THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé - CBS2 N°168

Unité de recherche INSERM U1194 - Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier

Rôle de la protéine multifonctionnelle E4F1 dans l'homéostasie des mélanocytes et le développement des mélanomes

Présentée par Mélanie ROUSSEAU
Le 16 décembre 2021

Sous la direction de Laurent LE CAM et Matthieu LACROIX

Devant le jury composé de

M. Pierre-Emmanuel STOEBNER, PU-PH, Université de Montpellier	Président du jury
Mme. Nathalie ANDRIEU-ABADIE, DR, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse	Rapportrice
Mme. Sophie TARTARE-DECKERT, DR, C3M, Nice	Rapportrice
M. Pierre CLOSE, DR, GIGA Institute, Université de Liège	Examinateur
M. Lionel LARUE, DR, Institut Curie, Paris	Examinateur
M. Laurent LE CAM, DR, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier	Directeur de thèse
M. Matthieu LACROIX, CR, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier	Co-directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER





Ce travail de thèse a été rendu possible grâce aux financements accordés par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (Contrat doctoral 2017-2020) et la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (Aide individuelle Jeunes Chercheurs 2020).

Je les remercie pour leur soutien et pour l'intérêt porté à ce projet.

REMERCIEMENTS

Quelle aventure ! Qui aurait cru que je serais un jour en train d'écrire ces lignes, moi qui clamais jusqu'alors que non, je ne ferai pas de thèse. Après ces 4 années, il est temps pour moi de remercier toutes les personnes qui ont contribué à rendre cela possible.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, les Docteurs Nathalie Andrieu-Abadie, Sophie Tartare-Deckert, Pierre Close et Lionel Larue, pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Lionel, merci également de m'avoir accueillie quelques jours dans ton équipe et pour nos discussions scientifiques tout au long du projet. Je remercie également le Pr. Pierre-Emmanuel Stoebner de me faire l'honneur de présider ce jury. Merci pour ta contribution lors de mes comités de thèse, pour nos échanges et pour ton intérêt pour mon projet.

J'adresse également mes remerciements aux autres membres du comité de thèse, les Docteurs Sandrina Kinet, Vincent Compan et Philippe Jay, pour avoir suivi et encouragé ce travail de thèse.

Mes remerciements s'adressent également au directeur de l'institut, le Dr. Claude Sardet, pour m'avoir accueillie au sein de l'IRCM et pour nos échanges constructifs sur le projet.

Je tiens bien évidemment à remercier mon directeur de thèse, le Dr. Laurent Le Cam pour m'avoir permis d'intégrer son équipe. Merci Laurent pour ta confiance, ton enthousiasme imperturbable et ton soutien. Merci pour tout ce que tu m'as appris pendant ces 4 années et pour la gestion des colonies (j'en ai vu passer des souris et du génotypage !). Merci pour toutes nos discussions scientifiques (ou non). Ce sera bientôt à mon tour de t'envoyer des vidéos de voyage !

Je remercie aussi sincèrement mon co-directeur de thèse, le Dr. Matthieu Lacroix. Merci beaucoup pour ton encadrement et ta disponibilité. Merci pour la confiance que tu m'as accordée et pour ton soutien pendant mes innombrables galères. Merci pour tout tes conseils, pour ton aide pour les manips pendant mes (nombreuses) vacances et pour ta bonne humeur au quotidien. Cela a été un plaisir de travailler avec toi.

Je souhaite également dédier quelques lignes aux personnes dont j'ai croisé la route au cours de mon cursus et qui m'ont donné goût à la recherche. Merci aux Docteurs Yannick Blanchard, Michel Samson, Laurent Meijer et Sylvain Meloche de m'avoir ouvert la porte de vos laboratoires pour mes stages et de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Merci également à mes encadrants de stage Hélène Quenault, Virginie Carrière, Morgane Cam et Simon Mathien de m'avoir formée. C'est en partie grâce, ou à cause, de vous que j'en suis ici aujourd'hui.

Merci aussi à Peggy Rigou pour son accompagnement dans le cadre du mentorat Femmes et Science. Un grand merci pour tes conseils et ton soutien qui m'ont beaucoup aidé au cours de cette thèse.

Je tiens à remercier sincèrement tous les membre de l'équipe LLC pour cette bonne ambiance quotidienne qui a permis à cette thèse de se dérouler au mieux. Je ne savais pas trop où je mettais les pieds en débarquant de Montréal et de ma Bretagne mais mes appréhensions se sont vite envolées. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, les Pool Meeting et les (très) nombreux goûters !

Maryse, merci d'avoir un peu été ma maman du labo ! Merci pour ces bons moments partagés, pour ta présence et tes encouragements tout au long de cette thèse.

Laurie, merci pour ton enthousiasme contagieux, tes expressions et tes chansons que je ne suis pas près d'oublier !

Carlo, merci pour ta bonne humeur, ton humour et… tes cours d'italien peu recommandables !

Michela, mon italienne préférée (Scusi Carlito !), merci pour ta gentillesse et ta bienveillance. Je ne compte plus les glaces et les tiramisú partagés ! J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi sur ce projet.

Betty et Pierrick, merci pour votre aide technique sur le projet. Merci aussi pour les moments partagés autour d'une bière en dehors du labo !

Céline, merci pour ton aide pour les manips de RNAscope et pour ton énergie débordante.

Airelle, Gaby, les petites dernières, merci pour votre bonne humeur, vos playlists plus que qualitatives et tous les fous rires partagés depuis votre arrivée au labo. Airelle, merci aussi de me faire sentir moins seule avec mes expressions québécoises et pour la relecture de cette thèse.

Alexandra, merci pour nos discussions et tous tes conseils et encouragement pendant cette période de rédaction.

Pef, merci pour ton aide avec les analyses bioinfo que j'aurais bien été incapable de faire seule. Merci de m'avoir soutenue et épaulée pendant la rédaction. Merci aussi d'avoir sauvé mon ordi (promis, j'arrête de tuer des Mac !) et d'avoir relu intensivement cette thèse.

Myriam, je crois qu'il n'y aurait pas assez de lignes pour te remercier à la hauteur de tout ce que tu as fait pour moi pendant ces quatre années. Merci pour ton sourire, ta gentillesse. Merci d'avoir toujours été présente. Merci pour les tablettes de chocolat et autres sucreries laissées en douce à mon bureau pour me remonter le moral. Merci pour ton soutien (et tes nombreux gâteaux) qui ont sans aucun doute contribué à la réussite de cette thèse.

Merci également aux anciens thésards de l'équipe. Madi, merci ta bonne humeur communicative et ta générosité. Berfin, merci pour tous les conseils que tu as pu me donner au début de cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance pour prendre la suite de ton projet.

J'aimerais également remercier les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer pour leur contribution à ce travail. Alicia, je ne m'attendais pas à encadrer ma première stagiaire dès les premiers mois de ma thèse et pourtant ! Je suis très heureuse de t'avoir eu à mes côtés pour débuter ce projet. Merci à toi pour ta motivation et tous les bons moments partagés ensemble. Morane, encadrer une stagiaire à quelques mois de la fin de la thèse aurait pu être un challenge. Mais je pense que je n'aurais pas pu mieux tomber. Merci pour ton implication dans le projet et ton aide précieuse. Merci pour les soirées pizza tard au labo et nos fous rires. Merci pour tes encouragements et la relecture de cette thèse. Je suis très fière de pouvoir te confier la suite de ce projet et te souhaite sincèrement le meilleur pour ta thèse.

Je tiens aussi à remercier le personnel des plateaux techniques de l'institut pour leur aide sur ce projet. Merci à la plateforme RHEM pour les analyses histologiques. Merci également à la plateforme RAM, et particulièrement à Lucie, pour leur aide quotidienne avec les souris.

Merci aussi au personnel de la laverie et du magasin qui nous permettent de travailler dans de bonnes conditions au quotidien.

Merci également au le personnel administratif de l'IRCM (Daniela, Nadia, Nadège, Déborah, Carmen et Vincent) pour leur aide, leur disponibilité et leur gentillesse.

Je tiens aussi à remercier plus globalement toutes les personnes que j'ai pu croiser et côtoyer à l'IRCM ces quatre dernières années. Abdel, merci pour tes petites attentions si réconfortantes et pout ton aide précieuses avec les plasmides. Merci également à Béa, Marina et Charlotte pour vos nombreux conseils et votre aide tout au long de cette thèse.

Un grand merci également aux membres passés et actuels de mon merveilleux bureau : Hadjer, Sara, Manda, Margaux, Candice, Aurélie, Baptiste, Romain, Marine, Ilhème, Kevin et Betty. Merci pour bonne humeur, votre énergie, votre folie (oui, il faut le dire !) mais aussi pour votre écoute et votre soutien à toutes épreuves face aux aléas de la thèse. Merci de m'avoir permis de décompresser entre deux manips, même si je ne passais qu'en coup de vent.

À tous les doctorants, post-docs et ingénieurs de l'institut, devenus au cours de ces quatre années bien plus que des collègues, et sans doute bien trop nombreux pour n'en oublier aucun : Valentin, Guillaume, Airelle, Gaby, Clémentine, Timothée, Alix, Gabriel, Mehdi, Carlo, Romain P, Imène, Zahra, Betty, Pierrick, Marine, Kévin, Candice, Alexandra, Mathilde, Alice, Rita, Esin, Charlotte, Emilia, Ambre, Diala, Anna, Célestine, Tristan, Vincent, Antoine, Chiara, Clara, Ikrame, Pénélope, Sara, Jihad, Laura, Matthieu, Romain R, Ghita, … Merci pour cette bonne ambiance et tous moments passés ensemble, les JET, les repas, les happy hour et autres apéro. J'en garderai de merveilleux souvenirs.

Plus particulièrement, merci à Romain et Tristan pour les escapades et rando, même si vous m'abandonnez en chemin ! Tristan, merci aussi pour nos soirées et week-end passés au labo, nos longues discussions et pour la relecture de cette thèse. Te voir courir dans les couloirs me manquera !

Anna, Chiara, Clémentine et Guillaume, merci pour votre présence et soutien tout au long de cette thèse et particulièrement pendant la rédaction. Clémentine, merci aussi pour l'illustration, on retourne bientôt manger des empanadas, promis !

Marie, merci pour tes encouragements et la relecture de cette thèse. Merci nos discussions interminables au sujet des voyages et de la photo. Il me tarde de mettre tout ça en pratique !

Une petite pensée également pour mes kinés, Emilien et Jérémy. Je ne compte plus les heures passées au cabinet depuis mon arrivée à Montpellier. Merci d'avoir sauvé mon dos plus d'une fois !

Marion, ma prof de yoga préférée, merci pour ta douce énergie et de m'avoir permis d'évacuer tout ce stress. On se retrouve très bientôt au studio !

Enfin, merci à mes parents, à mon frère et à ma famille pour leur soutien tout au long de cette thèse.

