes de la glycolyse, ce qui promeut la fermentation du pyruvate en acide lactique au détriment du CAC. D'un autre côté, certains sous-groupes de cellules cancéreuses continuent de dépendre de la respiration mitochondriale pour maintenir leur métabolisme bioénergétique. Cependant, une OXPHOS importante, une dérégulation de la mitophagie, des dommages mitochondriaux ou une diminution des défenses antioxydantes engendrent la production de ROS et un stress oxydatif, ce qui stabilise HIF-1 α et induit la glycolyse (537) indépendamment de l'hypoxie.

Tant la déplétion de PGC-1 β que de HSPA9 diminuent l'ECAR, ce qui signifie que les cellules déplétées en PGC-1 β ne peuvent induire la glycolyse en réponse à l'inhibition de

l'OXPHOS, ce qui suggère un rôle de PGC-1 β dans la dysfonction mitochondriale et l'adaptation métabolique du mélanome qui serait soutenu par HSPA9. Cependant, la déplétion de HSPA9, contrairement à la déplétion en PGC-1 β (**Fig. 11A**), induit uniquement l'expression de *PDCD1LG2* (**Fig. 13H**), ce qui suggère que HSPA9 n'est pas impliqué dans l'immunosuppression engendrée par la déplétion de PGC-1 β .

Les facteurs de transcription de la signalisation STAT et de la voie des IRF contribuent au rôle de la déplétion de PGC-1 β

Une approche de criblage utilisant plusieurs composés inhibant différentes kinases telles que MEK1/2, JNK, Akt, mTOR et BRAF ainsi que quelques inhibiteurs du complexe de la kinase I κ B (IKK) a été développée. Cette approche a permis d'identifier les signalisations cellulaires impliquées dans l'inflammation et l'immunosuppression médiées par la déplétion de PGC-1 β . IKK est composé de deux sous-unités à activité kinase, soit les sous-unités alpha et bêta de l'inhibiteur de la kinase du facteur nucléaire kappa-B (IKK- α/β) et une sous-unité régulatrice nommée régulateur essentiel de NF- κ B (NEMO). NF- κ B est un dimère composé des sous-unités p50, p52, p65, c-Rel ou RelB, la forme la plus commune étant l'hétérodimère p65/p50. IKK- β phosphoryle l'inhibiteur de NF- κ B (I κ B), ce qui permet la dégradation de ce dernier par ubiquitination et permet au dimère NF- κ B, par exemple constitué des sous-unités p65 et p50, de transloquer au noyau et de se lier au promoteur de gènes cibles (538). Deux inhibiteurs des kinases MEK1/2, tramétinib et AZD6244, empêchent l'induction de *CXCL8* (**Fig. 14A**) et de *LGALS9* (**Fig. 14B**) observée lors de la déplétion de PGC-1 β . Tramétinib empêche également l'induction de *NT5E* et d'*IL1B*. Un inhibiteur de IKK- β , BI605906, empêche l'induction de *CXCL8* et d'*IL1B* observée lors de la déplétion de PGC-1 β , bien qu'il n'ait aucun impact significatif sur l'expression de transcrits immunosuppresseurs tels que *LGALS9* et *NT5E* (**Fig. 14C**). Ensemble, ces résultats suggèrent que MEK1/2 et IKK- β jouent un rôle dans l'inflammation et l'immunosuppression engendrée par la déplétion de PGC-1 β .

Nous nous sommes ensuite intéressés aux sites de liaison présents au niveau de plusieurs transcrits dont l'expression corrèle avec une diminution de la biogenèse mitochondriale.

Ces transcrits pourraient soutenir le rôle de la déplétion de PGC-1 β dans l'inflammation et l'immunosuppression du mélanome. Les transcrits immunosuppresseurs tels que *LGALS9*, *PDCD1LG2* et *NT5E* présentent des sites de liaison pour STAT4 et quelques membres de la famille des IRF, alors que les transcrits pro-inflammatoires tels que *CXCL8*, *TNF* et *IL1B* présentent des sites de liaison pour *REL* et *RELB*, des sous-unités de NF κ B, ainsi que pour les protéines de liaison à l'activateur CCAAT (C/EBPs). Les facteurs de transcription de cette famille s'associent au promoteur de plusieurs gènes cibles impliqués dans le métabolisme, l'inflammation et la réponse immunitaire. En situation de jeûne, C/EBP β active la transcription de PGC-1 α grâce au site de liaison présent au niveau du promoteur de ce dernier selon un mécanisme dépendant de l'AMP cyclique (AMPc) puisque le promoteur de PGC-1 α présente un élément de réponse pour AMPc. Ceci induit différentes enzymes de la β -oxydation des acides gras afin de produire de l'ATP qui alimentera la gluconéogenèse indépendamment de PGC-1 α . Ces processus adaptatifs permettent de soutenir le métabolisme bioénergétique des cellules afin d'assurer leur survie et leur prolifération en situation de stress (539). Ces observations suggèrent une régulation des PGC-1s par C/EBP β (540) qui supporte leur rôle dans le métabolisme énergétique en situation de stress. Les transcrits qui sont à la fois pro-inflammatoires et immunosuppresseurs présentent, quant à eux, des sites de liaison pour STAT1 et STAT2 (**Fig. 15A**). Parmi les facteurs de transcription et transcrits impliqués dans la fonction immunitaire et mitochondriale étudiés, STAT1/4 ainsi que IRF1/2/8 sont ceux qui présentent la plus grande dichotomie dans leur corrélation avec des transcrits mitochondriaux et immunosuppresseurs. En effet, ils corrélaient positivement avec des transcrits immunosuppresseurs et pro-inflammatoires alors qu'ils corrélaient négativement avec des transcrits encodant pour des protéines mitochondriales (**Fig. 15B**). La déplétion de PGC-1 β , ainsi que celle de HSPA9, induit l'expression et l'activité des IRFs et de NF κ B (**Fig. 15C-D**). Ces résultats suggèrent qu'en situation de stress énergétique, la déplétion de PGC-1 β pourrait participer à la reprogrammation du métabolisme mitochondrial. La dysfonction mitochondriale active la signalisation STAT, laquelle induit une réponse inflammatoire régulée par les IRF et NF κ B afin de faciliter le recrutement de cellules immunitaires au site tumoral ainsi que l'angiogenèse. Cependant, la réponse de type interféron médiée par les STAT induit différentes cytokines et autres molécules

immunosuppressives, ce qui inhibe la réponse cytotoxique médiée par les lymphocytes T et diminue la réponse à l'immunothérapie.

L'expression des PGC-1s corrèle avec des transcrits impliqués dans la réponse à plusieurs stress cellulaires

Les résultats obtenus jusqu'à présent grâce au traitement par ARN interférence dirigé contre PGC-1 β montrent que la déplétion de ce dernier inhibe la fonction mitochondriale, ce qui engendre des effets métaboliques induisant une réponse inflammatoire et immunosuppressive, en plus d'inhiber la prolifération cellulaire. La régulation de la réponse immunitaire par le métabolisme a d'ailleurs été abordée à la section 1.5. À l'inverse, PGC-1 β est activé par le jeûne et différents senseurs du statut énergétique des cellules. Ceci suggère un rôle de PGC-1 β dans l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la régulation de PGC-1 β en contexte physiologique afin de déterminer si différents stress métaboliques peuvent moduler l'expression de PGC-1 β et d'établir un rôle possible de ce dernier dans l'adaptation métabolique et la survie des cellules cancéreuses en situation de stress. Dans ce contexte, l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses constitue leur point sensible. Exploiter cette sensibilité des cellules cancéreuses par des thérapies permettrait de limiter la survie des cellules cancéreuses en situation de stress et ainsi de rétablir leur sensibilité aux traitements, notamment l'immunothérapie.

En analysant les données de séquençage d'ARN du TCGA pour le mélanome cutané chez l'humain, nous avons constaté que l'expression des transcrits de PRC et PGC-1 β corrèle positivement et négativement avec des transcrits impliqués dans la réponse à plusieurs stress cellulaires (**Fig. 17A**). De manière générale, les PGC-1s corrélaient négativement avec la réponse au stress du RE et corrélaient positivement avec la réponse à la chaleur (**Fig. 17B**). Ceci suggère que différents stress cellulaires peuvent moduler l'expression des PGC-1s dans le mélanome, et que cette régulation pourrait jouer un rôle dans la réponse des cellules cancéreuses au stress. En effet, dans les cellules de mélanome MeWo, plusieurs composés engendrant un stress métabolique (6-aminonicotinamide, cerulenin et 2-deoxy-d-glucose),

mais également d'autres composés inhibant la traduction (cycloheximide), le protéasome (MG132) et certains processus épigénétiques (sodium butyrate), diminuent l'expression du transcrite respectif des différents PGC-1s (**Fig. 17C**). Ces résultats suggèrent que différents facteurs de stress affectant la traduction, la synthèse ou la dégradation des protéines peuvent diminuer l'expression des PGC-1s. Nous avons également montré que les PGC-1s corrélaient avec la réponse au stress du RE et à l'hypoxie (**Fig. 17A**). Ces résultats suggèrent par conséquent un rôle des PGC-1s dans la réponse à divers stress métaboliques.

Le stress du RE régule l'expression des PGC-1s et contribue au remodelage métabolique des cellules de mélanome

Les cellules cancéreuses prolifèrent très rapidement et ont un métabolisme élevé, ce qui nécessite une grande production d'énergie et engendre un fardeau important sur le réticulum endoplasmique (RE), qui doit assurer la synthèse, le repliement et le transport des protéines. Si l'homéostasie n'est pas rapidement rétablie, un tel fardeau engendre un stress du RE. Dans une telle situation, les cellules mettent en place une réponse adaptative permettant de rétablir l'homéostasie et d'assurer la survie des cellules (voir section 1.4.3). Les inhibiteurs de la traduction G418, cycloheximide et blasticidine diminuent l'expression du transcrite de PGC-1 α , ce qui suggère que l'expression des PGC-1s pourrait être régulée par le stress du RE, et ce dernier joue un rôle dans la progression tumorale, la métastase et la résistance aux traitements.

Les cellules de mélanome présentant des mutations NRAS, BRAF ou MEK, particulièrement la mutation BRAF^{V600E}, présentent un niveau de stress du RE et une activation de la réponse UPR à l'état basal (476). Leur survie dépend donc de l'expression de chaperonnes telle que GRP78 et de la réponse UPR. Cependant, un stress prolongé provoque la mort de la cellule. Certaines options thérapeutiques sont envisagées, par exemple l'utilisation d'inducteurs du stress du RE, seuls ou en combinaison avec des modulateurs de la réponse UPR et d'autres composés altérant le repliement des protéines, provoquerait un arrêt du cycle cellulaire ou la mort des cellules cancéreuses par apoptose (541). D'un autre côté, l'activation de la signalisation MEK/ERK, l'activation de la kinase

AKT ou l'inhibition de PTEN, couramment observées dans le mélanome, engendrent des changements métaboliques permettant aux cellules cancéreuses de continuer à assurer ses besoins énergétiques, même dans un environnement hostile, empêchant ainsi la réponse UPR de provoquer l'apoptose des cellules cancéreuses et permet la progression du mélanome en favorisant la survie des cellules les mieux adaptées au stress du RE (542). Il a également été montré que les cellules de mélanome présentant la mutation BRAF^{V600E}, comparativement à leur contrepartie non mutée, surexpriment Xbp-I ainsi que le facteur de transcription ATF4 et activent ERK1/2, traduisant un stress du RE à l'état basal les désensibilisant à ce dernier et induisant une autophagie basale caractérisée par l'activation de JNK et une accumulation de p62. Cette autophagie rend les cellules insensibles à l'apoptose provoquée par les chimiothérapies et contribue ainsi à la résistance aux traitements (476). L'impact du stress du RE sur la progression du mélanome semble donc dépendre de la durée, du contexte, du microenvironnement et du stade d'avancement de la maladie. Pour toutes ces raisons, et puisqu'il pourrait moduler l'expression de PGC-1 β , nous avons décidé d'étudier plus attentivement son rôle dans le mélanome.

Nous avons montré plus haut que l'expression des PGC-1s corrèle positivement et négativement avec des transcrits de la réponse au stress du RE (**Fig. 17A**). Nous montrons également que tant une faible qu'une forte expression des PGC-1s peut moduler l'expression de ces transcrits (**Fig. 18A**) et que, de manière générale, chacun des PGC-1s régule des transcrits différents, à l'exception de PGC-1 α et de PGC-1 β qui régulent certains transcrits communs (**Fig. 18B-C**). Ceci suggère un rôle du stress du RE dans la régulation des PGC-1s, ces derniers pouvant également être impliqués dans la réponse au stress du RE.

La thapsigargin (TSG) est un inhibiteur de l'ATPase Ca²⁺ du réticulum sarco/endoplasmique (SERCA). Il engendre un stress du RE en empêchant l'entrée de calcium du cytosol vers le réticulum sarcoplasmique, le calcium étant essentiel à l'activité de plusieurs chaperonnes qui régulent le repliement des protéines (543). Le PrestoBlue est une solution de résazurine initialement colorée bleue. L'activité métabolique des cellules vivantes convertit la résazurine en résorufine, un composé rougeâtre. La résorufine peut

par conséquent être détectée en fluorescence qui sera proportionnelle à la viabilité cellulaire. On remarque, dans les cellules de mélanome MeWo traitées avec TSG, donc soumises à un stress du RE, une diminution de la viabilité qui semble dépendante de la dose. On observe un phénomène semblable dans d'autres lignées cellulaires de mélanome humain (A375, RPMI7951), ainsi que dans des fibroblastes pulmonaires humains (MRC5) (**Fig. 18D**). Ces résultats ont été confirmés avec quelques composés supplémentaires induisant un stress du RE, chacun agissant selon un mécanisme différent et indépendant (**Fig. 18E**). Une telle expérience de viabilité permet de déterminer le *Growth Inhibitory 50* (GI50), soit la dose qui exerce un effet de 50% sur la diminution de la viabilité ou de la prolifération cellulaire. Le GI50 reflète la sensibilité des cellules au stress du RE. Fait intéressant, les RPMI7951 et les A375, qui expriment très peu PGC-1 α , sont plus sensibles au stress du RE que les MeWo, qui expriment davantage PGC-1 α et dont le métabolisme mitochondrial est important, suggérant que le métabolisme et la fonction mitochondriale peuvent moduler la réponse au stress du RE.