RÉSUMÉ

La protéine multifonctionnelle E4F1 est un régulateur essentiel de l'homéostasie de la peau. Plus précisément, E4F1 participe au maintien des cellules souches épidermiques et régule la différenciation des kératinocytes. Toutefois, ses fonctions dans d'autres types cellulaires cutanés restent encore peu étudiées. Par conséquent, nous nous sommes intéressés au rôle d'E4F1 dans le lignage mélanocytaire. Les mélanocytes sont des cellules épidermiques, responsables de la mélanogenèse. Ce processus physiologique, contrôlé par le facteur MITF, permet la synthèse de mélanine, un pigment essentiel à la protection de la peau contre les dommages causées par les rayonnements ultraviolets.

Afin d'identifier les fonctions d'E4F1 dans les mélanocytes, j'ai généré des modèles murins génétiquement modifiés permettant l'inactivation spécifique d'*E4f1* dans ces cellules. J'ai ainsi mis en évidence que la perte d'*E4f1* provoque de sévères défauts de pigmentation, sans pour autant impacter la survie des mélanocytes. J'ai également pu montrer que ces défauts sont associés à une diminution d'expression du facteur MITF et des enzymes de la synthèse de mélanine. Au niveau moléculaire, la déplétion d'*E4f1* conduit à la diminution de l'expression de ses gènes cibles, incluant *Elp3*, codant la sous-unité catalytique du complexe Elongator. Ce complexe est impliqué dans la modification de certains ARNs de transfert et contribue à la fidélité de la traduction. Par conséquent, la perte d'*E4f1* induit une réponse de stress aux protéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique (RE) qui aboutit à la répression de l'expression de *Mitf*.

Il est intéressant de noter que l'expression de MITF est fréquemment dérégulée dans le mélanome, un type de cancer dérivé des mélanocytes. Une faible expression de MITF a été associée à un profil tumoral agressif et à une résistance aux thérapies ciblées. Ainsi, j'ai cherché à caractériser les fonctions d'E4F1 dans le développement, la progression et la résistance aux thérapies des mélanomes. Mes données, obtenus à partir de modèles murins génétiquement modifiés de mélanome, suggèrent que l'inactivation d'*E4f1* dans les cellules de mélanome retarde le développement tumoral.

Mon travail de thèse a donc permis d'identifier un rôle majeur d'E4F1 dans le lignage mélanocytaire, à la fois dans l'homéostasie des mélanocytes et le développement du mélanome.

Mots clés : E4F1, Mélanocytes, Pigmentation, MITF, Traduction, Mélanome

ABSTRACT

The multifunctional protein E4F1 is an essential regulator of skin homeostasis. More precisely, E4F1 is involved in the maintenance of epidermal stem cells and regulates keratinocyte differentiation. However, it seems that its functions extend beyond the epidermal cells but its roles in other skin cell types remain poorly investigated. Therefore, I studied the role of E4F1 in the melanocyte lineage. Melanocytes are epidermal cells, responsible for melanogenesis. This physiological process, controlled by the MITF transcription factor, allows the synthesis of melanin, a pigment essential to protect the skin against ultraviolet induced-DNA damages.

To identify the functions of E4F1 in melanocytes, I generated genetically engineered mouse models allowing the specific inactivation of *E4f1* in these cells. I demonstrated that the loss of *E4f1* causes severe pigmentation defects, without affecting melanocytes survival. This phenotype was linked to a strong decrease in the expression of MITF and of melanin synthesis enzymes. At the molecular level, *E4f1* depletion reduces the expression of its target genes, including *Elp3*, encoding the catalytic subunit of the Elongator complex. This complex is involved in the modification of a subset of transfer RNAs and contributes to the fidelity of translation. Therefore, *E4f1* depletion induces an unfolded protein stress response (ER stress response), which results in the repression of *Mitf*.

Interestingly, MITF expression has been shown to be deregulated in melanoma, a cancer type arising from melanocytes. A low expression of MITF has been associated with an aggressive tumor profile and resistance to targeted therapies. Thus, I characterized the E4F1 functions in melanoma development, progression, and resistance to therapies. My data, obtained from genetically engineered mouse models of melanoma, suggest that *E4f1* inactivation in melanoma cells delays tumor development.

Altogether, my PhD work has enabled the identification, for the first time, of a role of E4F1 in the melanocyte lineage, both in melanocyte homeostasis and in melanoma development.

Keywords: E4F1, Melanocytes, Pigmentation, MITF, Translation fidelity, Melanoma

SOMMAIRE

RÉSUMÉ 9

ABSTRACT 10

TABLE DES ILLUSTRATIONS 13

LISTE DES TABLEAUX 14

LISTE DES ABRÉVIATIONS 15

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 20

1. MELANOCYTES 21
1.1. Structure et composition de la peau 21
1.1.1. Épiderme 22
1.1.2. Derme 22
1.1.1. Hypoderme 23
1.2. Mélanocytes 23
1.2.1. Localisation 23
1.2.2. Établissement et maintien du lignage mélanocytaire 24
1.2.2.1. Développement embryonnaire 24
1.2.2.2. Renouvellement des mélanocytes adultes 27
1.2.2.3. Voies de signalisation régulant l'établissement et le maintien du lignage mélanocytaire 29
1.3. Mélanogenèse 34
1.3.1. Biosynthèse de la mélanine 35
1.3.2. Maturation des mélanosomes et transfert 35
1.3.3. Régulation de la mélanogenèse 36
1.3.4. Rôle de p53 dans la réponse des mélanocytes aux rayonnements UV 38
1.4. MITF 40
1.4.1. Structure et expression 40
1.4.2. Régulation 41
1.4.2.1. Régulation transcriptionnelle 41
1.4.2.2. Régulation post-traductionnelle 44
1.4.3. Rôle dans l'homéostasie des mélanocytes 46
1.5. Pathologies associées à un dysfonctionnement du lignage mélanocytaire 49

2. MELANOMES CUTANES 51
2.1. Épidémiologie et facteurs de risque 51
2.2. Diagnostic et classification 53
2.3. Initiation et progression des mélanomes cutanés 54
2.3.1. Transformation des mélanocytes 55
2.3.2. Échappement à la sénescence et phase de croissance radiale 57
2.3.3. Phase de croissance verticale et invasion 58
2.3.4. Métastases 60
2.4. Traitements du mélanome 60
2.4.1. Thérapies ciblées 61
2.4.2. Immunothérapies 62

2.5. Mécanismes de résistance aux thérapies 64
2.5.1. Hétérogénéité et plasticité tumorale 64
2.5.2. Flexibilité métabolique 65
2.5.2.1. Métabolisme du glucose 66
2.5.2.2. Métabolisme des lipides 69
2.5.3. Reprogrammation de la traduction 72
2.5.3.1. Réponse intégrée au stress 72
2.5.3.2. Complexe Elongator 75
2.6. Modèles murins d'étude du mélanome cutané 77

3. E4F1 80
3.1. Découverte 80
3.2. Structure 80
3.3. Fonctions 82
3.3.1. Régulation de la voie p53 82
3.3.2. Régulation du cycle cellulaire 85
3.3.3. Régulation du métabolisme 87
3.3.3.1. Activité mitochondriale 87
3.3.3.2. Métabolisme du pyruvate 87
3.3.3.3. Métabolisme des lipides 89
3.3.4. Conséquences physiologiques 90
3.3.4.1. Développement embryonnaire précoce 90
3.3.4.2. Développement embryonnaire tardif et tissus adultes 90
3.4. Régulation 96
3.5. E4F1 et pathologies humaines 96
3.5.1. Syndrome de Leigh 96
3.5.2. Cancers 97

OBJECTIFS DE LA THÈSE 98

RÉSULTATS 100

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES 182

1. Rôle d'E4F1 dans le contrôle de la traduction 183
2. Effets de l'inactivation d'E4f1 sur le développement des mélanomes 185
3. Régulation de MITF par E4F1 dans des lignées cellulaires de mélanomes humains . 187
4. Implication de la Pyruvate Déshydrogénase dans la régulation de MITF 188

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 189

1. Rôle d'E4F1 dans le lignage mélanocytaire 191
2. Mécanismes de régulation de MITF par E4F1 194
3. Implication d'E4F1 dans l'initiation et la progression des mélanomes 201

BIBLIOGRAPHIE 206

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : ANATOMIE DE LA PEAU 21
FIGURE 2 : LOCALISATION DES MELANOCYTES 24
FIGURE 3 : FORMATION DES CELLULES DE LA CRETE NEURALE 25
FIGURE 4 : MIGRATION DES CELLULES DE LA CRETE NEURALE 26
FIGURE 5 : CYCLE PILEUX 28
FIGURE 6 : PHOTOTYPES CUTANES 34
FIGURE 7 : MATURATION DES MELANOSOMES ET BIOSYNTHESE DE LA MELANINE 36
FIGURE 8 : VOIES DE SIGNALISATION REGULANT LA MELANOGENESE 39
FIGURE 9 : STRUCTURE DES ISOFORMES DE MITF 41
FIGURE 10 : REGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS DE MITF 43
FIGURE 11 : REGULATIONS POST-TRADUCTIONNELLE DE MITF 45
FIGURE 12 : TAUX D'INCIDENCE ET DE MORTALITE DES MELANOMES A TRAVERS LE MONDE 52
FIGURE 13 : SOUS-TYPES HISTOLOGIQUES DES MELANOMES CUTANES 53
FIGURE 14 : ÉTAPES DE PROGRESSION DES MELANOMES 55
FIGURE 15 : ALTERATIONS DES VOIES DE SIGNALISATION MAPK ET PI3K/AKT DANS LES MELANOMES 56
FIGURE 16 : CHRONOLOGIE DES APPROBATIONS DE TRAITEMENTS PAR LA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION AMERICAINE POUR LES PATIENTS ATTEINTS DE MELANOME AVANCE 63
FIGURE 17 : EFFET WARBURG 66
FIGURE 18 : REPROGRAMMATION METABOLIQUE CAUSEE PAR LA MUTATION $BRAF^{V600E}$ 68
FIGURE 19 : ALTERATION DU METABOLISME LIPIDIQUE DANS LES CELLULES DE MELANOME 71
FIGURE 20 : MECANISME D'INHIBITION DE LA TRADUCTION EN REPONSE AU STRESS 73
FIGURE 21 : SIGNALISATION DE LA REPONSE INTEGREE AU STRESS 74
FIGURE 22 : MODIFICATION DES ARN DE TRANSFERT PAR LE COMPLEXE ELONGATOR 76
FIGURE 23 : STRUCTURE ET FONCTIONS D'E4F1 82
FIGURE 24 : REGULATION DE LA VOIE P53 PAR E4F1 84
FIGURE 25 : COMPLEXE PYRUVATE DESHYDROGENASE 88
FIGURE 26 : ROLE D'E4F1 DANS LE CONTROLE DE LA TRADUCTION 184
FIGURE 27 : EFFETS DE L'INACTIVATIONS D'E4F1 SUR LE DEVELOPPEMENT DES MELANOMES 186
FIGURE 28 : EFFETS DE LA DEPLETION D'E4F1 SUR L'EXPRESSION DE MITF ET DES ENZYMES DE LA MELANOGENESE DANS DES LIGNEES CELLULAIRES DE MELANOME 187

FIGURE 29 : EFFETS DE LA DEPLETION DE DLAT SUR L'EXPRESSION DE MITF ET DES ENZYMES DE LA MELANOGENESE.....188
FIGURE 30 : EFFET DE LA DEPLETION D'E4F1 SUR L'EXPRESSION DE ERK DANS LES MELANOCYTES 202
FIGURE 31 : MECANISMES DE REGULATION DE MITF PAR E4F1 205

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : PATHOLOGIES ASSOCIEES A UN DYSFONCTIONNEMENT DU LIGNAGE MELANOCYTAIRE.....50
TABLEAU 2 : EXEMPLE DE MODELES MURINS GENETIQUEMENT MODIFIES DE MELANOME....79
TABLEAU 3 : PRINCIPAUX PHENOTYPES DES MODELES MURINS GENETIQUEMENT MODIFIES KO CONDITIONNELS POUR E4F1.....91

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α-MSH	α-melanotropine stimulante
18F-FDG	18F-fluorodéoxyglucose
Ac-CoA	Acetyl-coenzyme A
ACC1	Acetyl-CoA Carboxylase 1
ACLY	ATP Citrate Lyase
ACOX1	Peroxisomal Acyl-coenzyme A Oxidase 1
ACTH	Adrenocorticotropic Hormone
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIS	Autoimmune Susceptibility
ALKBH8	Alkylated DNA repair protein alkb Homologue 8
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP3B1	Adaptor Related Protein Complex 3 Subunit Beta 1
APE1	Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNt	ARN de transfert
ASAH1	N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATP	Adenosine TriPhosphate
bHLH-LZ	basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper
BIM	Bcl-2-like 11 protein
BIRC7	Baculoviral IAP Repeat Containing 7
BMP	Bone-Morphogenic Pathway
BRDU	Bromodésoxyuridine
CCN	Cellules de la Crête Neurale
CCR	C-C Motif Chemokine Receptor
CDK2	Cyclin Dependent Kinase 2
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
CHK1	Checkpoint Kinase 1
cm5	5-carboxy-méthyl
COL17A1	Collagène XVII A1
CRE	cAMP Response Element
CREB	c-AMP Response Element-Binding protein
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
CTU1/2	Cytosolic Thiouridylase Subunit 1/2
CXCR	C-X-C Motif Chemokine Receptor

DAG	Diacylglycérol
DCT	Dopachrome Tautomérase
DDI2	DNA Damage Inducible 1 Homolog 2
DHI	5,6-dihydroxyindole
DHICA	DHI-2-carboxylique
DLAT	Dihydrolipoamide Acetyltransferase
DLD	Dihydrolipoamide Dehydrogenase
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthracene
DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
DR	Death Receptor
DTNBP1	Dystrobrevin Binding Protein 1
EDN	Endothelin
EDNR	Endothelin Receptor
eEF	Eukaryotic Elongation Factor
eIF	Eukaryotic Initiation Factor
ELP	Elongator complex Protein
EMT	Epithelial-Mensenchymal Transition
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FANCA	FA Complementation Group A
FASN	Fatty Acid Synthase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOXD3	Forkhead Transcrition Factor
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha
GCN2	General Control Nonderepressible 2
GFP	Green Fluorescent Protein
GLUT1	Glucose Transporter Type 1
GPR143	G Protein-coupled Receptor 143
Grg4	Groucho-related gene 4
GS	Griscelli-Prunieras syndrom
GSK3b	Glycogen Synthase Kinase 3 b
HAT	Histone acetyl-transferase
HDAC1	Histone Deacetylase 1
HFSC	Hair Follicle Stem Cells
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF1α	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha
HMG	High-Mobility-Group
HMGA2	High Mobility Group A2
HNF-1a	Hepatocyte Nuclear Factor 1a

HPS	Hermansky-Pudlak Syndrom
HSC	Hematopoietic Stem Cell
ISR	Integrated Stress Response
K14	Keratin 14
KO	Knock-Out
LDH	Lactate Dehydrogenase
LEF1	Lymphoid Enhancer Binding Factor 1
LIG1	DNA Ligase 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MC1R	Melanocortin 1 Receptor
MCAM	Melanoma Cell Adhesion Molecule
mcm5U	5-méthoxycarbonylméthyl
McSC	Melanocyte Stem Cell
MDM2	Murine Double Minute 2
MEF	Murine Embryonic Fibroblast
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MITF	Microphtalmia-associated Transcription Factor
MLPH	Melanophilin
MMP	Matrix Metallopeptidase
MPC1	Mitochondrial Pyruvate Carrier 1
MSA	Migration Staging Area
MUFA	Monounsaturated Fatty Acid
MYO5A	Myosin VA
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NAMPT	Nicotinamide Phosphoribosyltransferase
ncm5U	5-carbamoyl-méthyl-uridine
NF1	Neurofibromin 1
NFIB	Nuclear Factor I B
NGR1	Neuregulin 1
OA1	Oculocutaneous Albinism type 1
OCA	Oculocutaneous Albinism
OIS	Oncogene-Induced Senescence
OXPHOS	Oxydative Phosphorylation

PARP1	Poly-ADP ribose Polymerase 1
PAX	Paired box
PD1	Programmed Cell Death 1
PDH	Pyruvate Deshydrogenase
PDHE1	Pyruvate Dehydrogenase E1
PDK	Pyruvate Dehydrogenase Kinase
PDK1	Pyruvate Deshydrogenase Kinase 1
PDL1	Programmed Cell Death Ligand 1
PDP	Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase
PDX	Patient-Derived Xenograft
PERK	Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PGC1α	Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-α
PIAS3	Protein Inhibitor of Activated STAT 3
PKA	Protein Kinase A
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholypase C
PMEL17	Premelanosome protein 17
POMC	Proopiomelanocortin
PP5C	Protein Phosphatase 5
PRC	Polycomb Repressive Complex
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RAD52	DNA Repair Protein RAD52 Homolog
RANBP2	RAN Binding Protein 2
RASSF1A	Ras Association Domain Family Member 1A
RE	Réticulum Endoplasmique
RGP	Radial Growth Phase
ROS	Reactive Oxygen Species
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
S1PR	Sphingosine-1-Phosphate Receptor
SAM	S-adenosylmethionine
SCD	Stearoyl-CoA Desaturase
SCF	Stem Cell Factor
SFA	Saturated Fatty Acid
SK	Sphingosine Kinases
SOX	Sry-related HMG box
SREBP1	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1
TAC	Transient Amplifying Cell
Tam	Tamoxifène
TBX2	T-Box Transcription Factor 2

TCF	T-cell Factor
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TFEB	Transcription Factor E
TGF-b	Transforming Growth Factor β
TGF-βR	TGF-β Receptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TYR	Tyrosinase
TYRP1	Tyrosinase-Related Protein 1
UPR	Unfolded-Protein Response
USF1	Upstream Stimulatory Factor 1
USP13	Ubiquitin Specific Peptidase 13
UV	Ultra-Violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VGP	Vertical Growth Phase
WNT	Wingless-type
WS	Waardenburg syndrome
ZEB	Zinc finger E-box Binding homeobox

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Mélanocytes

1.1. Structure et composition de la peau

La peau est l'organe le plus vaste du corps humain, représentant approximativement 16% du poids total de l'organisme et participe au maintien de l'intégrité et de l'homéostasie de celui-ci. En effet, elle constitue la première barrière de protection contre l'environnement extérieur et protège des agressions mécaniques, chimiques, biologiques (pathogènes) ou encore physiques (rayonnements ultra-violets (UV)). Elle joue également un rôle dans la régulation de la température et de la teneur en eau de l'organisme, dans les perceptions sensitives (pression, douleur) ainsi que dans la synthèse de la vitamine D.

La peau est divisée en trois couches principales, de la plus externe à la plus interne : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1).

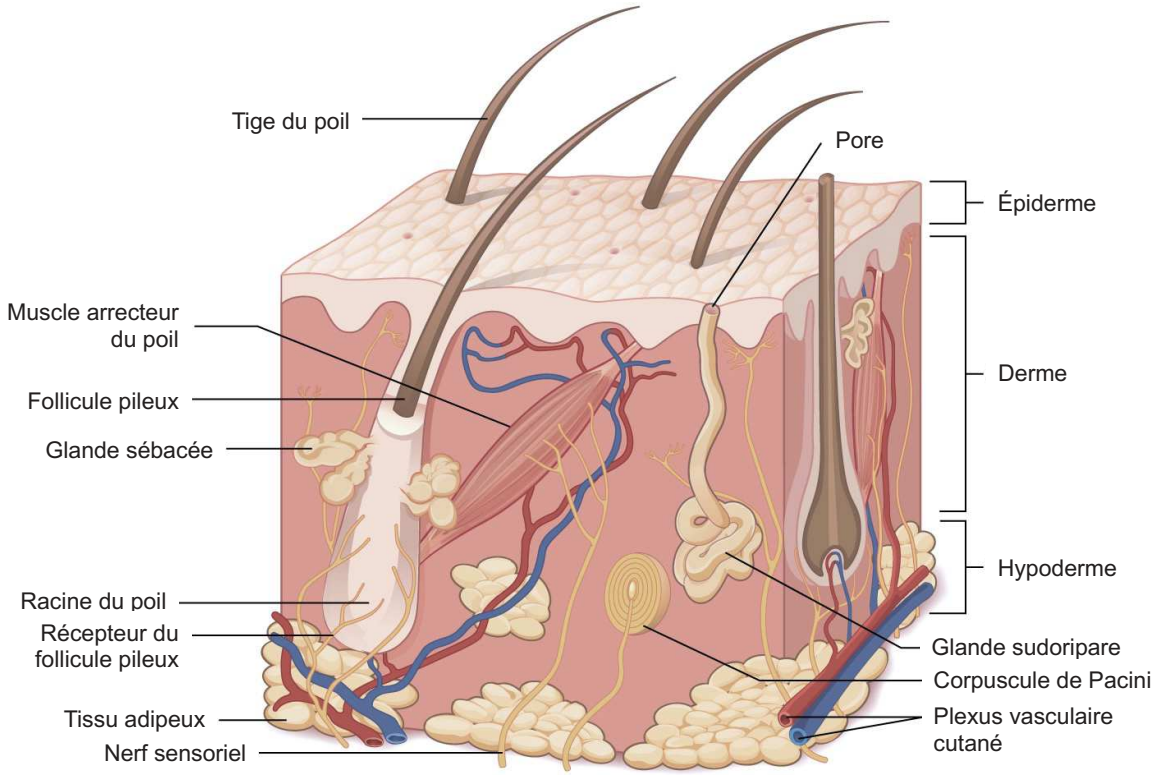


Figure 1 : Anatomie de la peau

OpenStax College, Anatomy & Physiology, CC Attribution 3.0

1.1.1. Épiderme

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau. Il s'agit d'un épithélium squameux stratifié, non vascularisé, majoritairement composé de kératinocytes. Ces derniers sont responsables de la synthèse de kératine, une protéine fibreuse assurant les principales fonctions de protection de la peau. L'épiderme est divisé en quatre couches distinctes au travers desquelles les kératinocytes migrent au cours de leur différenciation : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. La couche basale contient notamment les cellules souches et les cellules progénitrices, qui se divisent pour former les kératinocytes et ainsi permettre le renouvellement continu de l'épiderme. Elle contient également d'autres types cellulaires tels que les mélanocytes, responsables de la pigmentation de la peau et les cellules de Merkel participant à la mécano-perception. On retrouve également, dans les couches supra-basales de l'épiderme, des cellules de Langerhans, des cellules présentatrices d'antigènes impliquées dans la réponse immunitaire de la peau contre les micro-organismes.