Les PGC-1s agissent comme senseur de stress et modulent le métabolisme mitochondrial de manière à rétablir l'homéostasie en situation de stress

Il a d'ailleurs déjà été montré que des chaperonnes résidentes du réticulum endoplasmique interagissent avec des oxydoréductases mitochondriales, laissant penser que l'OXPPOS pourrait être un processus important pour le repliement de certaines protéines, notamment pour la formation de ponts disulfures qui nécessitent un environnement oxydatif. Ce processus provoque la formation de ROS et déplete les défenses antioxydantes, ce qui engendre un stress oxydatif. Le stress du RE peut lui aussi induire la production de ROS mitochondriaux en provoquant la relâche de calcium du réticulum endoplasmique vers le cytosol. Le bris et la formation de ponts disulfures, en combinaison avec la production de ROS mitochondriaux, altèrent le potentiel REDOX et activent l'OXPPOS (544, 545). Les cellules qui expriment peu PGC-1 α sont plus glycolytiques et leur métabolisme mitochondrial n'est peut-être pas suffisant pour assurer la gestion des ROS et du stress oxydatif en situation de stress du RE et ainsi assurer leur survie.

On remarque que, dans les cellules de mélanome MeWo, le traitement avec TSG diminue l'expression du transcrit de PGC-1 α (**Fig. 18F**) et de PGC-1 β (**Fig. 18G**) de manière dépendante de la dose. Le calcium libéré par le RE vers la mitochondrie en situation de stress du RE permet au RE d'interagir avec la mitochondrie de manière à continuer d'assurer les demandes énergétiques des cellules et de promouvoir leur survie (546), ce qui suggère un rôle de la mitochondrie dans la réponse au stress du RE.

La diminution de l'expression du transcrit des PGC-1s en situation de stress du RE suggère une dysfonction mitochondriale et peut constituer un mécanisme de défense des cellules qui diminuent leur métabolisme afin de réduire la synthèse de protéines, et ainsi diminuer le fardeau du réticulum endoplasmique, en plus de conserver leur énergie et de rétablir l'homéostasie. En effet, le stress du RE induit l'autophagie, un processus lors duquel les organelles et autres composantes cellulaires sont empaquetées dans des vésicules qui fusionnent avec des lysosomes afin que la cellule puisse utiliser ses propres constituants comme source d'énergie et d'acides aminés. Ce processus empêche la mort cellulaire à court terme, mais si l'homéostasie ne peut pas être rétablie, la cellule meurt par apoptose. Les cellules cancéreuses en situation de stress du RE diminuent leur consommation de glucose, notamment en diminuant l'expression du transporteur membranaire de glucose GLUT-1, ce qui empêche la glycolyse et diminue par conséquent la production de lactate et d'ATP (547). La diminution de la glycolyse augmente le ratio NAD⁺/NADPH et diminue le potentiel REDOX de la cellule, ce qui augmente la production de ROS et impose un fardeau sur la mitochondrie. Ceci engendre un stress oxydatif activant des voies pro-apoptotiques (548, 549). Il est par conséquent possible que PGC-1 β agisse comme un senseur de stress capable de moduler le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses en situation de stress afin de diminuer la synthèse et le métabolisme mitochondrial afin de réduire la production de ROS, de rétablir l'homéostasie, de réparer les dommages cellulaires et ainsi participer à la progression tumorale. Le traitement avec différentes doses de TSG dans des cellules de mélanome MeWo diminue la viabilité et l'expression du transcrit des PGC-1s de manière dépendante de la dose, ce qui suggère pour la première fois que les PGC-1s pourraient être un marqueur de viabilité.

Puisque les mitochondries facilitent la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses et le maintien du potentiel REDOX, deux processus impliqués dans le stress du RE, nous nous sommes intéressés à la fonction mitochondriale en situation de stress du RE. Le traitement avec TSG dans les cellules de mélanome MeWo diminue la respiration mitochondriale maximale (**Fig. 18H-J**) et l'acidification du milieu extracellulaire (**Fig. 18K**), en plus de diminuer minimalement la respiration mitochondriale basale (**Fig. 18I**). Ces résultats suggèrent que le stress du RE engendre une dysfonction mitochondriale pouvant altérer l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses via l'induction de la glycolyse. La diminution de l'expression PGC-1s pourrait constituer un mécanisme de défense des cellules en situation de stress de RE afin de non seulement limiter le stress oxydatif et le fardeau sur les mitochondries, mais également de limiter la traduction et la synthèse de protéines, puisque le potentiel REDOX régule la formation de ponts disulfure et le repliement de certaines protéines. Ceci diminuerait également le fardeau sur le réticulum endoplasmique et limiterait les impacts délétères du stress du RE.

PGC-1 β peut être régulé par un mécanisme de régulation transcriptionnel impliquant la protéine de liaison à l'ARN LARP1

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'aspect mécanistique de la régulation des PGC-1s. Les résultats présentés jusqu'à présent montrent une diminution de l'expression du transcrit des PGC-1s en situation de stress du RE, ce qui indique que la régulation des PGC-1s se produit au niveau transcriptionnel. Cependant, un essai de poursuite à l'actinomycine D ne montre pas de changement de la demi-vie (**Fig. 19D-E**), ce qui signifie que l'ARNm des PGC-1s n'est pas dégradé en situation de stress du RE et que, par conséquent, les PGC-1s ne sont pas régulés au niveau de la stabilité de leur ARNm dans ce contexte. Ces résultats suggèrent que la régulation des PGC-1s s'effectue au niveau d'un mécanisme de régulation de la transcription autre que la dégradation de l'ARNm. Les protéines de liaison à l'ARN possèdent un domaine de liaison dont la structure flexible leur permet de lier un nombre grandissant de cibles. Elles sont impliquées dans plusieurs volets de la prise en charge des ARNm, comme son export hors du noyau, son transport, sa localisation et la traduction (550, 551).

Les ARN messagers (ARNm) encodant pour les protéines ribosomales forment un sous-groupe caractérisé par la présence d'un motif TOP (*terminal oligopyrimidine*) (552). Ce dernier est constitué d'une cytidine suivie de quatre à quatorze pyrimidines et rend la traduction sensible à plusieurs signaux de croissance ou à une déprivation de nutriments et d'oxygène, tous dépendants de la signalisation mTORC1. Ce dernier joue un rôle crucial dans la traduction des ARNm présentant un motif TOP via son action sur les facteurs d'initiation de la traduction et les facteurs d'élongation comme présenté plus haut, mais d'autres cibles de mTORC1, tel que la protéine 1 apparentée à La (LARP1), peuvent également se lier à mTORC1 pour réguler l'expression et la traduction des ARNm présentant un motif TOP (490).

LARP1 est une protéine de liaison à l'ARN qui interagit avec une protéine se liant à la queue poly-A des ARN messagers (PABP) afin de réguler la stabilité et la traduction des ARNm présentant un motif TOP. LARP1 régule la stabilité de l'ARNm et la signalisation mTOR et, via son activité sur le complexe mTORC1 et certains facteurs d'initiation de la traduction, régule la stabilité et la traduction d'ARNm encodant pour des protéines ribosomales ou impliquées dans la synthèse de ribosomes (553, 554). LARP1 est impliquée dans certaines pathologies, notamment le cancer. En effet, LARP1 participe à la progression tumorale en régulant plusieurs ARNm impliqués dans la migration et la croissance des cellules cancéreuses ainsi que la vascularisation des tumeurs. LARP1 exerce également des effets pro-oncogéniques en régulant des processus cellulaires tels que l'apoptose et la transition épithélio-mésenchymateuse (555). Bien que tous s'entendent sur le fait que LARP1 est un véritable régulateur de la traduction spécifique aux ARNm présentant un motif TOP, plusieurs incertitudes et controverses demeurent autour du rôle précis de LARP1 dans la traduction. Certains travaux suggèrent que LARP1 stimule la traduction (556) alors que d'autres soutiennent le contraire (557, 558). Puisque le stress du RE régule mTOR, et que LARP1 régule les ARNm présentant un motif TOP via la signalisation mTORC1, il est possible que les PGC-1s agissent comme un ARNm présentant un motif TOP pouvant être régulé par LARP1 en situation de stress du RE.

Nous avons donc étudié l'expression de plusieurs protéines de liaison à l'ARN dont l'expression corrèle avec les PGC-1s et nous montrons qu'en condition de stress du RE, l'expression du transcrit de LARP1 est fortement diminuée, ce qui se reflète également au niveau de la protéine (**Fig. 19F-G**). Plusieurs stress cellulaires modulant l'expression du transcrit des PGC-1s diminuent également l'expression du transcrit de LARP1 (**Fig. 19H**), ce qui signifie que LARP1, tout comme les PGC-1s, est très labile et peut être modulé en situation de stress et que LARP1 diminue l'expression des PGC-1s par un mécanisme transcriptionnel afin de médier la réponse au stress. Ces résultats suggèrent également qu'en situation de stress cellulaire, la signalisation mTORC1 est inhibée, ce qui empêche la traduction et diminue la prolifération. Il s'agit d'un mécanisme qu'utilise la cellule pour éviter de surcharger ses systèmes.

L'expression de LARP1 corrèle de façon positive avec les PGC-1s, particulièrement PGC-1 β , et plusieurs transcrits encodant pour des protéines mitochondriales. De plus LARP1 corrèle de façon négative avec plusieurs transcrits pro-inflammatoires et immunosuppresseurs (**Fig. 20A**). L'analyse fonctionnelle des transcrits corrélant avec LARP1 révèle que ce dernier corrèle de façon positive avec des transcrits impliqués dans l'initiation de la traduction et des processus métaboliques. À l'inverse, LARP1 corrèle négativement avec des transcrits qui régulent l'activité de cytokines et de chimiokines inflammatoires ainsi que la présentation antigénique. (**Fig. 20B-C**). Plusieurs transcrits régulant la traduction de l'ADN mitochondrial, l'OXPPOS et le cycle de l'acide citrique corrèlent de façon positive avec LARP1 (**Fig. 20D**), ce qui suggère que ce dernier pourrait être impliqué dans la régulation de la fonction mitochondriale et jouer un rôle dans l'effet dichotomique de la déplétion en PGC-1 β sur la réponse inflammatoire et l'immunosuppression. Ceci supporte également un rôle de LARP1 dans la régulation des PGC-1s. Tout comme les PGC-1s, LARP1 semble influencer la réponse à l'immunothérapie. En effet, une faible expression de LARP1 corrèle avec une mauvaise réponse aux anticorps anti-PD-L1 (**Fig. 20E**). Dans les tumeurs qui ne répondent pas à l'immunothérapie, la corrélation entre l'expression de LARP1 et les transcrits mitochondriaux et immunosuppresseurs est plus forte que chez les répondeurs (**Fig. 20F**). Ceci suggère que LARP1 pourrait activer un programme transcriptionnel de manière à

détourner le métabolisme mitochondrial en faveur de voies alternatives de production d'énergie, ce qui aurait un impact sur la réponse inflammatoire et permettrait d'induire un programme immunosuppresseur favorisant l'évasion et la résistance à l'immunothérapie.

LARP1 contribue à l'inflammation et à l'immunosuppression lors de la déplétion de PGC-1 β et pourrait ainsi être impliqué dans la réponse à l'immunothérapie

L'avènement de l'immunothérapie est une percée majeure pour le traitement des stades avancés de mélanome pour lesquels il n'y avait auparavant pas de traitement. L'immunothérapie est une classe de traitement qui regroupe certaines cytokines, des molécules inhibitrices des points de contrôle immunitaire, des vaccins et l'infusion de lymphocytes T exprimant un récepteur spécialisé leur permettant de reconnaître des antigènes tumoraux. L'objectif commun de tous ces traitements est de stimuler le système immunitaire afin de reconnaître et d'éliminer spécifiquement les cellules tumorales (559). L'efficacité des chimiothérapies contre le mélanome est très faible et les patients développent rapidement une résistance en raison de mutations génétiques ou l'activation de voies signalétiques responsables de l'importante reprogrammation métabolique caractéristique des cellules cancéreuses (184). L'immunothérapie peut être utilisée comme outil permettant d'améliorer l'efficacité et de diminuer la toxicité des traitements contre le mélanome. Inhiber l'expression des PGC-1s pourrait être utilisé comme approche thérapeutique afin de modifier le métabolisme des cellules cancéreuses de manière à les empêcher de générer un environnement inflammatoire et de diminuer l'immunosuppression. Une telle approche pourrait par conséquent être exploitée comme adjuvant afin d'améliorer l'efficacité de l'immunothérapie.

Lors du stress du RE, la cellule diminue l'expression des PGC-1s afin de réduire le métabolisme mitochondrial, de diminuer le stress oxydatif et de diminuer le fardeau sur le réticulum endoplasmique, ce qui permet de rétablir l'homéostasie et promeut la survie des cellules cancéreuses. Nos résultats suggèrent donc que les PGC-1s jouent un rôle dans la réponse mise en place par les cellules lors du stress du RE. Le stress du RE influence le destin des cellules cancéreuses, puisqu'il peut induire l'autophagie afin de permettre aux

cellules d'assurer leurs besoins énergétiques en condition de déprivation de nutriments ou de stress du RE. Ce phénomène permet aux cellules de résister à l'apoptose induite par plusieurs chimiothérapies et contribue à la résistance aux traitements. Cependant, en cas de stress prolongé, ou si l'homéostasie ne peut être rétablie, la cellule meurt par apoptose. Une approche thérapeutique intéressante pourrait donc être d'induire un stress du RE au niveau des tumeurs et de cibler les mécanismes de défense des cellules cancéreuses en induisant les PGC-1s, ce qui empêche le remodelage métabolique des cellules cancéreuses et contribue au stress oxydatif, en combinaison avec des composés inhibiteurs de l'autophagie tels que la chloroquine et l'hydroxychloroquine.