1.1.2. Derme

Le derme est une couche épaisse de tissu conjonctif qui assure le support physique et nutritif de l'épiderme. Il est principalement composé de fibroblastes et est formé de deux régions : papillaire et réticulaire. Le derme papillaire est une couche mince superficielle de tissu conjonctif lâche qui permet les échanges de nutriments avec l'épiderme. Le derme réticulaire est, quant à lui, formé de fibres de collagène et d'élastine denses qui confèrent à la peau ses propriétés de résistance, d'extensibilité et d'élasticité. Le derme se compose également de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, de terminaisons nerveuses et de récepteurs sensoriels (corpuscules de Meissner, Pacini et Ruffini). Il comprend également les structures annexes de la peau incluant les ongles, les follicules pileux, ainsi que les glandes sébacées et sudoripares.

1.1.1. Hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau et permet de faire le lien entre la peau et les tissus sous-jacents, tels que les muscles et les os. Il s'agit d'un tissu conjonctif lâche, richement vascularisé et composé principalement d'adipocytes. Ces derniers sont impliqués dans le stockage des graisses et permettent à l'hypoderme d'assurer un rôle de protection mécanique des organes profonds, de réserve d'énergie, ainsi que de régulation et d'isolation thermique.

1.2. Mélanocytes

1.2.1. Localisation

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques dérivées de la crête neurale et spécialisées dans la synthèse de mélanine, un pigment responsable de la couleur de la peau, des yeux et des poils. Les mélanocytes sont principalement retrouvés dans la peau, où ils représentent approximativement 8% des cellules épidermiques. Ils se localisent plus précisément dans la couche basale de l'épiderme (mélanocytes inter-folliculaires) ainsi qu'au niveau du bulbe des follicules pileux (mélanocytes folliculaires). Les cellules souches mélanocytaires sont également retrouvées au niveau des follicules pileux, dans une région appelée bulge (Figure 2). Les mélanocytes interagissent étroitement avec les kératinocytes, avec un ratio de 1 mélanocyte pour 36 kératinocytes formant ainsi une unité épidermique de mélanisation (Fitzpatrick and Breathnach, 1963). Au sein de ces unités, la mélanine synthétisée par les mélanocytes est stockée dans des structures lysosomales, appelées mélanosomes, qui sont ensuite transférées aux kératinocytes par l'intermédiaire de leurs dendrites afin d'assurer la pigmentation des tissus et leur protection contre les rayonnements UV (Fitzpatrick et al., 1979). Chez l'homme, les mélanocytes sont majoritairement inter-folliculaires tandis que les animaux à fourrure présentent principalement des mélanocytes folliculaires à l'exception des zones glabres (queue, oreilles, museau, pattes) (Bischitz and Snell, 1959; Ortonne and Benedetto, 1981). Les mélanocytes sont également retrouvés dans d'autres organes tels que les yeux, l'oreille interne (Tachibana, 1999), le cœur (Brito and Kos, 2008; Yajima and Larue, 2008) ou encore le système nerveux central (Goldgeier et al., 1984).

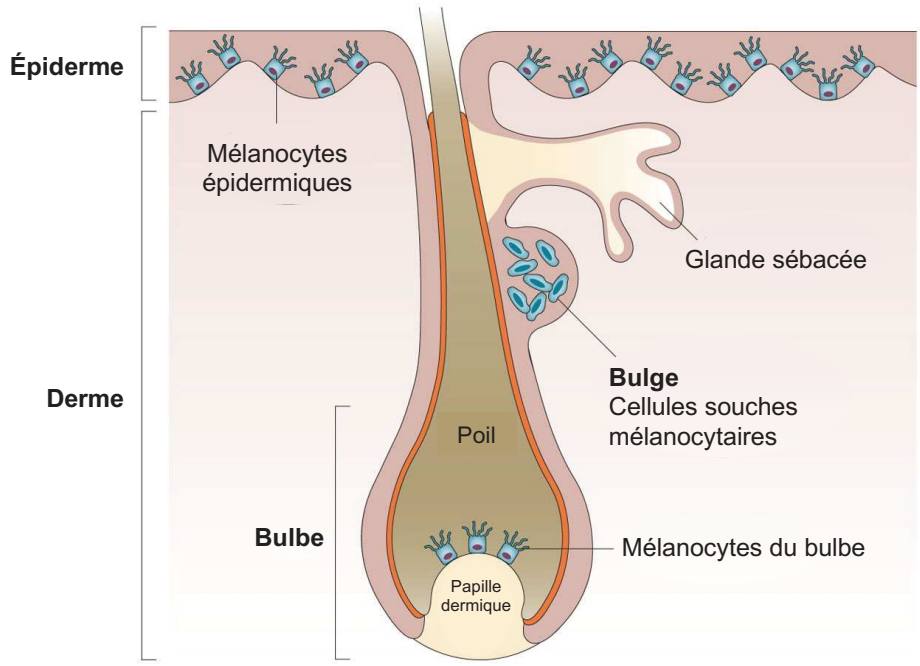


Figure 2 : Localisation des mélanocytes

Les mélanocytes différenciés sont localisés dans l'épiderme et dans le bulbe des follicules pileux. Les cellules souches mélanocytaires résident dans le bulge. Adapté de Picardo et al., 2015.

1.2.2. Établissement et maintien du lignage mélanocytaire

1.2.2.1. Développement embryonnaire

1.2.2.1.1. De la crête neurale aux mélanoblastes

Les mélanocytes dérivent des cellules de la crête neurale (CCN), une population transitoire de cellules, unique aux vertébrés, produite au début du développement embryonnaire à l'interface entre la plaque neurale et l'ectoderme non-neural adjacent. Les CCN se forment lors de la fermeture du tube neural induite par les molécules de signalisation BMP (Bone-Morphogenic Pathway), WNT (wingless-type), FGF (Fibroblast Growth Factor) et NOTCH produites par les structures environnantes telle que la plaque neurale, le mésoderme et l'ectoderme (Ikeya et al., 1997; LaBonne and Bronner-Fraser, 1998; Steventon et al., 2009) (Figure 3). Ces différentes molécules de signalisation permettent l'induction de plusieurs gènes intervenant dans la transition épithélio-mésenchimateuse (EMT), tels que *Snail*, *Slug* ou encore *Zeb2*. Les CCN acquièrent alors des propriétés migratoires, se détachent et migrent au sein de l'embryon pour donner naissance à différents types de cellules incluant les mélanocytes mais aussi les neurones, les cellules gliales, les cellules du muscle cardiaque lisse, les cellules chromaffines des glandes surrénales ou encore le cartilage cranio-facial.

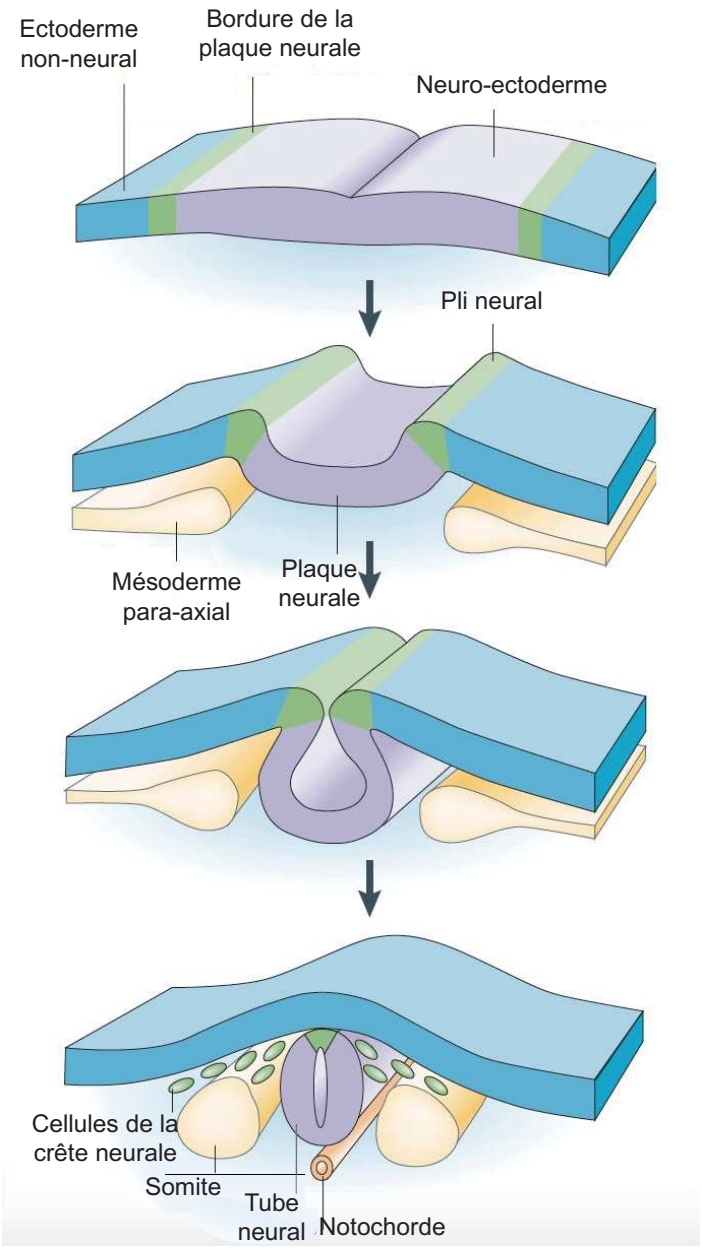


Figure 3 : Formation des cellules de la crête neurale

Au cours de l'embryogénèse, les CCN se forment à partir des bordures de la plaque neurale, lors de la formation du tube neural. Adapté de Gammil et al., 2003.

Les CCN peuvent migrer suivant 2 voies : dorsoventrale ou dorsolatérale. Les CCN migrant dorsoventralement génèrent les précurseurs des cellules neuronales et gliales, incluant les cellules de Schwann, tandis que celles migrant dorsolatéralement donnent naissance aux mélanoblastes, précurseurs des mélanocytes (Douarin et al., 1999). Néanmoins, il a également été mis en évidence que les précurseurs des cellules de Schwann, suivant une migration dorsoventrale, peuvent également former des mélanocytes (Adameyko et al., 2009; Dupin and Le Douarin, 2003) (Figure 4).

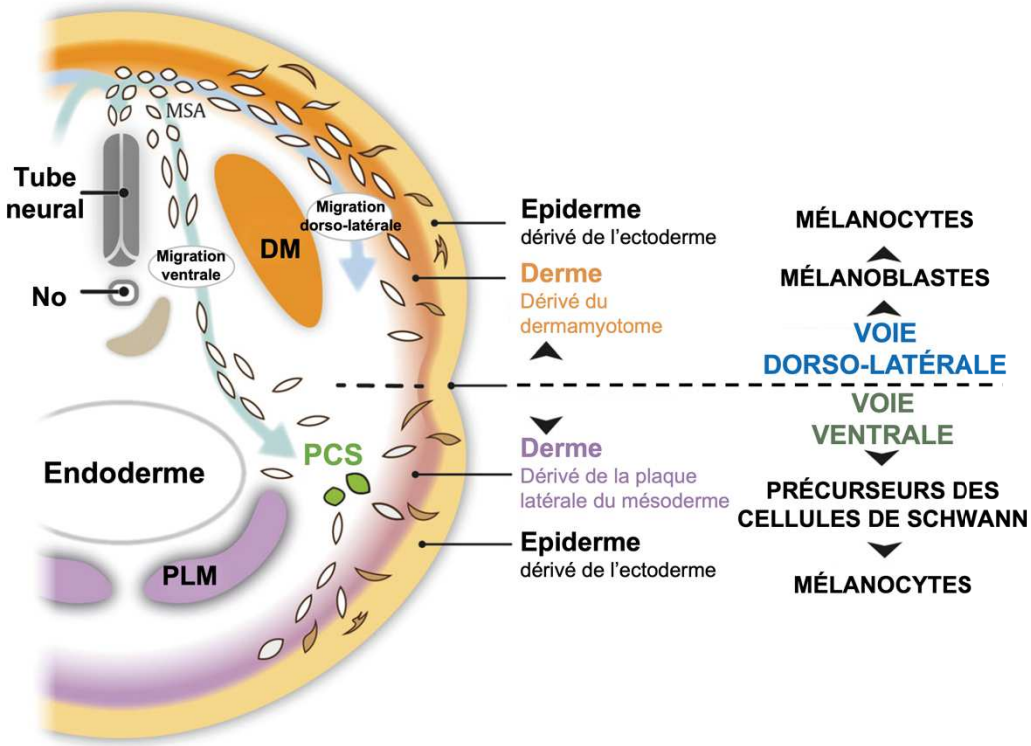


Figure 4 : Migration des cellules de la crête neurale

Les CCN migrent selon deux voies : dorso-latérale et ventrale. La première donne naissance aux mélanoblastes, précurseurs des mélanocytes. La seconde forme les précurseurs des cellules de Schwann, pouvant également se différencier en mélanocytes.
No : Notochorde, DM : Dermamyotome, PLM : Plaque latérale du mésoderme, PCS : Précurseurs des cellules de Schwann. Adapté de Vandamme et al., 2019.

1.2.2.1.2. Des mélanoblastes aux mélanocytes matures

Chez les embryons de souris, les CCN se différencient en mélanoblastes dès le stade embryonnaire E8.5. Ces mélanoblastes migrent ensuite jusqu'à une zone appelée « Migration Staging Area » (MSA), où ils reçoivent des signaux de prolifération, de survie et de migration (Erickson et al., 1992; Wehrle-Haller and Weston, 1995; Weston, 1991). À E9.5, ces mélanoblastes débutent leur migration vers le derme puis vers l'épiderme à E11.5 (Luciani et al., 2011). Dès E15.5, les mélanoblastes s'accumulent au niveau des follicules pileux en formation où ils vont donner naissance à trois populations (Nishimura, 2011) :

- des mélanocytes matures folliculaires au niveau du bulbe qui contribueront à la pigmentation du poil au cours du premier cycle pileux,
- des cellules souches mélanocytaires (McSCs) au niveau du bulge qui serviront de réservoir de nouveaux mélanocytes à chaque cycle pileux,
- des mélanocytes interfolliculaires dans la couche basale de l'épiderme qui interviendront dans la pigmentation de la peau.

1.2.2.2. Renouvellement des mélanocytes adultes

Chez l'adulte, les mélanocytes sont renouvelés à chaque cycle pileux. En effet, les follicules pileux sont continuellement renouvelés et subissent à chaque fin de cycle une dégradation de leur partie inférieure (portion transitoire) incluant le bulbe, où se trouvent les mélanocytes matures qui doivent donc être remplacés au cycle suivant afin de pigmenter le nouveau poil (Stenn and Paus, 2001). Le cycle pileux se décompose en trois phases : une phase de croissance (anagène), une phase de régression (catagène) et une phase de repos (télogène).

Les cellules souches mélanocytaires (McSCs), qui permettent le renouvellement des mélanocytes, ont été formellement identifiées par Nishimura *et al*. dans le bulge, une région de la partie permanente du follicule pileux. En utilisant à la fois un rapporteur LacZ sous le contrôle du promoteur de la dopachrome tautomérase, DCT, permettant de marquer le lignage mélanocytaire et un anticorps anti-cKit permettant d'éliminer les cellules du lignage mélanocytaire en prolifération, Nischimura *et al*. ont identifié une population cellulaire exprimant *Dct* et résistantes aux anti-cKit dans le bulge. Des essais d'incorporation de bromodésoxyuridine (BrdU) ont également montré que cette population était dans un état quiescent. De plus, il a été mis en évidence que l'implantation de la partie permanente du follicule pileux, contenant cette population, chez des nouveau-nés de souris albinos permet de reconstituer le follicule pileux complet. Ainsi, Nishimura *et al*. ont démontré que cette population quiescente DCT^+ constituent les McSCs et que le bulge forme leur niche (Nishimura et al., 2002).

Des analyses transcriptionnelles ont également confirmé que ces McSCs se trouvent dans un état de quiescence avec une suppression globale de la transcription et n'expriment aucun marqueur de pigmentation à l'exception de DCT (Freter et al., 2010; Nishikawa and Osawa, 2007; Osawa et al., 2005). Cet état quiescent est notamment maintenu grâce à la sécrétion de TGF-β (Transforming growth factor β) par les cellules souches du follicule pileux, également localisées dans le bulge (Nishimura et al., 2010; Tanimura et al., 2011).

En phase anagène, les McSCs sortent de cet état quiescent et entre en prolifération. Elles génèrent des cellules progénitrices ou TAC (Transient Amplifying Cell) qui prolifèrent et migrent ensuite jusqu'au bulbe où elles se différencient en mélanocytes matures. Ces derniers synthétisent alors de la mélanine qu'ils transfèrent aux kératinocytes environnants afin de pigmenter le poil en formation. Lors de la phase catagène, ces mélanocytes sont éliminés par apoptose et restent absents dans le follicule pileux télogène jusqu'à la prochaine phase anagène (Figure 5).

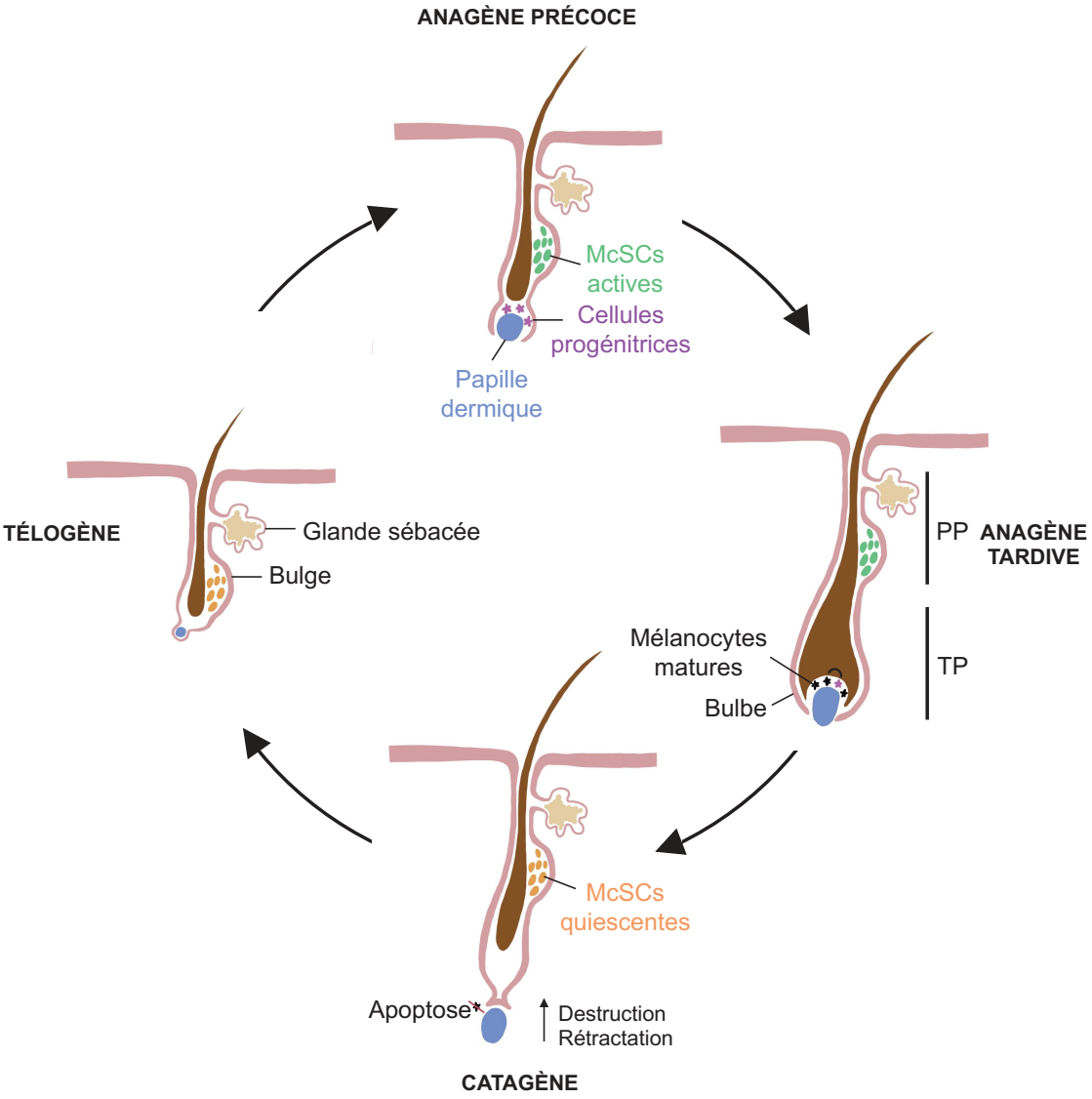


Figure 5 : Cycle pileux

Le cycle pileux se décompose en trois phases : une phase de croissance (anagène), une phase de régression (catagène) et une phase de repos (télogène). Les mélanocytes sont renouvelés à chaque cycle à partir des cellules souches mélanocytaires (MsSCs). PP : Portion permanente du poil, TP : Portion transitoire du poil. Par Clémentine Garoche.