Concordant avec nos observations faites lors de la déplétion de PGC-1 β , la déplétion de LARP1 dans des cellules de mélanome MeWo grâce à un petit ARN interférent diminue la prolifération (**Fig. 21B**). La déplétion de LARP1 diminue également la respiration mitochondriale basale (**Fig. 21D**), la respiration maximale (**Fig. 21C-E**) et l'acidification du milieu extracellulaire (**Fig. 21F**). Ceci suggère que la déplétion de LARP1 joue un rôle dans la dysfonction mitochondriale et l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses pouvant contribuer à l'effet de la déplétion en PGC-1 β . De plus, la déplétion de LARP1 diminue l'expression de PGC-1 β et de plusieurs transcrits immunosuppresseurs (**Fig. 21G-J**), suggérant que LARP1 joue un rôle dans l'induction de ces transcrits immunosuppresseurs lors de la déplétion de PGC-1 β . De manière intéressante, la déplétion de LARP1 ne diminue pas l'expression de PGC-1 α , ce qui suggère que LARP1 pourrait réguler spécifiquement PGC-1 β par un mécanisme indépendant de PGC-1 α . Ceci pourrait également suggérer un effet compensatoire permettant de maintenir la biogenèse mitochondriale et la production d'ATP en situation de stress du RE. De manière intéressante, la diminution de l'expression des transcrits immunosuppresseurs suivant la déplétion de LARP1 (**Fig. 21H**) est plus importante dans les YUMMER1.7, qui répondent bien à l'immunothérapie, ce qui supporte le rôle de LARP1 dans l'induction d'un programme transcriptionnel favorisant l'évasion tumorale et qui pourrait être renversé par la surexpression de LARP1 afin de rétablir la sensibilité des cellules de mélanome à l'immunothérapie.

L'expression ectopique de LARP1 dans un modèle stable de surexpression augmente l'induction des transcrits de PGC-1 α et d'IL-8 et diminue la sensibilité des cellules de mélanome MeWo en situation de stress du RE (**Fig. 22D**). De plus, la surexpression de LARP1 augmente la survie en situation de stress cellulaires divers. Ceci suggère que la surexpression de LARP1 exerce un effet protecteur. Les MeWo expriment fortement PGC-1 α et sont possiblement dépendantes de la respiration mitochondriale. Ceci leur confère une grande capacité à résister à la mitophagie et peut induire l'autophagie (560). Une possibilité à envisager est qu'en situation de stress cellulaire, la surexpression de LARP1 dans ce modèle induit un programme transcriptionnel supportant la fonction mitochondriale afin de soutenir ces processus bioénergétiques et de favoriser la survie, ce qui lui confère un effet protecteur.

Limites de l'étude et perspectives

Notre étude a permis d'établir le rôle de la déplétion en PGC-1 β dans l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses conduisant à une réponse inflammatoire mise en place par les cellules cancéreuses afin d'engendrer un environnement immunosuppresseur affectant la réponse à l'immunothérapie. Nous avons également illustré le rôle des PGC-1s dans la réponse à différents facteurs de stress issus du MET afin de favoriser la survie des cellules cancéreuses.

Bien qu'intéressante à plusieurs égards, notre étude présente tout de même certaines limites. Tout d'abord, nous n'avons pas de modèle de surexpression de PGC-1 β , ce qui nous aurait permis de valider la spécificité des effets observés lors de la déplétion avec un ARN interférent et déterminer si réintroduire PGC-1 β est suffisant pour renverser ces effets. La surexpression de PGC-1 β semble induire la biogenèse mitochondriale (561) et la β -oxydation des acides gras (562), mais pourrait également avoir un impact délétère sur la métastase et la croissance tumorale (563, 564).

Nous nous sommes intéressés à l'expression de plusieurs protéines mitochondriales ainsi que des facteurs de transcription encodant pour des gènes de l'OXPHOS et de la biogenèse

mitochondriale. Cependant, pour approfondir notre étude de la dysfonction mitochondriale observée lors de la déplétion en PGC-1 β , nous aurions eu avantage à étudier également la concentration de NADPH ainsi que le potentiel membranaire mitochondrial. De plus, bien que nous ayons un modèle de surexpression de LARP1 pour illustrer son rôle dans la régulation de PGC-1 β et la réponse au stress, les résultats présentés sont ceux de populations de cellules surexprimant LARP1 de façon stable et non des clones. Bien que nous remarquions un effet au niveau de l'expression de certains transcrits inflammatoires et immunosuppresseurs, ainsi qu'une augmentation de la survie lors de certains stress cellulaires, l'amplitude et la reproductibilité de ces résultats peuvent être diminuées si la surexpression n'a que très peu ou pas du tout fonctionné pour certaines cellules. Nous nous activons présentement à générer et à caractériser quelques clones surexprimant LARP1 de manière stable.

Établir un modèle de surexpression de PGC-1 β nous aurait permis de vérifier si la réintroduction de ce dernier renverse les effets de la déplétion de PGC-1 β sur la viabilité cellulaire en situation de stress. Finalement, la déplétion en PGC-1 β diminue grandement l'expression de LARP1, aussi bien dans les lignées humaines que murines, mais la surexpression de LARP1 n'a que peu d'effet sur l'expression de PGC-1 β . Ceci suggère que d'autres facteurs pourraient soutenir le rôle de LARP1 dans la régulation de PGC-1 β et demeure à explorer. Les lignées cellulaires représentent un modèle *in vitro* initial intéressant pour des approches de criblages et améliorer notre compréhension du modèle.

Ce modèle *in vitro* ne tient cependant pas compte de l'interaction des cellules de mélanome avec d'autres types cellulaires, dans ce cas-ci des fibroblastes, des macrophages ou des lymphocytes, mais également des kératinocytes. Par exemple, l'interaction des kératinocytes avec les lymphocytes T engendre une réponse inflammatoire caractérisée par la relâche de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires, soient IL-6, IL-8 et IL-23, qui participent au développement de plusieurs maladies de la peau, par exemple le psoriasis et la dermatite atypique. De manière intéressante, ce phénomène ne nécessite pas de contact direct entre les lymphocytes T et les kératinocytes. En effet, les lymphocytes T peuvent libérer des facteurs solubles. Ces facteurs stimulent les kératinocytes qui produisent alors

des chimiokines pro-inflammatoires comme CXCL10 (565). De plus, la peau est un organe complexe en trois dimensions. Elle est directement exposée à l'air ambiant et l'apport en oxygène et en nutriments varie entre les différentes couches cutanées. Toutes ces particularités sont difficiles à reproduire dans un modèle de culture cellulaire. Ainsi, les prochaines étapes du projet consisteront à élaborer un modèle de co-culture, de sphéroïdes ou de peau 3D qui représentent mieux le contexte physiologique dans lequel évoluent les tumeurs. Une fois le modèle optimisé, les connaissances acquises pourront être utilisées afin d'élaborer un modèle d'allogreffes dans des souris immunocompétentes afin d'étudier le rôle de PGC-1 β dans la croissance tumorale et la réponse à l'immunothérapie *in vivo*.

Conclusion

Pour terminer, le métabolisme joue un rôle essentiel dans la réponse au stress mise en place par les cellules cancéreuses pour s'adapter et survivre dans un environnement hostile. Cette flexibilité des cellules cancéreuses provoque la métastase et la résistance aux traitements, des défis majeurs du traitement du mélanome. Le coactivateur transcriptionnel PGC-1 β potentialise la transcription de gènes de la biogenèse et de la fonction mitochondriale, apparaissant ainsi comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du mélanome. Cibler le métabolisme mitochondrial via PGC-1 β permettrait d'altérer les mécanismes alternatifs d'acclimatation des cellules cancéreuses à leur environnement et pourrait rétablir la sensibilité du mélanome aux thérapies conventionnelles. Les cellules de mélanome présentent souvent un niveau basal de stress du RE en raison de leur croissance rapide et de carence en nutriments dans le microenvironnement tumoral. Le stress du RE et la réponse UPR mise en place pour y remédier est d'abord un mécanisme de défense permettant aux cellules cancéreuses d'assurer leurs besoins énergétiques et de rétablir l'homéostasie afin d'assurer leur survie. Cependant, un stress trop important ou prolongé conduit à la mort de la cellule. Altérer les mécanismes de réponse au stress du RE en ciblant PGC-1 β permettrait de moduler le métabolisme cellulaire et rétablir la sensibilité du mélanome à la mort cellulaire induite par la plupart des traitements de chimio et de radiothérapie, augmentant l'efficacité de tels traitements.

L'analyse de bases de données de RNA seq (TCGA) révèle que l'expression de PGC-1 β corrèle positivement avec des transcrits régulant la transcription, la traduction, la respiration et le métabolisme mitochondrial alors qu'elle corrèle négativement avec des transcrits impliqués dans la réponse inflammatoire et immunitaire. Comprenant mieux le rôle de PGC-1 β , nous nous sommes intéressés à savoir s'il pouvait être régulé en contexte physiologique et qu'elles seraient les conséquences d'une telle régulation sur la progression tumorale. Nos résultats montrent que le stress du RE induit par différents traitements pharmacologiques diminue la viabilité de cellules de mélanome en culture de façon dépendante de la dose et diminue l'expression du transcrit respectif de PGC-1 et de PGC-1 β , ce qui s'accompagne d'une réponse inflammatoire caractérisée par l'induction de cytokines inflammatoires telle qu'IL-8. Ces résultats indiquent une transition d'un métabolisme oxydatif vers un métabolisme glycolytique et présentent PGC-1 β comme un marqueur de viabilité dont l'expression est à l'opposé de la réponse inflammatoire. Ces résultats sont reproductibles avec différents traitements pharmacologiques, suggérant que PGC-1 β joue un rôle dans la réponse au stress cellulaire qui n'est pas exclusif au stress du RE. En situation de stress, l'expression de PGC-1 β corrèle avec celle de LARP1. LARP1 est une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans la traduction des ARNm présentant un motif TOP. En situation de stress, LARP1 pourrait réguler PGC-1 β au niveau de sa transcription, de sa traduction ou de sa stabilité et serait ainsi essentiel au rôle de PGC-1 β dans la réponse au stress. Pour étudier le rôle de LARP1 dans la régulation de PGC-1 β , nous avons créé des lignées stables de cellules de mélanome surexprimant LARP1. La surexpression de LARP1 prévient légèrement la déplétion de PGC-1 β et la diminution de la viabilité en situation de stress du RE, suggérant que LARP1 est un élément central de la réponse au stress et que son inhibition empêcherait l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses en situation de stress.

Références :

1. Yousef H, Alhadj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. StatPearls. Treasure Island (FL)2021.
2. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(4):328-40.
3. Hsu CK, Lin HH, Harn HI, Hughes MW, Tang MJ, Yang CC. Mechanical forces in skin disorders. *J Dermatol Sci.* 2018;90(3):232-40.
4. Brown TM, Krishnamurthy K. Histology, Dermis. StatPearls. Treasure Island (FL)2021.
5. Thulabandu V, Chen D, Atit RP. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2018;7(2).
6. Wilgus TA, Wulff BC. The Importance of Mast Cells in Dermal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014;3(4):356-65.
7. Abdo H, Calvo-Enrique L, Lopez JM, Song J, Zhang MD, Usoskin D, et al. Specialized cutaneous Schwann cells initiate pain sensation. *Science.* 2019;365(6454):695-9.
8. Zimoch J, Zielinska D, Michalak-Micka K, Rutsche D, Boni R, Biedermann T, et al. Bio-engineering a prevascularized human tri-layered skin substitute containing a hypodermis. *Acta Biomater.* 2021;134:215-27.
9. Chitraju C, Mejhert N, Haas JT, Diaz-Ramirez LG, Grueter CA, Imbriglio JE, et al. Triglyceride Synthesis by DGAT1 Protects Adipocytes from Lipid-Induced ER Stress during Lipolysis. *Cell Metab.* 2017;26(2):407-18 e3.
10. Mazzucotelli A, Langin D. [Fatty acid mobilization and their use in adipose tissue]. *J Soc Biol.* 2006;200(1):83-91.
11. Speakman JR. Obesity and thermoregulation. *Handb Clin Neurol.* 2018;156:431-43.
12. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol.* 2013;30(1):30-41.

13. Aoki H, Motohashi T, Yoshimura N, Yamazaki H, Yamane T, Panthier JJ, et al. Cooperative and indispensable roles of endothelin 3 and KIT signalings in melanocyte development. *Dev Dyn*. 2005;233(2):407-17.
14. Widlund HR, Horstmann MA, Price ER, Cui J, Lessnick SL, Wu M, et al. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J Cell Biol*. 2002;158(6):1079-87.
15. Hornyak TJ, Hayes DJ, Chiu LY, Ziff EB. Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for Pax-3 and Mitf. *Mech Dev*. 2001;101(1-2):47-59.
16. Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene*. 2003;22(20):3035-41.
17. Phung B, Sun J, Schepsky A, Steingrimsson E, Ronnstrand L. C-KIT signaling depends on microphthalmia-associated transcription factor for effects on cell proliferation. *PLoS One*. 2011;6(8):e24064.
18. Abrahamian C, Grimm C. Endolysosomal Cation Channels and MITF in Melanocytes and Melanoma. *Biomolecules*. 2021;11(7).
19. Guo R, Franco-Palacios M, Russell M, Goddard L, Hassell L, Gillies E, et al. Microphthalmia transcription factor (MITF) as a diagnostic marker for metastatic melanomas negative for other melanoma markers. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(8):1658-64.
20. Lambert MW, Maddukuri S, Karanfilian KM, Elias ML, Lambert WC. The physiology of melanin deposition in health and disease. *Clin Dermatol*. 2019;37(5):402-17.
21. Kondo T, Hearing VJ. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol*. 2011;6(1):97-108.
22. Delevoye C, Giordano F, van Niel G, Raposo G. [Biogenesis of melanosomes - the chessboard of pigmentation]. *Med Sci (Paris)*. 2011;27(2):153-62.
23. Haass NK, Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2005;10(2):153-63.
24. Gordon R. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs*. 2013;29(3):160-9.

25. Feuerstein I, Geller AC. Skin cancer education in transplant recipients. *Prog Transplant*. 2008;18(4):232-41; quiz 42.
26. Tanese K. Diagnosis and Management of Basal Cell Carcinoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2019;20(2):13.
27. Puig S, Berrocal A. Management of high-risk and advanced basal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2015;17(7):497-503.
28. Kim DP, Kus KJB, Ruiz E. Basal Cell Carcinoma Review. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2019;33(1):13-24.
29. Mizuno T, Tokuoka S, Kishikawa M, Nakashima E, Mabuchi K, Iwamoto KS. Molecular basis of basal cell carcinogenesis in the atomic-bomb survivor population: p53 and PTCH gene alterations. *Carcinogenesis*. 2006;27(11):2286-94.
30. Kishikawa M, Koyama K, Iseki M, Kobuke T, Yonehara S, Soda M, et al. Histologic characteristics of skin cancer in Hiroshima and Nagasaki: background incidence and radiation effects. *Int J Cancer*. 2005;117(3):363-9.
31. Watt TC, Inskip PD, Stratton K, Smith SA, Kry SF, Sigurdson AJ, et al. Radiation-related risk of basal cell carcinoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(16):1240-50.
32. Marzuka AG, Book SE. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale J Biol Med*. 2015;88(2):167-79.
33. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018;18(1):8-20.
34. Didiasova M, Schaefer L, Wygrecka M. Targeting GLI Transcription Factors in Cancer. *Molecules*. 2018;23(5).
35. Pauklin S, Madrigal P, Bertero A, Vallier L. Initiation of stem cell differentiation involves cell cycle-dependent regulation of developmental genes by Cyclin D. *Genes Dev*. 2016;30(4):421-33.

36. Dodds A, Chia A, Shumack S. Actinic keratosis: rationale and management. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2014;4(1):11-31.
37. Kallini JR, Hamed N, Khachemoune A. Squamous cell carcinoma of the skin: epidemiology, classification, management, and novel trends. *Int J Dermatol*. 2015;54(2):130-40.
38. Shah AT, Wu E, Wein RO. Oral squamous cell carcinoma in post-transplant patients. *Am J Otolaryngol*. 2013;34(2):176-9.
39. Welch HG, Mazer BL, Adamson AS. The Rapid Rise in Cutaneous Melanoma Diagnoses. *N Engl J Med*. 2021;384(1):72-9.
40. Chen ST, Geller AC, Tsao H. Update on the Epidemiology of Melanoma. *Curr Dermatol Rep*. 2013;2(1):24-34.
41. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*. 2008;84(3):539-49.
42. Lautenschlager S, Wulf HC, Pittelkow MR. Photoprotection. *Lancet*. 2007;370(9586):528-37.
43. Erdei E, Torres SM. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010;10(11):1811-23.
44. Moan JE, Baturaite Z, Dahlback A, Porojnicu AC. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Adv Exp Med Biol*. 2014;810:359-74.
45. Moan J, Cicarma E, Setlow R, Porojnicu AC, Grant WB, Juzeniene A. Time trends and latitude dependence of uveal and cutaneous malignant melanoma induced by solar radiation. *Dermatoendocrinol*. 2010;2(1):3-8.
46. Matthews NH, Li WQ, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E. Epidemiology of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Brisbane (AU)2017.
47. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*. 2010;49(9):978-86.
48. International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet I, skin c. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant

melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer*. 2007;120(5):1116-22.

49. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014;28(6):1005-11.

50. Puckett Y, Wilson AM, Farci F, Thevenin C. Melanoma Pathology. StatPearls. Treasure Island (FL)2021.

51. Sachdeva S. Fitzpatrick skin typing: applications in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2009;75(1):93-6.

52. Sommers MS, Fargo JD, Regueira Y, Brown KM, Beacham BL, Perfetti AR, et al. Are the Fitzpatrick Skin Phototypes Valid for Cancer Risk Assessment in a Racially and Ethnically Diverse Sample of Women? *Ethn Dis*. 2019;29(3):505-12.

53. Read J, Wadt KA, Hayward NK. Melanoma genetics. *J Med Genet*. 2016;53(1):1-14.

54. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Gillanders EM, Hayward NK, Avril MF, et al. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res*. 2006;66(20):9818-28.

55. Puntervoll HE, Yang XR, Vetti HH, Bachmann IM, Avril MF, Benfodda M, et al. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *J Med Genet*. 2013;50(4):264-70.

56. Chou KM. DNA polymerase eta and chemotherapeutic agents. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(12):2521-9.

57. Sample A, He YY. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2018;34(1):13-24.

58. Goto N, Bazar G, Kovacs Z, Kunisada M, Morita H, Kizaki S, et al. Detection of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by near-infrared spectroscopy and aquaphotomics. *Sci Rep*. 2015;5:11808.

59. Dianov GL, Hubscher U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(6):3483-90.

60. Menck CF, Munford V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? *Genet Mol Biol*. 2014;37(1 Suppl):220-33.

61. Runger TM. C→T transition mutations are not solely UVB-signature mutations, because they are also generated by UVA. *J Invest Dermatol.* 2008;128(9):2138-40.
62. Obrador E, Liu-Smith F, Dellinger RW, Salvador R, Meyskens FL, Estrela JM. Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma. *Biol Chem.* 2019;400(5):589-612.
63. Rezvani HR, Kim AL, Rossignol R, Ali N, Daly M, Mahfouf W, et al. XPC silencing in normal human keratinocytes triggers metabolic alterations that drive the formation of squamous cell carcinomas. *J Clin Invest.* 2011;121(1):195-211.
64. Kamenisch Y, Ivanova I, Drexler K, Berneburg M. UVA, metabolism and melanoma: UVA makes melanoma hungry for metastasis. *Exp Dermatol.* 2018;27(9):941-9.
65. 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.
66. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(6):472-92.
67. Ward WH, Lambreton F, Goel N, Yu JQ, Farma JM. Clinical Presentation and Staging of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy.* Brisbane (AU)2017.
68. Petrelli F, Ardito R, Merelli B, Lonati V, Cabiddu M, Seghezzi S, et al. Prognostic and predictive role of elevated lactate dehydrogenase in patients with melanoma treated with immunotherapy and BRAF inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Melanoma Res.* 2019;29(1):1-12.
69. Farhana A, Lappin SL. Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2021.
70. Jurisic V, Radenkovic S, Konjevic G. The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol.* 2015;867:115-24.
71. Scolyer RA, Rawson RV, Gershenwald JE, Ferguson PM, Prieto VG. Melanoma pathology reporting and staging. *Mod Pathol.* 2020;33(Suppl 1):15-24.

72. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(6):345-58.
73. Bonnelykke-Behrndtz ML, Steiniche T, Norgaard P, Danielsen AV, Damsgaard TE, Christensen IJ, et al. Loss of E-cadherin as Part of a Migratory Phenotype in Melanoma Is Associated With Ulceration. *Am J Dermatopathol*. 2017;39(9):672-8.
74. Damsky WE, Rosenbaum LE, Bosenberg M. Decoding melanoma metastasis. *Cancers (Basel)*. 2010;3(1):126-63.
75. Savoia P, Fava P, Casoni F, Cremona O. Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6).
76. Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem*. 2005;386(3):193-205.
77. Mishra PJ, Ha L, Rieker J, Sviderskaya EV, Bennett DC, Oberst MD, et al. Dissection of RAS downstream pathways in melanomagenesis: a role for Ral in transformation. *Oncogene*. 2010;29(16):2449-56.
78. Omholt K, Hansson J. No evidence of RALGDS mutations in cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 2007;17(6):410-2.
79. Lim KH, Baines AT, Fiordalisi JJ, Shipitsin M, Feig LA, Cox AD, et al. Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. *Cancer Cell*. 2005;7(6):533-45.
80. Martin-Urdiroz M, Deeks MJ, Horton CG, Dawe HR, Jourdain I. The Exocyst Complex in Health and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:24.
81. Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J*. 2012;18(2):142-7.
82. Czarnecka AM, Bartnik E, Fiedorowicz M, Rutkowski P. Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13).
83. Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol*. 2008;20(2):183-9.
84. Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):1886-918.

85. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*. 2011;144(5):757-68.
86. Leo MS, Sivamani RK. Phytochemical modulation of the Akt/mTOR pathway and its potential use in cutaneous disease. *Arch Dermatol Res*. 2014;306(10):861-71.
87. Zou Z, Tao T, Li H, Zhu X. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell Biosci*. 2020;10:31.
88. McCain J. The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P T*. 2013;38(2):96-108.
89. Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, Nishida E. ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci*. 2006;97(8):697-702.
90. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*. 2010;463(7278):191-6.
91. Urso C. Melanocytic Skin Neoplasms: What Lesson From Genomic Aberrations? *Am J Dermatopathol*. 2019;41(9):623-9.
92. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
93. Pampena R, Kyrgidis A, Lallas A, Moscarella E, Argenziano G, Longo C. A meta-analysis of nevus-associated melanoma: Prevalence and practical implications. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(5):938-45 e4.
94. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-8.
95. Fedorenko IV, Paraiso KH, Smalley KS. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(3):201-9.
96. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, et al. Melanoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15003.

97. Bollag G, Clapp DW, Shih S, Adler F, Zhang YY, Thompson P, et al. Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nat Genet.* 1996;12(2):144-8.
98. Cirenajwis H, Lauss M, Ekedahl H, Torngren T, Kvist A, Saal LH, et al. NF1-mutated melanoma tumors harbor distinct clinical and biological characteristics. *Mol Oncol.* 2017;11(4):438-51.
99. Feng X, Arang N, Rigracciolo DC, Lee JS, Yeerna H, Wang Z, et al. A Platform of Synthetic Lethal Gene Interaction Networks Reveals that the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene Controls the Hippo Pathway through FAK. *Cancer Cell.* 2019;35(3):457-72 e5.
100. Livingstone E, Zaremba A, Horn S, Ugurel S, Casalini B, Schlaak M, et al. GNAQ and GNA11 mutant nonuveal melanoma: a subtype distinct from both cutaneous and uveal melanoma. *Br J Dermatol.* 2020;183(5):928-39.
101. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA.* 2011;305(22):2327-34.
102. Rossi M, Pellegrini C, Cardelli L, Ciciarelli V, Di Nardo L, Fargnoli MC. Familial Melanoma: Diagnostic and Management Implications. *Dermatol Pract Concept.* 2019;9(1):10-6.
103. Ming Z, Lim SY, Rizos H. Genetic Alterations in the INK4a/ARF Locus: Effects on Melanoma Development and Progression. *Biomolecules.* 2020;10(10).
104. Soto JL, Cabrera CM, Serrano S, Lopez-Nevot MA. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: TP53, CDKN1A, CDKN2A, and CDKN2B. *BMC Cancer.* 2005;5:36.
105. Jilaveanu LB, Aziz SA, Kluger HM. Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do they work? *Clin Dermatol.* 2009;27(6):614-25.
106. Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4738-45.

107. Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, De Vecchis L. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol Res.* 2007;56(4):275-87.
108. Agarwala SS, Kirkwood JM. Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *Oncologist.* 2000;5(2):144-51.
109. Chatelut E. [Pharmacology of platinum compounds: differences between the three molecules and factors of interpatient variability]. *Bull Cancer.* 2011;98(11):1253-61.
110. Mao W, Wu F, Lee RJ, Lu W, Wang J. Development of a stable single-vial liposomal formulation for vincristine. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:4461-74.
111. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2014;25(18):2677-81.
112. Niessner H, Beck D, Sinnberg T, Lasithiotakis K, Maczey E, Gogel J, et al. The farnesyl transferase inhibitor lonafarnib inhibits mTOR signaling and enforces sorafenib-induced apoptosis in melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2011;131(2):468-79.
113. Morgan MA, Ganser A, Reuter CW. Therapeutic efficacy of prenylation inhibitors in the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia.* 2003;17(8):1482-98.
114. Martin LA, Head JE, Pancholi S, Salter J, Quinn E, Detre S, et al. The farnesyltransferase inhibitor R115777 (tipifarnib) in combination with tamoxifen acts synergistically to inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation and cell cycle progression in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(9):2458-67.
115. Inamdar GS, Madhunapantula SV, Robertson GP. Targeting the MAPK pathway in melanoma: why some approaches succeed and other fail. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(5):624-37.
116. Martin NE, Brunner TB, Kiel KD, DeLaney TF, Regine WF, Mohiuddin M, et al. A phase I trial of the dual farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase inhibitor L-778,123 and radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5447-54.

117. Duan J, Tao J, Zhai M, Li C, Zhou N, Lv J, et al. Anticancer drugs-related QTc prolongation, torsade de pointes and sudden death: current evidence and future research perspectives. *Oncotarget*. 2018;9(39):25738-49.
118. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*. 2004;64(19):7099-109.
119. Eisen T, Ahmad T, Flaherty KT, Gore M, Kaye S, Marais R, et al. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br J Cancer*. 2006;95(5):581-6.
120. Brower V. BRAF inhibitors: research accelerates in wake of positive findings. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(4):214-5.
121. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*. 2010;464(7287):431-5.
122. Adnot-Desanlis L, Bernard P, Reguiat Z. [Squamous cell carcinoma in a patient receiving sorafenib]. *Ann Dermatol Venereol*. 2011;138(2):120-3.
123. 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.
124. 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.
125. Grimaldi AM, Simeone E, Ascierto PA. The role of MEK inhibitors in the treatment of metastatic melanoma. *Curr Opin Oncol*. 2014;26(2):196-203.
126. Catalanotti F, Solit DB, Pulitzer MP, Berger MF, Scott SN, Iyriboz T, et al. Phase II trial of MEK inhibitor selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in patients with BRAFV600E/K-mutated melanoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(8):2257-64.

127. Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, et al. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol.* 2017;28(7):1631-9.
128. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med.* 2015;372(1):30-9.
129. Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371(20):1867-76.
130. Ribas A, Algazi A, Ascierto PA, Butler MO, Chandra S, Gordon M, et al. PD-L1 blockade in combination with inhibition of MAPK oncogenic signaling in patients with advanced melanoma. *Nat Commun.* 2020;11(1):6262.
131. Sullivan RJ, Hamid O, Gonzalez R, Infante JR, Patel MR, Hodi FS, et al. Atezolizumab plus cobimetinib and vemurafenib in BRAF-mutated melanoma patients. *Nat Med.* 2019;25(6):929-35.
132. Lee AY, Brady MS. Neoadjuvant immunotherapy for melanoma. *J Surg Oncol.* 2021;123(3):782-8.
133. Ralli M, Botticelli A, Visconti IC, Angeletti D, Fiore M, Marchetti P, et al. Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. *J Immunol Res.* 2020;2020:9235638.
134. Lee MY, Jeon JW, Sievers C, Allen CT. Antigen processing and presentation in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2020;8(2).
135. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature.* 2015;523(7559):231-5.
136. Ruiz de Galarreta M, Bresnahan E, Molina-Sanchez P, Lindblad KE, Maier B, Sia D, et al. beta-Catenin Activation Promotes Immune Escape and Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Discov.* 2019;9(8):1124-41.