Au-delà des follicules pileux, il a été démontré que les McSCs servent également au renouvellement des mélanocytes interfolliculaires (Nishimura et al., 2002). Cette découverte est cohérente avec les observations précédemment réalisées chez les patients atteints de vitiligo, une pathologie caractérisée par l'absence de mélanocytes interfolliculaires, qui présentaient une repigmentation de la peau autour des follicules pileux (Cui et al., 1991; Falabella, 2009; Rusfianti and Wirohadidjodjo, 2006). De plus, des études ont montré que les McSCs sont capables de migrer des follicules pileux jusqu'à l'épiderme et de se différencier en mélanocytes matures à la suite de blessures ou d'irradiations aux UVB (Chou et al., 2013).

Par ailleurs, des travaux récents suggèrent que d'autres sources de mélanocytes matures pourraient exister. En effet, il a été mis en évidence, dans un modèle tridimensionnel de peau reconstruite, que des cellules souches dermiques peuvent migrer dans la couche basale de l'épiderme et se différencier en mélanocytes (Li et al., 2010). De plus, des McSCs, aux caractéristiques similaires à celles du follicule pileux, ont récemment été identifiées dans la partie permanente inférieure sécrétoire de la glande sudoripare et peuvent fournir à l'épiderme des mélanocytes différenciés (Okamoto et al., 2014).

1.2.2.3. Voies de signalisation régulant l'établissement et le maintien du lignage mélanocytaire

Wnt/β-caténine

La voie Wnt/β-caténine joue un rôle crucial dans le développement des mélanoblastes à partir des CCN et la différenciation des McSCs lors de la phase anagène du cycle pileux.

La voie Wnt/β-caténine est activée de façon canonique par les ligands Wnt (glycoprotéines sécrétées) qui se fixent au récepteur Frizzled, conduisant à l'activation de la kinase Dishevelled. Celle-ci phosphoryle et inhibe l'activité de la kinase GSK3β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) qui, jusqu'alors, provoquait la dégradation de la β-caténine par le protéasome. Par conséquent, la β-caténine s'accumule dans le cytoplasme et est ensuite transloquée au noyau où elle coopère avec les facteurs de transcription de la famille Lef1/Tcf (Lymphoid Enhancer Binding Factor 1/ T-cell factor) pour réguler l'expression de ses gènes cibles.

Plusieurs études ont mis en évidence un rôle majeur de cette voie dans le développement des mélanoblastes. En effet, le *Knock-Out* (KO) de *Wnt1* et *Wnt3a* chez la souris conduit à une absence de mélanoblastes (Ikeya et al., 1997). De même, le KO du gène *Ctnnb1* codant pour la β-caténine dans les CCN conduit à la perte des mélanocytes chez la souris (Hari et al., 2002). Il a également été montré que l'activation constitutive de la voie Wnt/β-caténine dans les CCN provoque le développement des mélanocytes au détriment des neurones et des cellules gliales et que l'inhibition de la voie conduit au résultat inverse (Dorsky et al., 1998; Dunn et al., 2000).

Par ailleurs, dans le follicule pileux, la voie Wnt/β-caténine est active dans les McSCs lors de la phase anagène du cycle pileux mais est réprimée pendant les phases catagène et télogène, suggérant que l'absence de signalisation β-caténine maintient les McSCs dans un état de quiescence. Ainsi, l'activation forcée de la voie Wnt/β-caténine dans ces cellules induit leur différenciation et un blanchiment prématuré des poils (Rabbani et al., 2011). Il a également été montré que l'activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules souches du follicule pileux (Hair Follicle Stem Cells, HFSCs) conduit à l'expression et à la sécrétion d'endothélines 1 et 2 qui vont induire la prolifération et la différenciation des McSCs (Rabbani et al., 2011).

Endothélines / EDNRB

Les endothélines (Edn) sont de petits peptides de signalisation qui se lient à des récepteurs couplés aux protéines G, Endothelin receptor A et B (EDNRA-B) et conduisent à l'activation de différentes voies de signalisation incluant les voies PKC (Phosphokinase C), MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), AMPc/PKA (Adénosine monophosphate cyclique/Protein Kinase A).

Il a été démontré que la signalisation EDRNB est indispensable à la migration et à la prolifération des mélanoblastes (Lee et al., 2003; Shin et al., 1999). De plus, le KO des gènes *Ednrb* et *Edn3* chez la souris conduisent à des défauts de pigmentation et à des anomalies de développement des mélanocytes qui se traduisent par l'apparition d'un pelage tacheté (Baynash et al., 1994; Hosoda et al., 1994). Chez l'homme, des mutations dans les gènes *EDNRB* et *EDN3* sont associées au syndrome de Waardenburg qui se caractérise par une surdité et des anomalies de pigmentation des cheveux, des poils, des yeux et de la peau (Attié et al., 1995; Edery et al., 1996; Pingault et al., 2001). Enfin, comme évoqué précédemment, la sécrétion d'endothélines 1 et 2 par les HFSCs induit la prolifération et la différenciation des McSCs. Une forte expression d'Edn2 dans les cellules souches du follicule pileux provoque la différenciation prématurée des McSCs et l'apparition de cellules pigmentées dans le bulge (Chang et al., 2013). L'expression d'Edn2 est régulée négativement dans les HFSCs par le *Nuclear* Factor *I B* (NFIB) (Chang et al., 2013; Rabbani et al., 2011).

KIT

Le récepteur Kit est un récepteur tyrosinase kinase activé par la liaison de son ligand KITL, aussi appelé Stem Cell Factor (SCF) ou encore Steel Factor. Cette liaison conduit à la dimérisation du récepteur et à son autophosphorylation permettant le recrutement de protéines adaptatrices. Cela induit l'activation de nombreuses voies de signalisation, notamment la voie des MAPK.

Différentes études utilisant des mutants de *Kitl* et *Kit* ou encore des anticorps neutralisants ont montré que la signalisation Kit est nécessaire pour la survie, la migration, la prolifération et la différenciation des mélanoblastes (Cable et al., 1995; Wehrle-Haller and Weston, 1995; Yoshida et al., 1996) ainsi que pour leur migration vers l'épiderme et le follicule pileux (Mackenzie et al., 1997). De même, l'injection d'un anticorps anti-Kit à des souris après la naissance bloque la différenciation et la prolifération des McSCs dans les follicules pileux entrainant la perte des mélanocytes folliculaires et le blanchiment des poils, sans pour autant affecter le maintien des McSCs (Botchkareva et al., 2001; Nishikawa-Torikai et al., 2011).

Chez l'Homme, des mutations du gène *KIT* conduisent à l'apparition d'un syndrome rare, le piebaldisme, caractérisé par la présence de zones cutanées dépigmentées (Fleischman et al., 1991; Giebel and Spritz, 1991).

TGF-β

Le TGF-β est une cytokine multifonctionnelle qui se fixe aux récepteurs au TGF-β de type I et II (TGF-βRI-II) et active les médiateurs intracellulaires de la famille Smad (Smad2/3). Ces derniers s'associent avec Smad4 et transloquent dans le noyau pour réguler leurs gènes cibles.

Le TGF-β est produit par les HFSCs dans le bulge sous le contrôle de la protéine transmembranaire collagène XVII A1 (COL17A1) et permet de maintenir les McSCs quiescentes pendant la phase télogène du cycle pileux, en inhibant l'expression de gènes relatifs à la différenciation et en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire via Bcl-2 (Nishimura et al., 2010). En effet, le KO de *Col17a1* dans les HFSCs est associé à une diminution du niveau de TGF-β et initie l'activation des McSCs, provoquant ainsi un blanchiment prématuré des poils (Tanimura et al., 2011).

NOTCH

L'activation des récepteurs Notch par leurs ligands Delta et Jagged conduit au clivage du domaine intracellulaire du récepteur (NICD) qui interagit dans le noyau avec un complexe transcriptionnel afin de réguler l'expression de ses gènes cibles.

La voie Notch joue un rôle crucial dans le maintien des mélanoblastes et des McSCs. En effet, plusieurs études utilisant des modèles de souris génétiquement modifiées ont montré que l'inactivation de *Notch* dans le lignage mélanocytaire conduit à une mort par apoptose, à une différenciation prématurée et à des défauts de localisation des mélanoblastes ainsi qu'à la perte progressive des McSCs dans le bulge et à un blanchiment prématuré des poils causé par une absence de renouvellement des mélanocytes au cours des cycles pileux (Aubin-Houzelstein et al., 2008; Kumano et al., 2008; Moriyama et al., 2006; Schouwey et al., 2007).

SOX10

Les protéines SOX (Sry-related HMG box) consistent une famille de facteurs de transcription contenant un domaine de liaison à l'ADN de type HMG (High-Mobility-Group) et sont impliquées dans le développement et l'homéostasie de nombreux tissus et types cellulaires, incluant le lignage mélanocytaire.

Sox10, exprimé dans les CCN avant leur migration et pendant leur spécification en mélanoblastes, est indispensable à leur survie et au développement du lignage mélanocytaire (Aoki, 2013). En effet, la délétion de *Sox10* aussi bien chez la souris que chez le poisson zèbre se caractérise par une diminution conséquente du nombre de mélanocytes (Britsch et al., 2001; Dutton et al., 2001; Potterf et al., 2001; Southard-Smith et al., 1998). A l'inverse, la surexpression de sox10 dans l'embryon de xénope conduit à une expansion massive des cellules précurseurs des mélanocytes en induisant l'expression de Dct (Aoki et al., 2003).

Par ailleurs, il a également été mis en évidence que SOX10 est essentiel à l'établissement et à la maintenance des McSCs dans le bulge. En effet, l'inactivation de *Sox10* dans les McSCs conduit à la perte de ces cellules. Au contraire, une surexpression de *Sox10* dans ces mêmes cellules conduit à leur différenciation et à un blanchiment prématuré du poil (Harris et al., 2013).

Enfin, il a également été montré que SOX10 peut se lier aux promoteurs de différents gènes impliqués dans la pigmentation et induire leur expression : *Microphtalmia-associated Transcription Factor* (*Mitf*, (Bondurand et al., 2000; Elworthy et al., 2003)), *Dopachrome tautomerase* (*Dct*, (Jiao et al., 2004; Ludwig et al., 2004; Potterf et al., 2001)), *Tyrosinase* (*Tyr*, (Hou et al., 2006; Murisier et al., 2007)) et *Tyrosinase-related protein 1* (*Tyrp1*, (Murisier et al., 2006)).

De façon cohérente avec le rôle essentiel de SOX10 dans le lignage mélanocytaire, l'haploinsuffisance de *SOX10* chez l'Homme est responsable du syndrome de Waardenburg (Bondurand et al., 2007).

PAX3

Les protéines Paired box (PAX) représentent une famille très conservée de facteurs de transcription essentiels au développement de nombreux tissus au cours de l'embryogénèse et à la maintenance de nombreuses niches de cellules souches chez l'adulte.