137. Ascierto PA, Brugarolas J, Buonaguro L, Butterfield LH, Carbone D, Daniele B, et al. Perspectives in immunotherapy: meeting report from the Immunotherapy Bridge (29-30 November, 2017, Naples, Italy). *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):69.
138. Kim JG, Hahn YS. IFN-gamma inhibits the suppressive effects of PGE2 on the production of tumor necrosis factor-alpha by mouse macrophages. *Immunol Invest*. 2000;29(3):257-69.
139. Hangai S, Ao T, Kimura Y, Matsuki K, Kawamura T, Negishi H, et al. PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(14):3844-9.
140. Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, et al. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol*. 2004;173(6):3844-54.
141. Papaspyridonos M, Matei I, Huang Y, do Rosario Andre M, Brazier-Mitouart H, Waite JC, et al. Id1 suppresses anti-tumour immune responses and promotes tumour progression by impairing myeloid cell maturation. *Nat Commun*. 2015;6:6840.
142. Yang AS, Lattime EC. Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses. *Cancer Res*. 2003;63(9):2150-7.
143. Chew GL, Campbell AE, De Neef E, Sutliff NA, Shadle SC, Tapscott SJ, et al. DUX4 Suppresses MHC Class I to Promote Cancer Immune Evasion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Dev Cell*. 2019;50(5):658-71 e7.
144. Yoshihama S, Roszik J, Downs I, Meissner TB, Vijayan S, Chapuy B, et al. NLRC5/MHC class I transactivator is a target for immune evasion in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(21):5999-6004.
145. Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(12):893-905.
146. Meng X, Liu X, Guo X, Jiang S, Chen T, Hu Z, et al. FBXO38 mediates PD-1 ubiquitination and regulates anti-tumour immunity of T cells. *Nature*. 2018;564(7734):130-5.

147. Larsen M, Appay V, Sauce D. [Influence of PD-1 on the immunological synapse: a facet of immune regulation ?]. *Med Sci (Paris)*. 2013;29(12):1080-2.
148. Turner JA, Stephen-Victor E, Wang S, Rivas MN, Abdel-Gadir A, Harb H, et al. Regulatory T Cell-Derived TGF-beta1 Controls Multiple Checkpoints Governing Allergy and Autoimmunity. *Immunity*. 2020;53(6):1331-2.
149. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2018;560(7718):382-6.
150. Li CW, Lim SO, Chung EM, Kim YS, Park AH, Yao J, et al. Eradication of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Targeting Glycosylated PD-L1. *Cancer Cell*. 2018;33(2):187-201 e10.
151. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2019;381(16):1535-46.
152. Tawbi HA, Forsyth PA, Algazi A, Hamid O, Hodi FS, Moschos SJ, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain. *N Engl J Med*. 2018;379(8):722-30.
153. Pelster MS, Gruschkus SK, Bassett R, Gombos DS, Shephard M, Posada L, et al. Nivolumab and Ipilimumab in Metastatic Uveal Melanoma: Results From a Single-Arm Phase II Study. *J Clin Oncol*. 2021;39(6):599-607.
154. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021;22(2):198-211.
155. Merlino G, Herlyn M, Fisher DE, Bastian BC, Flaherty KT, Davies MA, et al. The state of melanoma: challenges and opportunities. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016;29(4):404-16.
156. Huang R, Rofstad EK. Integrins as therapeutic targets in the organ-specific metastasis of human malignant melanoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):92.

157. Ahmadi M, Rezaie J. Tumor cells derived-exosomes as angiogenic agents: possible therapeutic implications. *J Transl Med.* 2020;18(1):249.
158. Hassel JC, Buder-Bakhaya K, Bender C, Zimmer L, Weide B, Loquai C, et al. Progression patterns under BRAF inhibitor treatment and treatment beyond progression in patients with metastatic melanoma. *Cancer Med.* 2018;7(1):95-104.
159. Caporali S, Alvino E, Lacal PM, Levati L, Giurato G, Memoli D, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway overcomes the stimulating effect of dabrafenib on the invasive behavior of melanoma cells with acquired resistance to the BRAF inhibitor. *Int J Oncol.* 2016;49(3):1164-74.
160. Chan XY, Singh A, Osman N, Piva TJ. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7).
161. Villanueva J, Vultur A, Herlyn M. Resistance to BRAF inhibitors: unraveling mechanisms and future treatment options. *Cancer Res.* 2011;71(23):7137-40.
162. Kakadia S, Yarlagadda N, Awad R, Kundranda M, Niu J, Naraev B, et al. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *Onco Targets Ther.* 2018;11:7095-107.
163. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* 2014;4(1):94-109.
164. Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun.* 2012;3:724.
165. 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.
166. Paraiso KH, Fedorenko IV, Cantini LP, Munko AC, Hall M, Sondak VK, et al. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *Br J Cancer.* 2010;102(12):1724-30.

167. Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW, Abel EV, Chen YA, Munko AC, et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res.* 2011;71(7):2750-60.
168. Cooper ZA, Reuben A, Spencer CN, Prieto PA, Austin-Breneman JL, Jiang H, et al. Distinct clinical patterns and immune infiltrates are observed at time of progression on targeted therapy versus immune checkpoint blockade for melanoma. *Oncoimmunology.* 2016;5(3):e1136044.
169. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell.* 2015;27(1):15-26.
170. Turajlic S, Sottoriva A, Graham T, Swanton C. Resolving genetic heterogeneity in cancer. *Nat Rev Genet.* 2019;20(7):404-16.
171. Shannan B, Perego M, Somasundaram R, Herlyn M. Heterogeneity in Melanoma. *Cancer Treat Res.* 2016;167:1-15.
172. Gerlinger M, Swanton C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer.* 2010;103(8):1139-43.
173. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell.* 2006;126(1):107-20.
174. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science.* 2006;312(5780):1650-3.
175. Kumar PR, Moore JA, Bowles KM, Rushworth SA, Moncrieff MD. Mitochondrial oxidative phosphorylation in cutaneous melanoma. *Br J Cancer.* 2021;124(1):115-23.
176. Zhu A, Lee D, Shim H. Metabolic positron emission tomography imaging in cancer detection and therapy response. *Semin Oncol.* 2011;38(1):55-69.
177. Marbaniang C, Kma L. Dysregulation of Glucose Metabolism by Oncogenes and Tumor Suppressors in Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(9):2377-90.
178. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett.* 2015;356(2 Pt A):156-64.

179. Haq R, Fisher DE, Widlund HR. Molecular pathways: BRAF induces bioenergetic adaptation by attenuating oxidative phosphorylation. *Clin Cancer Res.* 2014;20(9):2257-63.
180. Kawakami A, Fisher DE. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab Invest.* 2017;97(6):649-56.
181. Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(7):1249-60.
182. Abildgaard C, Guldborg P. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. *Trends Mol Med.* 2015;21(3):164-71.
183. Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer Cell.* 2013;23(3):302-15.
184. Wong DJ, Ribas A. Targeted Therapy for Melanoma. *Cancer Treat Res.* 2016;167:251-62.
185. Avagliano A, Fiume G, Pelagalli A, Sanita G, Ruocco MR, Montagnani S, et al. Metabolic Plasticity of Melanoma Cells and Their Crosstalk With Tumor Microenvironment. *Front Oncol.* 2020;10:722.
186. Kim JW, Kuk MU, Choy HE, Park SC, Park JT. Mitochondrial metabolic reprogramming via BRAF inhibition ameliorates senescence. *Exp Gerontol.* 2019;126:110691.
187. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:441-64.
188. 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.
189. Dal Yontem F, Kim SH, Ding Z, Grimm E, Ekmekcioglu S, Akcakaya H. Mitochondrial dynamic alterations regulate melanoma cell progression. *J Cell Biochem.* 2018.
190. Akita M, Suzuki-Karasaki M, Fujiwara K, Nakagawa C, Soma M, Yoshida Y, et al. Mitochondrial division inhibitor-1 induces mitochondrial hyperfusion and sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol.* 2014;45(5):1901-12.

191. Senft D, Ronai ZA. Regulators of mitochondrial dynamics in cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2016;39:43-52.
192. Cassim S, Vucetic M, Zdravcic M, Pouyssegur J. Warburg and Beyond: The Power of Mitochondrial Metabolism to Collaborate or Replace Fermentative Glycolysis in Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(5).
193. Iommarini L, Ghelli A, Gasparre G, Porcelli AM. Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2017;1858(8):582-90.
194. Reina-Campos M, Moscat J, Diaz-Meco M. Metabolism shapes the tumor microenvironment. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;48:47-53.
195. Galbo PM, Jr., Zang X, Zheng D. Molecular Features of Cancer-associated Fibroblast Subtypes and their Implication on Cancer Pathogenesis, Prognosis, and Immunotherapy Resistance. *Clin Cancer Res.* 2021;27(9):2636-47.
196. Kuzet SE, Gaggioli C. Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):607-19.
197. Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Zhou J, et al. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFkappaB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle.* 2010;9(17):3515-33.
198. Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, Migneco G, Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, et al. HIF1-alpha functions as a tumor promoter in cancer associated fibroblasts, and as a tumor suppressor in breast cancer cells: Autophagy drives compartment-specific oncogenesis. *Cell Cycle.* 2010;9(17):3534-51.
199. Nazemi M, Rainero E. Cross-Talk Between the Tumor Microenvironment, Extracellular Matrix, and Cell Metabolism in Cancer. *Front Oncol.* 2020;10:239.
200. Bensaad K, Harris AL. Hypoxia and metabolism in cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014;772:1-39.
201. Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Cancer.* 2019;18(1):157.

202. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 2010;20(1):51-6.
203. Huang Y, Lin D, Taniguchi CM. Hypoxia inducible factor (HIF) in the tumor microenvironment: friend or foe? *Sci China Life Sci.* 2017;60(10):1114-24.
204. Nowosad A, Jeannot P, Callot C, Creff J, Perchey RT, Joffre C, et al. p27 controls Ragulator and mTOR activity in amino acid-deprived cells to regulate the autophagy-lysosomal pathway and coordinate cell cycle and cell growth. *Nat Cell Biol.* 2020;22(9):1076-90.
205. Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1776-83.
206. Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature.* 2012;485(7400):661-5.
207. Endo H, Owada S, Inagaki Y, Shida Y, Tatemichi M. Glucose starvation induces LKB1-AMPK-mediated MMP-9 expression in cancer cells. *Sci Rep.* 2018;8(1):10122.
208. Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep.* 2006;7(3):271-5.
209. Kalimuthu K, Kim JH, Park YS, Luo X, Zhang L, Ku JL, et al. Glucose deprivation-induced endoplasmic reticulum stress response plays a pivotal role in enhancement of TRAIL cytotoxicity. *J Cell Physiol.* 2021;236(9):6666-77.
210. Eigner K, Filik Y, Mark F, Schutz B, Klambauer G, Moriggl R, et al. The unfolded protein response impacts melanoma progression by enhancing FGF expression and can be antagonized by a chemical chaperone. *Sci Rep.* 2017;7(1):17498.
211. Kadowaki H, Nishitoh H. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes (Basel).* 2013;4(3):306-33.
212. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol.* 2018;9:3083.

213. Lazova R, Klump V, Pawelek J. Autophagy in cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol.* 2010;37(2):256-68.
214. Deegan S, Saveljeva S, Gorman AM, Samali A. Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(14):2425-41.
215. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2005;2(1):9-19.
216. Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell.* 2007;25(2):193-205.
217. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(6):596-603.
218. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem.* 2009;284(18):12297-305.
219. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell.* 2009;20(7):1992-2003.
220. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell.* 2009;20(7):1981-91.
221. Reimertz C, Kogel D, Rami A, Chittenden T, Prehn JH. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Cell Biol.* 2003;162(4):587-97.
222. Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, et al. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 2009;36(3):487-99.

223. D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 20):3771-8.
224. Selimovic D, Ahmad M, El-Khattouti A, Hannig M, Haikel Y, Hassan M. Apoptosis-related protein-2 triggers melanoma cell death by a mechanism including both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysregulation. *Carcinogenesis.* 2011;32(8):1268-78.
225. Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2006;26(24):9220-31.
226. Darling NJ, Cook SJ. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(10):2150-63.
227. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018;25(1):104-13.
228. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003;22(53):8590-607.
229. Chew V, Toh HC, Abastado JP. Immune microenvironment in tumor progression: characteristics and challenges for therapy. *J Oncol.* 2012;2012:608406.
230. Cham CM, Driessens G, O'Keefe JP, Gajewski TF. Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2008;38(9):2438-50.
231. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell.* 2015;162(6):1229-41.
232. Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, Zhang L, Smith KL, Morel CR, et al. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab.* 2006;4(1):13-24.

233. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* 2016;24(5):657-71.
234. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature.* 2014;513(7519):559-63.
235. Kim TK, Park CS, Jang J, Kim MR, Na HJ, Lee K, et al. Inhibition of VEGF-dependent angiogenesis and tumor angiogenesis by an optimized antibody targeting CLEC14a. *Mol Oncol.* 2018;12(3):356-72.
236. Li M, Zhang M, Qian Y, Shi G, Wang R. Ammonia toxicity in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): The mechanistic insight from physiological detoxification to poisoning. *Fish Shellfish Immunol.* 2020;102:195-202.
237. Chen D, Xie J, Fiskesund R, Dong W, Liang X, Lv J, et al. Chloroquine modulates antitumor immune response by resetting tumor-associated macrophages toward M1 phenotype. *Nat Commun.* 2018;9(1):873.
238. Tessema M, Klinge DM, Yingling CM, Do K, Van Neste L, Belinsky SA. Re-expression of CXCL14, a common target for epigenetic silencing in lung cancer, induces tumor necrosis. *Oncogene.* 2010;29(37):5159-70.
239. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001;410(6824):50-6.
240. Biasci D, Smoragiewicz M, Connell CM, Wang Z, Gao Y, Thaventhiran JED, et al. CXCR4 inhibition in human pancreatic and colorectal cancers induces an integrated immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(46):28960-70.
241. Dangaj D, Bruand M, Grimm AJ, Ronet C, Barras D, Duttagupta PA, et al. Cooperation between Constitutive and Inducible Chemokines Enables T Cell Engraftment and Immune Attack in Solid Tumors. *Cancer Cell.* 2019;35(6):885-900 e10.
242. Griss J, Bauer W, Wagner C, Simon M, Chen M, Grabmeier-Pfistershammer K, et al. B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma. *Nat Commun.* 2019;10(1):4186.

243. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* 2011;1(1):54-67.
244. Maleki Vareki S. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):157.
245. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med.* 2013;5(200):200ra116.
246. Lob S, Konigsrainer A, Schafer R, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. *Blood.* 2008;111(4):2152-4.
247. Sugimoto H, Oda S, Otsuki T, Hino T, Yoshida T, Shiro Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(8):2611-6.
248. Wen Q, Liu J, Kang R, Zhou B, Tang D. The release and activity of HMGB1 in ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;510(2):278-83.
249. Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol.* 2005;6(8):777-84.
250. Hammink R, Mandal S, Eggermont LJ, Nootboom M, Willems PH, Tel J, et al. Controlling T-Cell Activation with Synthetic Dendritic Cells Using the Multivalency Effect. *ACS Omega.* 2017;2(3):937-45.
251. Ghiasi N, Habibagahi M, Rosli R, Ghaderi A, Yusoff K, Hosseini A, et al. Tumor suppressive effects of WEE1 gene silencing could not enhance immunopotential effects of CD80 and 4-1BBL co-stimulation in human T cells. *J Cancer Res Ther.* 2015;11(4):708-16.

252. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009;114(8):1537-44.
253. Benci JL, Johnson LR, Choa R, Xu Y, Qiu J, Zhou Z, et al. Opposing Functions of Interferon Coordinate Adaptive and Innate Immune Responses to Cancer Immune Checkpoint Blockade. *Cell*. 2019;178(4):933-48 e14.
254. Czystowska M, Strauss L, Bergmann C, Szajnik M, Rabinowich H, Whiteside TL. Reciprocal granzyme/perforin-mediated death of human regulatory and responder T cells is regulated by interleukin-2 (IL-2). *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(6):577-88.
255. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*. 2007;204(6):1303-10.
256. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(8):599-609.
257. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2018;9:3176.
258. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:267-96.
259. Fan Y, Mao R, Yang J. NF-kappaB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*. 2013;4(3):176-85.
260. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med*. 2019;18(3):121-6.
261. Feng S, Cheng X, Zhang L, Lu X, Chaudhary S, Teng R, et al. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell activation through nitrating LCK in mouse cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(40):10094-9.
262. Qin Y, Ekmekcioglu S, Liu P, Duncan LM, Lizee G, Poindexter N, et al. Constitutive aberrant endogenous interleukin-1 facilitates inflammation and growth in human melanoma. *Mol Cancer Res*. 2011;9(11):1537-50.

263. Gui DY, Sullivan LB, Luengo A, Hosios AM, Bush LN, Gitego N, et al. Environment Dictates Dependence on Mitochondrial Complex I for NAD⁺ and Aspartate Production and Determines Cancer Cell Sensitivity to Metformin. *Cell Metab.* 2016;24(5):716-27.
264. 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.
265. Sirnio P, Vayrynen JP, Klintrup K, Makela J, Karhu T, Herzig KH, et al. Alterations in serum amino-acid profile in the progression of colorectal cancer: associations with systemic inflammation, tumour stage and patient survival. *Br J Cancer.* 2019;120(2):238-46.
266. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 2011;475(7355):222-5.
267. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8508-15.
268. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, et al. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol.* 2009;183(10):6469-77.
269. Wu Y, Antony S, Meitzler JL, Doroshow JH. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. *Cancer Lett.* 2014;345(2):164-73.
270. Oberkamp M, Guillerey C, Mouries J, Rosenbaum P, Fayolle C, Bobard A, et al. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the induction of CD8(+) T cells by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Commun.* 2018;9(1):2241.
271. Tse HM, Thayer TC, Steele C, Cuda CM, Morel L, Piganelli JD, et al. NADPH oxidase deficiency regulates Th lineage commitment and modulates autoimmunity. *J Immunol.* 2010;185(9):5247-58.

272. Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem*. 2003;278(8):5557-63.
273. Sanz A, Caro P, Gomez J, Barja G. Testing the vicious cycle theory of mitochondrial ROS production: effects of H₂O₂ and cumene hydroperoxide treatment on heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 2006;38(2):121-7.
274. Martinez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res*. 2015;21(22):5047-56.
275. Schuster IS, Coudert JD, Andoniou CE, Degli-Esposti MA. "Natural Regulators": NK Cells as Modulators of T Cell Immunity. *Front Immunol*. 2016;7:235.
276. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res*. 2003;90:127-56.
277. Holzel M, Tuting T. Inflammation-Induced Plasticity in Melanoma Therapy and Metastasis. *Trends Immunol*. 2016;37(6):364-74.
278. Furumaya C, Martinez-Sanz P, Bouti P, Kuijpers TW, Matlung HL. Plasticity in Pro- and Anti-tumor Activity of Neutrophils: Shifting the Balance. *Front Immunol*. 2020;11:2100.
279. Wu L, Saxena S, Awaji M, Singh RK. Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4).
280. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):263.
281. Rath S, Sharma R, Gupta R, Ast T, Chan C, Durham TJ, et al. MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D1541-D7.
282. Burke PJ. Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. *Trends Cancer*. 2017;3(12):857-70.
283. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*. 2006;9(6):425-34.

284. Kozlov AM, Lone A, Betts DH, Cumming RC. Lactate preconditioning promotes a HIF-1 α -mediated metabolic shift from OXPHOS to glycolysis in normal human diploid fibroblasts. *Sci Rep.* 2020;10(1):8388.
285. Chen L, Zhang Z, Hoshino A, Zheng HD, Morley M, Arany Z, et al. NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism. *Nat Metab.* 2019;1:404-15.
286. Li Q, Qin T, Bi Z, Hong H, Ding L, Chen J, et al. Rac1 activates non-oxidative pentose phosphate pathway to induce chemoresistance of breast cancer. *Nat Commun.* 2020;11(1):1456.
287. Demotte N, Stroobant V, Courtoy PJ, Van Der Smissen P, Colau D, Luescher IF, et al. Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity.* 2008;28(3):414-24.
288. 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.
289. Bohn T, Rapp S, Luther N, Klein M, Bruehl TJ, Kojima N, et al. Tumor immunoevasion via acidosis-dependent induction of regulatory tumor-associated macrophages. *Nat Immunol.* 2018;19(12):1319-29.
290. Griguer CE, Oliva CR, Gillespie GY. Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines. *J Neurooncol.* 2005;74(2):123-33.
291. Cai Z, Li CF, Han F, Liu C, Zhang A, Hsu CC, et al. Phosphorylation of PDHA by AMPK Drives TCA Cycle to Promote Cancer Metastasis. *Mol Cell.* 2020;80(2):263-78 e7.
292. Yetkin-Arik B, Vogels IMC, Nowak-Sliwinska P, Weiss A, Houtkooper RH, Van Noorden CJF, et al. The role of glycolysis and mitochondrial respiration in the formation and functioning of endothelial tip cells during angiogenesis. *Sci Rep.* 2019;9(1):12608.
293. Bratic I, Trifunovic A. Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(6-7):961-7.
294. Kovarova J, Barrett MP. The Pentose Phosphate Pathway in Parasitic Trypanosomatids. *Trends Parasitol.* 2016;32(8):622-34.

295. Ge T, Yang J, Zhou S, Wang Y, Li Y, Tong X. The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:365.
296. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010;327(5963):291-5.
297. Korolenko TA, Bgatova NP, Vetvicka V. Glucan and Mannan-Two Peas in a Pod. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
298. Kowalinski E, Louber J, Gerlier D, Cusack S. [RIG-I: a viral RNA detector molecular switch]. *Med Sci (Paris)*. 2012;28(2):136-8.
299. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5(10):987-95.
300. Banoth B, Cassel SL. Mitochondria in innate immune signaling. *Transl Res*. 2018;202:52-68.
301. Toksoy A, Sennefelder H, Adam C, Hofmann S, Trautmann A, Goebeler M, et al. Potent NLRP3 Inflammasome Activation by the HIV Reverse Transcriptase Inhibitor Abacavir. *J Biol Chem*. 2017;292(7):2805-14.
302. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;469(7329):221-5.
303. Julian MW, Shao G, Vangundy ZC, Papenfuss TL, Crouser ED. Mitochondrial transcription factor A, an endogenous danger signal, promotes TNF α release via RAGE- and TLR9-responsive plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One*. 2013;8(8):e72354.
304. Mi Wi S, Park J, Shim JH, Chun E, Lee KY. Ubiquitination of ECSIT is crucial for the activation of p65/p50 NF-kappaBs in Toll-like receptor 4 signaling. *Mol Biol Cell*. 2015;26(1):151-60.
305. 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.
306. Martinez-Redondo V, Pettersson AT, Ruas JL. The hitchhiker's guide to PGC-1 α isoform structure and biological functions. *Diabetologia*. 2015;58(9):1969-77.

307. 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.
308. 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.
309. 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.
310. 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.
311. Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB, et al. PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem*. 2003;278(33):30843-8.
312. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 2003;423(6939):550-5.
313. 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.
314. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*. 2000;20(5):1868-76.
315. Rowe GC, Jiang A, Arany Z. PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circ Res*. 2010;107(7):825-38.
316. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 2005;1(6):361-70.

317. Venditti P, Bari A, Di Stefano L, Cardone A, Della Ragione F, D'Esposito M, et al. Involvement of PGC-1, NRF-1, and NRF-2 in metabolic response by rat liver to hormonal and environmental signals. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;305(1-2):22-9.
318. Feingold K, Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Grunfeld C. Altered expression of nuclear hormone receptors and coactivators in mouse heart during the acute-phase response. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286(2):E201-7.
319. 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.
320. Kupr B, Handschin C. Complex Coordination of Cell Plasticity by a PGC-1alpha-controlled Transcriptional Network in Skeletal Muscle. *Front Physiol*. 2015;6:325.
321. Aguilo F, Li S, Balasubramaniyan N, Sancho A, Benko S, Zhang F, et al. Deposition of 5-Methylcytosine on Enhancer RNAs Enables the Coactivator Function of PGC-1alpha. *Cell Rep*. 2016;14(3):479-92.
322. Kressler D, Hock MB, Kralli A. Coactivators PGC-1beta and SRC-1 interact functionally to promote the agonist activity of the selective estrogen receptor modulator tamoxifen. *J Biol Chem*. 2007;282(37):26897-907.
323. Kawakami Y, Tsuda M, Takahashi S, Taniguchi N, Esteban CR, Zemmyo M, et al. Transcriptional coactivator PGC-1alpha regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(7):2414-9.
324. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1269-78.
325. LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, et al. PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. 2014;16(10):992-1003, 1-15.
326. McMeekin LJ, Fox SN, Boas SM, Cowell RM. Dysregulation of PGC-1alpha-Dependent Transcriptional Programs in Neurological and Developmental Disorders: Therapeutic Challenges and Opportunities. *Cells*. 2021;10(2).

327. Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, et al. PGC-1 α and PGC-1 β specify PGC-1 α -dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(17):6570-5.
328. Jash S, Banerjee S, Lee MJ, Farmer SR, Puri V. CIDEA Transcriptionally Regulates UCP1 for Browning and Thermogenesis in Human Fat Cells. *iScience*. 2019;20:73-89.
329. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, et al. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol*. 2005;3(4):e101.
330. 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.
331. Li Y, Sun XX, Qian DZ, Dai MS. Molecular Crosstalk Between MYC and HIF in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:590576.
332. Gao Y, Yang F, Yang XA, Zhang L, Yu H, Cheng X, et al. Mitochondrial metabolism is inhibited by the HIF1 α -MYC-PGC-1 β axis in BRAF V600E thyroid cancer. *FEBS J*. 2019;286(7):1420-36.
333. Piccinin E, Peres C, Bellafante E, Ducheix S, Pinto C, Villani G, et al. Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 β drives mitochondrial and anabolic signatures that contribute to hepatocellular carcinoma progression in mice. *Hepatology*. 2018;67(3):884-98.
334. Choi HJ, Jhe YL, Kim J, Lim JY, Lee JE, Shin MK, et al. FoxM1-dependent and fatty acid oxidation-mediated ROS modulation is a cell-intrinsic drug resistance mechanism in cancer stem-like cells. *Redox Biol*. 2020;36:101589.
335. Guo R, Zong S, Wu M, Gu J, Yang M. Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. *Cell*. 2017;170(6):1247-57 e12.
336. Weinberg SE, Chandel NS. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol*. 2015;11(1):9-15.
337. Sazanov LA, Hinchliffe P. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science*. 2006;311(5766):1430-6.

338. Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, et al. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*. 2005;121(7):1043-57.
339. Gao X, Wen X, Esser L, Quinn B, Yu L, Yu CA, et al. Structural basis for the quinone reduction in the bc1 complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc1 with bound substrate and inhibitors at the Qi site. *Biochemistry*. 2003;42(30):9067-80.
340. Shimada S, Shinzawa-Itoh K, Baba J, Aoe S, Shimada A, Yamashita E, et al. Complex structure of cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel protein-protein interaction mode. *EMBO J*. 2017;36(3):291-300.
341. Watt IN, Montgomery MG, Runswick MJ, Leslie AG, Walker JE. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(39):16823-7.
342. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003;552(Pt 2):335-44.
343. Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol*. 2013;1:304-12.
344. Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(20):7607-12.
345. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J*. 2002;368(Pt 2):545-53.
346. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.
347. Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2005;66(3):562-73.

348. Theodosakis N, Micevic G, Kelly DP, Bosenberg M. Mitochondrial function in melanoma. *Arch Biochem Biophys*. 2014;563:56-9.
349. Sander CS, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2003;148(5):913-22.
350. Shahin AY, Hassanin IM, Ismail AM, Kruessel JS, Hirchenhain J. Effect of oral N-acetyl cysteine on recurrent preterm labor following treatment for bacterial vaginosis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;104(1):44-8.
351. Hamad I, Arda N, Pekmez M, Karaer S, Temizkan G. Intracellular scavenging activity of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Nat Sci Biol Med*. 2010;1(1):16-21.
352. Chen CY, Chen CH, Lo YC, Wu BN, Wang HM, Lo WL, et al. Anticancer activity of isoobtusilactone A from *Cinnamomum kotoense*: involvement of apoptosis, cell-cycle dysregulation, mitochondria regulation, and reactive oxygen species. *J Nat Prod*. 2008;71(6):933-40.
353. 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.
354. Mastropasqua F, Girolimetti G, Shoshan M. PGC1alpha: Friend or Foe in Cancer? *Genes (Basel)*. 2018;9(1).
355. 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.
356. 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.
357. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010;11(10):889-96.

358. Viola A, Munari F, Sanchez-Rodriguez R, Scolaro T, Castegna A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol.* 2019;10:1462.
359. Bronkhorst IH, Ly LV, Jordanova ES, Vrolijk J, Versluis M, Luyten GP, et al. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(2):643-50.
360. Eisele PS, Handschin C. Functional crosstalk of PGC-1 coactivators and inflammation in skeletal muscle pathophysiology. *Semin Immunopathol.* 2014;36(1):27-53.
361. Chan MH, McGee SL, Watt MJ, Hargreaves M, Febbraio MA. Altering dietary nutrient intake that reduces glycogen content leads to phosphorylation of nuclear p38 MAP kinase in human skeletal muscle: association with IL-6 gene transcription during contraction. *FASEB J.* 2004;18(14):1785-7.
362. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(2):E433-7.
363. Yuk JM, Kim TS, Kim SY, Lee HM, Han J, Dufour CR, et al. Orphan Nuclear Receptor ERRalpha Controls Macrophage Metabolic Signaling and A20 Expression to Negatively Regulate TLR-Induced Inflammation. *Immunity.* 2015;43(1):80-91.
364. Irie T, Muta T, Takeshige K. TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett.* 2000;467(2-3):160-4.
365. 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.
366. Wan Z, Root-McCaig J, Castellani L, Kemp BE, Steinberg GR, Wright DC. Evidence for the role of AMPK in regulating PGC-1 alpha expression and mitochondrial proteins in mouse epididymal adipose tissue. *Obesity (Silver Spring).* 2014;22(3):730-8.
367. Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(29):12017-22.

368. Rytinki MM, Palvimo JJ. SUMOylation attenuates the function of PGC-1alpha. *J Biol Chem.* 2009;284(38):26184-93.
369. Trausch-Azar J, Leone TC, Kelly DP, Schwartz AL. Ubiquitin proteasome-dependent degradation of the transcriptional coactivator PGC-1{alpha} via the N-terminal pathway. *J Biol Chem.* 2010;285(51):40192-200.
370. Wei P, Guo J, Xue W, Zhao Y, Yang J, Wang J. RNF34 modulates the mitochondrial biogenesis and exercise capacity in muscle and lipid metabolism through ubiquitination of PGC-1 in *Drosophila*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2018;50(10):1038-46.
371. Wareski P, Vaarmann A, Choubey V, Safiulina D, Liiv J, Kuum M, et al. PGC-1{alpha} and PGC-1{beta} regulate mitochondrial density in neurons. *J Biol Chem.* 2009;284(32):21379-85.
372. Rodgers JT, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(31):12861-6.
373. Park DR, Kim JS, Kim CK. The effect of SIRT1 protein knock down on PGC-1alpha acetylation during skeletal muscle contraction. *J Exerc Nutrition Biochem.* 2014;18(1):1-7.
374. Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C, et al. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell.* 2008;14(4):312-23.
375. Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev.* 2004;18(2):157-69.
376. Dietrich CG, Martin IV, Porn AC, Voigt S, Gartung C, Trautwein C, et al. Fasting induces basolateral uptake transporters of the SLC family in the liver via HNF4alpha and PGC1alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(3):G585-90.
377. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature.* 2005;434(7029):113-8.

378. Yang J, Staples O, Thomas LW, Briston T, Robson M, Poon E, et al. Human CHCHD4 mitochondrial proteins regulate cellular oxygen consumption rate and metabolism and provide a critical role in hypoxia signaling and tumor progression. *J Clin Invest.* 2012;122(2):600-11.
379. King ON, Li XS, Sakurai M, Kawamura A, Rose NR, Ng SS, et al. Quantitative high-throughput screening identifies 8-hydroxyquinolines as cell-active histone demethylase inhibitors. *PLoS One.* 2010;5(11):e15535.
380. Zhao X, Leon IR, Bak S, Mogensen M, Wrzesinski K, Hojlund K, et al. Phosphoproteome analysis of functional mitochondria isolated from resting human muscle reveals extensive phosphorylation of inner membrane protein complexes and enzymes. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(1):M110 000299.
381. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* 2010;29(5):625-34.
382. Zampieri LX, Grasso D, Bouzin C, Brusa D, Rossignol R, Sonveaux P. Mitochondria Participate in Chemoresistance to Cisplatin in Human Ovarian Cancer Cells. *Mol Cancer Res.* 2020;18(9):1379-91.
383. Yun CW, Lee JH, Lee SH. Hypoxia-induced PGC-1alpha Regulates Mitochondrial Function and Tumorigenesis of Colorectal Cancer Cells. *Anticancer Res.* 2019;39(9):4865-76.
384. Shimano H, Sato R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology - divergent pathophysiology. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(12):710-30.
385. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 2004;86(11):839-48.
386. Lee SD, Tontonoz P. Liver X receptors at the intersection of lipid metabolism and atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2015;242(1):29-36.
387. Laucikienė J, Ryden M. Liver X receptors and fat cell metabolism. *Int J Obes (Lond).* 2012;36(12):1494-502.

388. Otsuki T, Nakamura F, Zempo-Miyaki A. Nitric Oxide and Decreases in Resistance Exercise Blood Pressure With Aerobic Exercise Training in Older Individuals. *Front Physiol.* 2019;10:1204.
389. Merkus D, Houweling B, Zarbanoui A, Duncker DJ. Interaction between prostanoids and nitric oxide in regulation of systemic, pulmonary, and coronary vascular tone in exercising swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(3):H1114-23.
390. Branyan KW, Devallance ER, Lemaster KA, Skinner RC, Bryner RW, Olfert IM, et al. Role of Chronic Stress and Exercise on Microvascular Function in Metabolic Syndrome. *Med Sci Sports Exerc.* 2018;50(5):957-66.
391. Lira VA, Brown DL, Lira AK, Kavazis AN, Soltow QA, Zeanah EH, et al. Nitric oxide and AMPK cooperatively regulate PGC-1 in skeletal muscle cells. *J Physiol.* 2010;588(Pt 18):3551-66.
392. Kulisz A, Chen N, Chandel NS, Shao Z, Schumacker PT. Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(6):L1324-9.
393. Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem.* 2007;282(1):194-9.
394. Thirupathi A, de Souza CT. Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise. *J Physiol Biochem.* 2017;73(4):487-94.
395. Chan MC, Arany Z. The many roles of PGC-1alpha in muscle--recent developments. *Metabolism.* 2014;63(4):441-51.
396. De Vitto H, Bode AM, Dong Z. The PGC-1/ERR network and its role in precision oncology. *NPJ Precis Oncol.* 2019;3:9.
397. 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.

398. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hebrard S, Lantier L, Mounier R, et al. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;196(1):81-98.
399. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(4):884S-90.
400. Liang HL, Dhar SS, Wong-Riley MT. p38 mitogen-activated protein kinase and calcium channels mediate signaling in depolarization-induced activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in neurons. *J Neurosci Res*. 2010;88(3):640-9.
401. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 2006;127(6):1109-22.
402. Higashida K, Kim SH, Jung SR, Asaka M, Holloszy JO, Han DH. Effects of resveratrol and SIRT1 on PGC-1alpha activity and mitochondrial biogenesis: a reevaluation. *PLoS Biol*. 2013;11(7):e1001603.
403. 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.
404. Malinee M, Pandian GN, Sugiyama H. Targeted epigenetic induction of mitochondrial biogenesis enhances antitumor immunity in mouse model. *Cell Chem Biol*. 2021.
405. Zhang LN, Zhou HY, Fu YY, Li YY, Wu F, Gu M, et al. Novel small-molecule PGC-1alpha transcriptional regulator with beneficial effects on diabetic db/db mice. *Diabetes*. 2013;62(4):1297-307.
406. Johri A, Calingasan NY, Hennessey TM, Sharma A, Yang L, Wille E, et al. Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2012;21(5):1124-37.

407. Ratnikov BI, Scott DA, Osterman AL, Smith JW, Ronai ZA. Metabolic rewiring in melanoma. *Oncogene*. 2017;36(2):147-57.
408. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016;23(1):27-47.
409. 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).
410. 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.
411. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
412. Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(13):1270-1.
413. 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.
414. 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.
415. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(3):133-50.
416. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov*. 2018;8(9):1069-86.
417. 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.

418. 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.
419. Cerezo M, Rocchi S. Cancer cell metabolic reprogramming: a keystone for the response to immunotherapy. *Cell Death Dis.* 2020;11(11):964.
420. 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.
421. Roh M, Wainwright DA, Wu JD, Wan Y, Zhang B. Targeting CD73 to augment cancer immunotherapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2020;53:66-76.
422. Moon YW, Hajjar J, Hwu P, Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer.* 2015;3:51.
423. 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.
424. Smith LK, Rao AD, McArthur GA. Targeting metabolic reprogramming as a potential therapeutic strategy in melanoma. *Pharmacol Res.* 2016;107:42-7.
425. 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.
426. Gravel SP. Deciphering the Dichotomous Effects of PGC-1alpha on Tumorigenesis and Metastasis. *Front Oncol.* 2018;8:75.
427. 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.
428. 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.

429. 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.
430. Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D1251-7.
431. 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.
432. El Meskini R, Atkinson D, Kulaga A, Abdelmaksoud A, Gumprecht M, Pate N, et al. Distinct Biomarker Profiles and TCR Sequence Diversity Characterize the Response to PD-L1 Blockade in a Mouse Melanoma Model. *Mol Cancer Res*. 2021;19(8):1422-36.
433. Mudunuri U, Che A, Yi M, Stephens RM. bioDBnet: the biological database network. *Bioinformatics*. 2009;25(4):555-6.
434. Zambelli F, Pesole G, Pavesi G. Pscan: finding over-represented transcription factor binding site motifs in sequences from co-regulated or co-expressed genes. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Web Server issue):W247-52.
435. Cancer Genome Atlas N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161(7):1681-96.
436. 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.
437. Cha JH, Chan LC, Li CW, Hsu JL, Hung MC. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol Cell*. 2019;76(3):359-70.
438. 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.
439. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med*. 2014;211(5):781-90.
440. 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.

441. Betzler AC, Theodoraki MN, Schuler PJ, Doscher J, Laban S, Hoffmann TK, et al. NF-kappaB and Its Role in Checkpoint Control. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11).
442. Wang W, Chapman NM, Zhang B, Li M, Fan M, Laribee RN, et al. Upregulation of PD-L1 via HMGB1-Activated IRF3 and NF-kappaB Contributes to UV Radiation-Induced Immune Suppression. *Cancer Res.* 2019;79(11):2909-22.
443. Wellenstein MD, de Visser KE. Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. *Immunity.* 2018;48(3):399-416.
444. 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.
445. 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.
446. 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.
447. Zaidi AH, Kelly RJ, Gorbunova A, Omstead AN, Salvitti MS, Zheng P, et al. Intratumoral immunotherapy with STING agonist, ADU-S100, induces CD8+ T-cell mediated anti-tumor immunity in an esophageal adenocarcinoma model. *Oncotarget.* 2021;12(4):292-303.
448. 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.
449. 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.
450. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res.* 2011;21(1):103-15.

451. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004;23(12):2369-80.
452. Rothgiesser KM, Erener S, Waibel S, Luscher B, Hottiger MO. SIRT2 regulates NF-kappaB dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 24):4251-8.
453. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature.* 2013;496(7444):238-42.
454. Yogev O, Yogev O, Singer E, Shaulian E, Goldberg M, Fox TD, et al. Fumarase: a mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the DNA damage response. *PLoS Biol.* 2010;8(3):e1000328.
455. Martinez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun.* 2020;11(1):102.
456. 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.
457. 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.
458. 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.
459. 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.

460. 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.
461. 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.
462. 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.
463. 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.
464. Yokoyama S, Takahashi A, Kikuchi R, Nishibu S, Lo JA, Hejna M, et al. SOX10 regulates melanoma immunogenicity through an IRF4-IRF1 axis. *Cancer Res.* 2021.
465. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(11):1366-79.
466. Kozar I, Margue C, Rothengatter S, Haan C, Kreis S. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2019;1871(2):313-22.
467. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell.* 2017;168(4):707-23.
468. Smalley KS, Eroglu Z, Sondak VK. Combination Therapies for Melanoma: A New Standard of Care? *Am J Clin Dermatol.* 2016;17(2):99-105.
469. Luo C, Widlund HR, Puigserver P. PGC-1 Coactivators: Shepherding the Mitochondrial Biogenesis of Tumors. *Trends Cancer.* 2016;2(10):619-31.
470. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1):25-9.