PAX3, exprimé par les précurseurs de la crête neurale (Bang et al., 1997) et par les mélanoblastes au cours de la migration jusqu'à l'épiderme (Blake and Ziman, 2005) est essentiel pour la formation et l'expansion des mélanoblastes (Hornyak et al., 2001). En effet, des modèles murins présentant des mutations de *Pax3* se caractérisent par une réduction du nombre de mélanoblastes, probablement due à une altération de leur prolifération, et des défauts de pigmentation (Hornyak et al., 2001).

De plus, PAX3 est également exprimé dans les McSCs (Osawa et al., 2005) et est impliqué dans leur maintien en quiescence. En effet, PAX3 se fixe au promoteur de *DCT* avec le co-represseur Groucho (Grg4) et réprime son expression, empêchant ainsi la différenciation. D'autre part, PAX3 se fixe aussi au promoteur de *MITF*, en synergie avec SOX10, et active sa transcription et la différenciation des McSCs (Bondurand et al., 2000; Watanabe et al., 1998). PAX3 a également la capacité de se lier et de réguler positivement l'expression de *TYRP1* et ainsi favoriser la mélanogenèse (Galibert et al., 1999).

Tout comme pour *EDN3*/*EDNRD* et *SOX10*, des mutations de *PAX3* chez l'homme sont associées au développement du syndrome de Waardenburg (Hoth et al., 1993; Tassabehji et al., 1993).

1.3. Mélanogenèse

Les mélanocytes sont des cellules spécialisées dans la synthèse de la mélanine, processus appelé mélanogenèse. Ce pigment est produit dans une structure intracellulaire, le mélanosome, et est ensuite transféré aux kératinocytes environnants. La mélanine intervient dans la pigmentation des poils et de la peau mais joue également un rôle essentiel de protection contre les rayonnements UV, de neutralisation des radicaux-libres, de stockage des ions et de couplage des réactions d'oxydo-réduction (Bush and Simon, 2007; Costin and Hearing, 2007; Riley, 1997).

Deux types de pigment sont produits lors de la mélanogenèse : l'eumélanine de couleur marron/noire et la phéomélanine de couleur jaune/rouge. Les proportions de chacun de ces pigments contribuent aux variations de pigmentation entre les individus. Ces variations sont classées en six phototypes, selon la couleur de la peau et sa réaction aux rayonnements UV (Fitzpatrick, 1988) (Figure 6). Ainsi, la phéomélanine prédomine chez les individus à peau claire tandis que les peaux foncées contiennent majoritairement de l'eumélanine. Seule cette dernière assure une protection efficace contre les rayons UV et les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) (Smit et al., 2001).

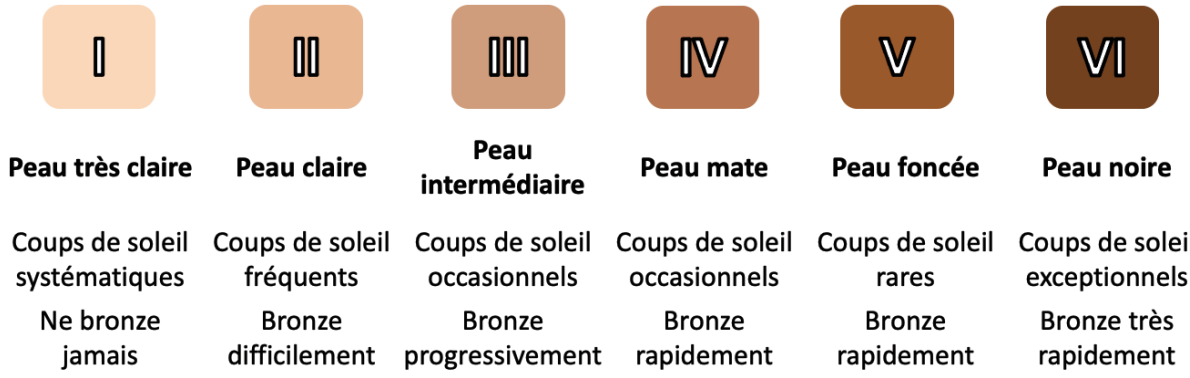


Figure 6 : Phototypes cutanés

Les différentes couleurs de peau sont classées en six phototypes selon leurs réactions vis-à-vis des rayonnements UV. D'après Fitzpatrick, 1988.

1.3.1. Biosynthèse de la mélanine

La mélanogenèse consiste en une cascade de réactions enzymatiques permettant la synthèse de mélanine à partir de la L-tyrosine et impliquant les enzymes TYR, TYRP1 et DCT. La mélanogenèse se déroule au sein du mélanocyte, dans le mélanosome, une organelle spécialisée dérivée des lysosomes (Orlow, 1995; Raposo et al., 2007).

La L-tyrosine est successivement hydroxylée en L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) puis oxydée en DOPAquinone sous l'action de TYR. A partir de la DOPAquinone, les voies de synthèse des deux types de mélanine divergent. D'une part, en présence de cystéine, la DOPAquinone réagit avec celle-ci pour former la cysteinylDOPA qui est ensuite oxydée et polymérisée pour donner naissance à la phéomélanine. D'autre part, en absence de dérivés soufrés (cystéine, glutathion), la DOPAquinone subit spontanément une cyclisation en DOPAchrome. Le DOPAchrome génère spontanément du 5,6-dihydroxyindole (DHI). En présence de l'enzyme DCT, le DOPA-chrome est transformé en l'acide DHI-2-carboxylique (DHICA). Enfin, les enzymes TYR et TYRP1 catalysent la transformation du DHI et du DHICA en eumélanine (Kondo and Hearing, 2011) (Figure 7).

1.3.2. Maturation des mélanosomes et transfert

La maturation des mélanosomes se déroule en quatre étapes : le stade I, correspondant au pré-mélanosome de forme sphérique contenant des filaments de matrice peu définis ; le stade II, lors duquel le mélanosome prend une forme elliptique due à l'organisation de la matrice filamenteuse ; le stade III, lors duquel se déroule la synthèse de mélanine qui se dépose sur la matrice et le stade IV, où la mélanine remplit totalement le mélanosome masquant ainsi sa structure interne (Quevedo et al., 1987) (Figure 7).

Les mélanosomes contenant la mélanine sont ensuite transportés jusqu'aux dendrites des mélanocytes à l'aide des fibres d'actine et de tubuline (Wu et al., 1998) puis transférés aux kératinocytes environnants, selon un mécanisme qui n'a pour le moment pas été clairement établi. Plusieurs hypothèses concernant le mécanisme de transfert des mélanosomes ont été émises telles que l'endocytose par les kératinocytes des mélanosomes libérés par exocytose dans le milieu extracellulaire ou la phagocytose de l'extrémité des dendrites. D'autres hypothèses suggèrent une fusion membranaire ou encore un transfert vésiculaire (Bossche et al., 2006; Wu and Hammer, 2014). La mélanine est ensuite stockée dans les kératinocytes, autour de leur noyau, afin de protéger celui-ci des rayons UV.

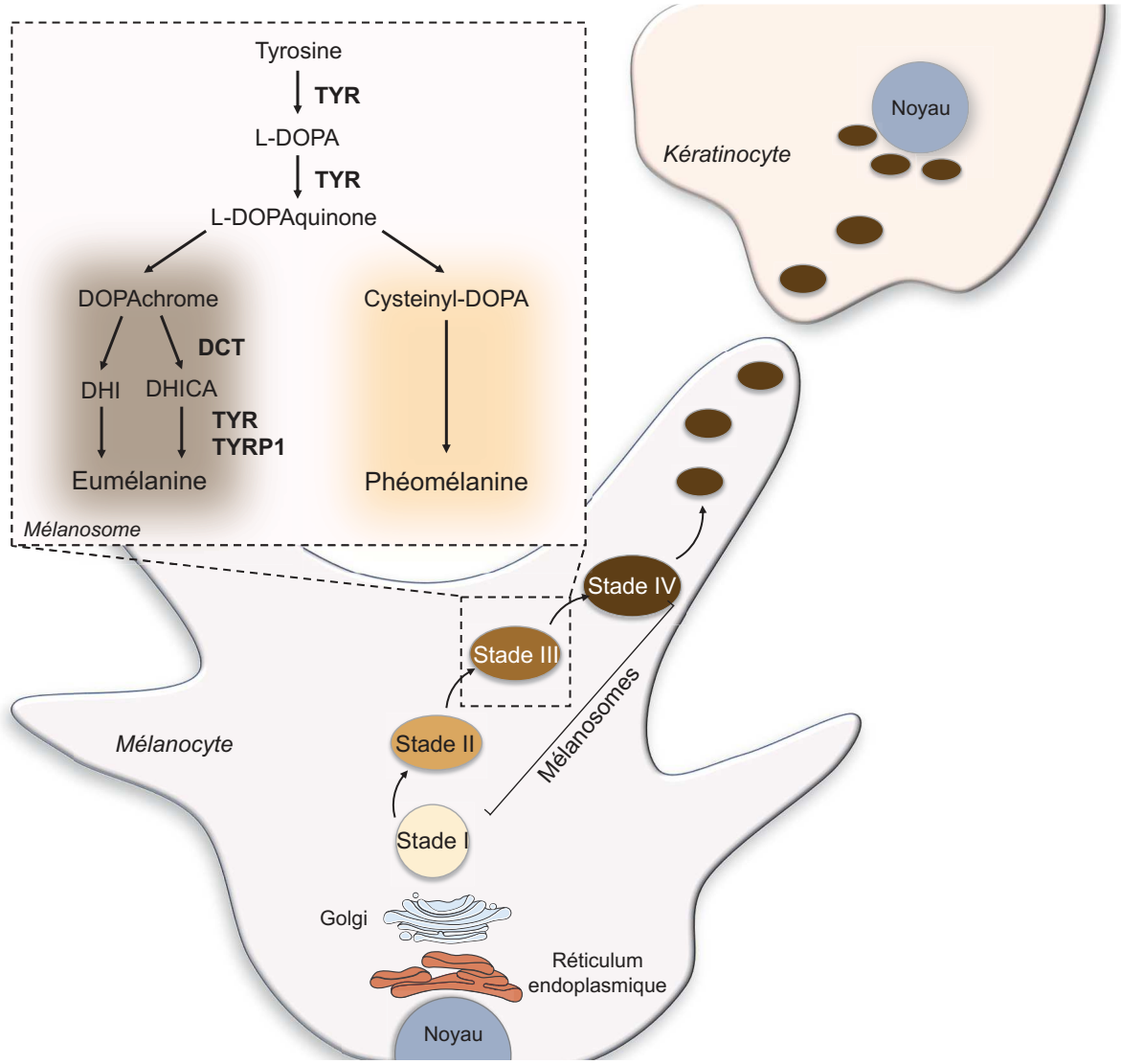


Figure 7 : Maturation des mélanosomes et biosynthèse de la mélanine

La mélanogenèse se déroule dans les mélanosomes, au cours de leur maturation dans les mélanocytes, sous le contrôle des enzymes tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) et dopachrome tautomérase (DCT). Les mélanosomes matures sont ensuite transférés aux kératinocytes environnants.