471. Gene Ontology C. The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D325-D34.
472. Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S, et al. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics.* 2009;25(2):288-9.
473. Thul PJ, Akesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, et al. A subcellular map of the human proteome. *Science.* 2017;356(6340).
474. Audet-Walsh E, Papadopoli DJ, Gravel SP, Yee T, Bridon G, Caron M, et al. The PGC-1alpha/ERRalpha Axis Represses One-Carbon Metabolism and Promotes Sensitivity to Anti-folate Therapy in Breast Cancer. *Cell Rep.* 2016;14(4):920-31.
475. Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol.* 2015;17(7):829-38.
476. Corazzari M, Rapino F, Ciccocanti F, Giglio P, Antonioli M, Conti B, et al. Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition resulting in increased basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma. *Cell Death Differ.* 2015;22(6):946-58.
477. Hersey P, Zhang XD. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008;21(3):358-67.
478. Tcherkezian J, Cargnello M, Romeo Y, Huttlin EL, Lavoie G, Gygi SP, et al. Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes Dev.* 2014;28(4):357-71.
479. Wang J, Perry CJ, Meeth K, Thakral D, Damsky W, Micevic G, et al. UV-induced somatic mutations elicit a functional T cell response in the YUMMER1.7 mouse melanoma model. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2017;30(4):428-35.
480. Wang J, Saffold S, Cao X, Krauss J, Chen W. Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines. *J Immunol.* 1998;161(10):5516-24.
481. Seliger B, Wollscheid U, Momburg F, Blankenstein T, Huber C. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res.* 2001;61(3):1095-9.

482. 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.
483. 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.
484. Gelato KA, Schockel L, Klingbeil O, Ruckert T, Lesche R, Toedling J, et al. Super-enhancers define a proliferative PGC-1alpha-expressing melanoma subgroup sensitive to BET inhibition. *Oncogene.* 2018;37(4):512-21.
485. Luo C, Balsa E, Perry EA, Liang J, Tavares CD, Vazquez F, et al. H3K27me3-mediated PGC1alpha gene silencing promotes melanoma invasion through WNT5A and YAP. *J Clin Invest.* 2020;130(2):853-62.
486. Jesse S, Bayer H, Alupej MC, Zugel M, Mulaw M, Tuorto F, et al. Ribosomal transcription is regulated by PGC-1alpha and disturbed in Huntington's disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):8513.
487. Berman AJ, Thoreen CC, Dedic Z, Chettle J, Roux PP, Blagden SP. Controversies around the function of LARP1. *RNA Biol.* 2021;18(2):207-17.
488. Schwenzer H, Abdel Mouti M, Neubert P, Morris J, Stockton J, Bonham S, et al. LARP1 isoform expression in human cancer cell lines. *RNA Biol.* 2021;18(2):237-47.
489. Fuentes P, Pelletier J, Martinez-Herraez C, Diez-Obrero V, Iannizzotto F, Rubio T, et al. The 40S-LARP1 complex reprograms the cellular transcriptome upon mTOR inhibition to preserve the protein synthetic capacity. *Sci Adv.* 2021;7(48):eabg9275.
490. Philippe L, van den Elzen AMG, Watson MJ, Thoreen CC. Global analysis of LARP1 translation targets reveals tunable and dynamic features of 5' TOP motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(10):5319-28.
491. To TL, Cuadros AM, Shah H, Hung WHW, Li Y, Kim SH, et al. A Compendium of Genetic Modifiers of Mitochondrial Dysfunction Reveals Intra-organelle Buffering. *Cell.* 2019;179(5):1222-38 e17.
492. Aminzadeh-Gohari S, Weber DD, Catalano L, Feichtinger RG, Kofler B, Lang R. Targeting Mitochondria in Melanoma. *Biomolecules.* 2020;10(10).
493. West AP. Mitochondrial dysfunction as a trigger of innate immune responses and inflammation. *Toxicology.* 2017;391:54-63.
494. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2011;12(3):222-30.
495. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity.* 2012;36(3):401-14.

496. McLaughlin D, Zhao Y, O'Neill KM, Edgar KS, Dunne PD, Kearney AM, et al. Signalling mechanisms underlying doxorubicin and Nox2 NADPH oxidase-induced cardiomyopathy: involvement of mitofusin-2. *Br J Pharmacol*. 2017;174(21):3677-95.
497. Won JH, Park S, Hong S, Son S, Yu JW. Rotenone-induced Impairment of Mitochondrial Electron Transport Chain Confers a Selective Priming Signal for NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem*. 2015;290(45):27425-37.
498. Patwari P, Higgins LJ, Chutkow WA, Yoshioka J, Lee RT. The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *J Biol Chem*. 2006;281(31):21884-91.
499. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*. 2010;11(2):136-40.
500. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(48):20388-93.
501. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*. 2013;341(6151):1246-9.
502. Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*. 2016;535(7610):153-8.
503. Jorgensen I, Lopez JP, Laufer SA, Miao EA. IL-1beta, IL-18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore-induced intracellular traps following pyroptosis. *Eur J Immunol*. 2016;46(12):2761-6.
504. Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Conklyn M, Gabel CA. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol*. 2000;165(8):4615-23.
505. Sahoo BR. Structure of fish Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptors (NLR). *Int J Biol Macromol*. 2020;161:1602-17.
506. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*. 2011;472(7344):476-80.
507. He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res*. 2020;30(8):660-9.
508. Koch A, Knobloch J, Dammhayn C, Raidl M, Ruppert A, Hag H, et al. Effect of bacterial endotoxin LPS on expression of INF-gamma and IL-5 in T-lymphocytes from asthmatics. *Clin Immunol*. 2007;125(2):194-204.
509. da Silva I, Gomes GG, Menezes CC, Palma PV, Orellana MD, Covas DT, et al. Maturation of human iDCs by IL-18 plus PGE2, but not by each stimulus alone, induced migration toward CCL21 and the secretion of IL-12 and IFN-gamma. *Immunobiology*. 2013;218(2):238-44.
510. Jiang WG, Sanders AJ, Ruge F, Harding KG. Influence of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors on the migration of human keratinocytes, the role of PLC-gamma and potential clinical implications. *Exp Ther Med*. 2012;3(2):231-6.

511. Giustizieri ML, Mascia F, Frezzolini A, De Pita O, Chinni LM, Giannetti A, et al. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(5):871-7.
512. Takada K, Komine-Aizawa S, Hirohata N, Trinh QD, Nishina A, Kimura H, et al. Poly I:C induces collective migration of HaCaT keratinocytes via IL-8. *BMC Immunol.* 2017;18(1):19.
513. de Andrea CE, Ochoa MC, Villalba-Esparza M, Teijeira A, Schalper KA, Abengozar-Muela M, et al. Heterogenous presence of neutrophil extracellular traps in human solid tumours is partially dependent on IL-8. *J Pathol.* 2021;255(2):190-201.
514. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):134-47.
515. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
516. Wang L, Zhou X, Yin Y, Mai Y, Wang D, Zhang X. Hyperglycemia Induces Neutrophil Extracellular Traps Formation Through an NADPH Oxidase-Dependent Pathway in Diabetic Retinopathy. *Front Immunol.* 2018;9:3076.
517. Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med.* 2015;21(7):815-9.
518. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science.* 2015;349(6245):316-20.
519. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15880-5.
520. Martinez-Aleman SR, Campos-Garcia L, Palma-Nicolas JP, Hernandez-Bello R, Gonzalez GM, Sanchez-Gonzalez A. Understanding the Entanglement: Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cystic Fibrosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:104.
521. Gray RD, Hardisty G, Regan KH, Smith M, Robb CT, Duffin R, et al. Delayed neutrophil apoptosis enhances NET formation in cystic fibrosis. *Thorax.* 2018;73(2):134-44.
522. Yu Y, Su K. Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Cell Immunol.* 2013;4.
523. Masucci MT, Minopoli M, Del Vecchio S, Carriero MV. The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Front Immunol.* 2020;11:1749.
524. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One.* 2012;7(2):e32366.
525. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(4):928-42.
526. Beyfuss K, Hood DA. A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. *Redox Rep.* 2018;23(1):100-17.

527. Holley AK, St Clair DK. Watching the watcher: regulation of p53 by mitochondria. *Future Oncol.* 2009;5(1):117-30.
528. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene.* 2001;20(15):1803-15.
529. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(6):400-14.
530. Mookerjee SA, Nicholls DG, Brand MD. Determining Maximum Glycolytic Capacity Using Extracellular Flux Measurements. *PLoS One.* 2016;11(3):e0152016.
531. Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, et al. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C125-36.
532. TeSlaa T, Teitell MA. Techniques to monitor glycolysis. *Methods Enzymol.* 2014;542:91-114.
533. Onken MD, Noda SE, Kaltenbronn KM, Frankfater C, Makepeace CM, Fettig N, et al. Oncogenic Gq/11 signaling acutely drives and chronically sustains metabolic reprogramming in uveal melanoma. *J Biol Chem.* 2022;298(1):101495.
534. Figarola JL, Singhal J, Singhal S, Kusari J, Riggs A. Bioenergetic modulation with the mitochondria uncouplers SR4 and niclosamide prevents proliferation and growth of treatment-naive and vemurafenib-resistant melanomas. *Oncotarget.* 2018;9(97):36945-65.
535. Liu PP, Liao J, Tang ZJ, Wu WJ, Yang J, Zeng ZL, et al. Metabolic regulation of cancer cell side population by glucose through activation of the Akt pathway. *Cell Death Differ.* 2014;21(1):124-35.
536. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):85-95.
537. Vara-Perez M, Felipe-Abrio B, Agostinis P. Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation. *Cells.* 2019;8(5).
538. Albensi BC. What Is Nuclear Factor Kappa B (NF-kappaB) Doing in and to the Mitochondrion? *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:154.
539. Wang H, Peiris TH, Mowery A, Le Lay J, Gao Y, Greenbaum LE. CCAAT/enhancer binding protein-beta is a transcriptional regulator of peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha in the regenerating liver. *Mol Endocrinol.* 2008;22(7):1596-605.
540. Spiegelman BM, Puigserver P, Wu Z. Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARgamma and PGC-1. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24 Suppl 4:S8-10.
541. Rather RA, Bhagat M, Singh SK. Oncogenic BRAF, endoplasmic reticulum stress, and autophagy: Crosstalk and therapeutic targets in cutaneous melanoma. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2020;785:108321.
542. Hill DS, Lovat PE, Haass NK. Induction of endoplasmic reticulum stress as a strategy for melanoma therapy: is there a future? *Melanoma Manag.* 2014;1(2):127-37.
543. Lindner P, Christensen SB, Nissen P, Moller JV, Engedal N. Cell death induced by the ER stressor thapsigargin involves death receptor 5, a non-autophagic function of

- MAP1LC3B, and distinct contributions from unfolded protein response components. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):12.
544. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(12):2277-93.
545. Fan Y, Simmen T. Mechanistic Connections between Endoplasmic Reticulum (ER) Redox Control and Mitochondrial Metabolism. *Cells*. 2019;8(9).
546. Bustos G, Cruz P, Lovy A, Cardenas C. Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Calcium Communication and the Regulation of Mitochondrial Metabolism in Cancer: A Novel Potential Target. *Front Oncol*. 2017;7:199.
547. Wang X, Eno CO, Altman BJ, Zhu Y, Zhao G, Olberding KE, et al. ER stress modulates cellular metabolism. *Biochem J*. 2011;435(1):285-96.
548. Chu Y, Chang Y, Lu W, Sheng X, Wang S, Xu H, et al. Regulation of Autophagy by Glycolysis in Cancer. *Cancer Manag Res*. 2020;12:13259-71.
549. Zhao Y, Hu X, Liu Y, Dong S, Wen Z, He W, et al. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Mol Cancer*. 2017;16(1):79.
550. Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(3):195-205.
551. Lunde BM, Moore C, Varani G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(6):479-90.
552. Fonseca BD, Zakaria C, Jia JJ, Graber TE, Svitkin Y, Tahmasebi S, et al. La-related Protein 1 (LARP1) Represses Terminal Oligopyrimidine (TOP) mRNA Translation Downstream of mTOR Complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*. 2015;290(26):15996-6020.
553. Hong S, Freeberg MA, Han T, Kamath A, Yao Y, Fukuda T, et al. LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. *Elife*. 2017;6.
554. Stavrika C, Blagden S. The La-Related Proteins, a Family with Connections to Cancer. *Biomolecules*. 2015;5(4):2701-22.
555. Mura M, Hopkins TG, Michael T, Abd-Latip N, Weir J, Aboagye E, et al. LARP1 post-transcriptionally regulates mTOR and contributes to cancer progression. *Oncogene*. 2015;34(39):5025-36.
556. Scarpin MR, Leiboff S, Brunkard JO. Parallel global profiling of plant TOR dynamics reveals a conserved role for LARP1 in translation. *Elife*. 2020;9.
557. Jia JJ, Lahr RM, Solgaard MT, Moraes BJ, Pointet R, Yang AD, et al. mTORC1 promotes TOP mRNA translation through site-specific phosphorylation of LARP1. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(6):3461-89.
558. Lahr RM, Fonseca BD, Ciotti GE, Al-Ashtal HA, Jia JJ, Niklaus MR, et al. La-related protein 1 (LARP1) binds the mRNA cap, blocking eIF4F assembly on TOP mRNAs. *Elife*. 2017;6.
559. Rodriguez-Cerdeira C, Carnero Gregorio M, Lopez-Barcenas A, Sanchez-Blanco E, Sanchez-Blanco B, Fabbrocini G, et al. Advances in Immunotherapy for Melanoma: A Comprehensive Review. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:3264217.
560. Liang D, Zhuo Y, Guo Z, He L, Wang X, He Y, et al. SIRT1/PGC-1 pathway activation triggers autophagy/mitophagy and attenuates oxidative damage in intestinal epithelial cells. *Biochimie*. 2020;170:10-20.

561. Salem AF, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells promotes breast cancer tumor growth and confers autophagy resistance. *Cell Cycle*. 2012;11(22):4174-80.
562. Lelliott CJ, Ljungberg A, Ahnmark A, William-Olsson L, Ekroos K, Elmgren A, et al. Hepatic PGC-1beta overexpression induces combined hyperlipidemia and modulates the response to PPARalpha activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(12):2707-13.
563. Cao J, Wang X, Wang D, Ma R, Li X, Feng H, et al. PGC-1beta cooperating with FOXA2 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2019;19:93.
564. Victorino VJ, Barroso WA, Assuncao AK, Cury V, Jeremias IC, Petroni R, et al. PGC-1beta regulates HER2-overexpressing breast cancer cells proliferation by metabolic and redox pathways. *Tumour Biol*. 2016;37(5):6035-44.
565. van den Bogaard EH, Tjabringa GS, Joosten I, Vonk-Bergers M, van Rijssen E, Tijssen HJ, et al. Crosstalk between keratinocytes and T cells in a 3D microenvironment: a model to study inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol*. 2014;134(3):719-27.