1.3.3. Régulation de la mélanogenèse

La mélanogenèse est un processus finement régulé par différents facteurs aussi bien endogènes (autocrine, paracrine, endocrine) qu'exogènes (rayonnements UV). De nombreuses molécules produites par les kératinocytes, les fibroblastes et les mélanocytes, telles que le SCF, le FGF ou encore l'oxyde nitrique, affectent la pigmentation de la peau. La synthèse et la sécrétion de ces substances est fortement induite par l'exposition aux rayonnements UV. La régulation de la mélanogenèse fait également intervenir, au niveau endocrinien, l'hormone α-melanotropine strimulante (α-MSH), l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et les œstrogènes.

L'ensemble de ces molécules affecte l'activité de cascades de signalisation intracellulaire, incluant les voies AMPc/PKA, MAPK, PKC et Wnt. Celles-ci conduisent à la régulation du facteur MITF, décrit comme étant le régulateur majeur de l'homéostasie des mélanocytes, contrôlant l'expression des différentes enzymes impliquées dans la synthèse de mélanine (TYR, TYRP1 et DCT) (Figure 8). Compte-tenu de l'implication de MITF dans ces travaux de thèse, ses fonctions seront détaillées ultérieurement dans une section dédiée.

La mélanogenèse est fortement modulée par le niveau intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Celui-ci est principalement régulé par la liaison de l'α-MSH et de l'ACTH au récepteur membranaire MC1R (Melanocortin 1 receptor) des mélanocytes. Ces deux ligands proviennent d'un précurseur commun, la proopiomelanocortin (POMC), produite à la fois par la glande pituitaire, les kératinocytes et les mélanocytes (Chakraborty et al., 1996; Kippenberger et al., 1998; Rousseau et al., 2007). La liaison de l'α-MSH et de l'ACTH au récepteur MC1R induit alors une augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc qui active la PKA, conduisant ainsi à la phosphorylation du facteur de transcription CREB (C-AMP Response Element-binding protein) qui régule l'expression de plusieurs gènes, dont *MITF* (Bertolotto et al., 1998).

La voie AMPc/PKA peut également être induite par d'autres récepteurs membranaires tels que les récepteurs muscariniques (M1, M3, M5), les adrénorécepteurs β2, les récepteurs aux œstrogènes, et les récepteurs à la corticolibérine (Schallreuter et al., 2008).

L'augmentation intracellulaire d'AMPc permet aussi d'activer la voie des Mitogen-activated protein kinases (MAPK). Cette voie, également activée par le SCF (Stem Cell Factor), la NGR1 (Neuregulin 1), le FGF (Fibroblast Growth Factor) et le HGF (Hepatocyte Growth Factor), consiste en une cascade de phosphorylations initiée par la petite GTPase Ras et qui conduit à l'activation successive des kinases Raf, MEK et ERK1/2, régulant à leur tour l'activité transcriptionnelle de MITF (Hemesath et al., 1998; Rzepka et al., 2016).

La MAPK p38 peut également être induite en réponse au stress provoqué par les rayonnements UV et conduire à la phosphorylation de CREB et à l'expression de *MITF* (Tada et al., 2002). Il a aussi été mis en évidence que la kinase p38 phosphoryle USF1 (Upstream Stimulatory Factor 1) conduisant ainsi à la régulation de l'expression de *Tyr* (Galibert et al., 2001).

La voie Wnt/β-caténine a également été montrée comme impliquée dans la régulation de la mélanogenèse. Cette voie est activée par la fixation du ligand Wnt sur le récepteur Frizzled et conduit à la stabilisation et à l'accumulation de la β-caténine. Celle-ci peut alors se lier aux facteurs de transcription de la famille LEF/TCF et réguler la transcription de ses gènes cibles, incluant *MITF* (Takeda et al., 2000).

Par ailleurs, d'autres signaux tels que l'activation de la phosphokinase C (PKC) par la phospholypase C (PLC) et la production de diacylglycérol (DAG), conduisent également à la phosphorylation de l'enzyme tyrosinase permettant ainsi sa stabilisation et l'augmentation de son activité enzymatique (Kobayashi et al., 1998; Wu and Park, 2003).

1.3.4. Rôle de p53 dans la réponse des mélanocytes aux rayonnements UV

La protéine suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription jouant un rôle clé dans la réponse cellulaire aux stress génotoxiques tels que les dommages induits par les UV (Farmer et al., 1992; Fields and Jang, 1990). L'exposition de la peau aux UV engendre des dommages à l'ADN dans les kératinocytes qui favorisent la stabilisation de p53 (Kastan et al., 1991).

Il a récemment été établi que p53 joue un rôle important dans la pigmentation de la peau en réponse aux UV. En effet, il a été démontré que *POMC* est une cible transcriptionnelle directe de p53. Ainsi, l'activation de p53 dans les kératinocytes conduit à une augmentation de l'expression de *POMC* et à la libération d'α-MSH et d'ACTH, qui se lient alors aux mélanocytes et régulent l'expression de *MITF* comme décrit précédemment (Cui et al., 2007). Ce mécanisme concorde avec les observations ultérieures de Eller *et al*. montrant que de petits fragments d'ADN induisent la mélanogenèse en augmentant l'expression et l'activité de la tyrosinase (Eller et al., 1996).

Par ailleurs, il a également été mis en évidence que p53 régule la transcription de *HNF-1A* (Hepatocyte Nuclear Factor 1α) qui code pour un facteur de transcription impliqué à la fois dans la régulation de l'expression de *TYR* et de *MITF* (Schallreuter et al., 2003, 2008).

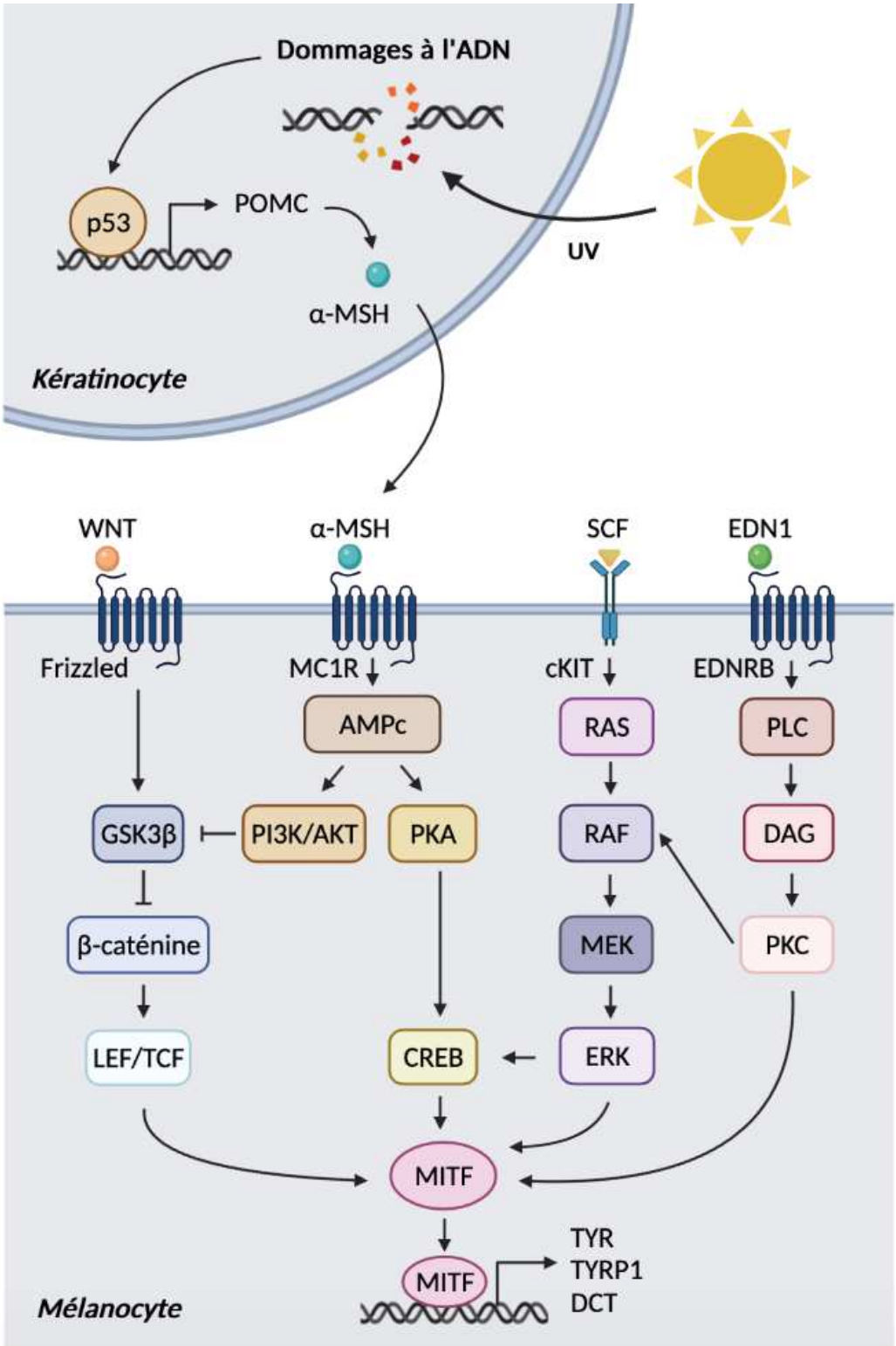


Figure 8 : Voies de signalisation régulant la mélanogenèse

L'activation des voies de signalisation Wnt/β-caténine, AMPc/PKA, MAPK et PKC conduisent à l'expression du facteur MITF. Ce dernier régule l'expression des enzymes de la mélanogenèse. Les dommages à l'ADN causés par les rayonnements UV dans les kératinocytes stabilisent p53. Cela induit l'expression de POMC et la libération d'α-MSH qui active la voie AMPc/PKA et la mélanogenèse dans les mélanocytes.

1.4. MITF

1.4.1. Structure et expression

MITF a été pour la première fois identifié en 1942 par Paula Hertwig qui a observé, dans la descendance de souris irradiées, des individus présentant des défauts de pigmentation et une microphtalmie causée par une mutation dans un locus qu'elle nomma *mi* (Hertwig, 1942). Le gène correspondant à ce locus, renommé *Mitf* pour *Microphtalmia-associated transcription factor*, a ensuite été cloné et identifié en 1993 (Hodgkinson et al., 1993; Hughes et al., 1993). Le gène *Mitf* a été fortement conservé au cours de l'évolution et des homologues sont retrouvés chez de nombreuses espèces, vertébrées comme invertébrées, incluant entre autres l'Homme, la souris, les amphibiens, les poissons, les insectes, les mollusques ou encore les oursins. Notamment, les gènes humains et murins présentent 94,3% d'homologie de séquence (Tachibana et al., 1994).

Mitf est localisé chez l'homme sur le chromosome 3 (chromosome 6 chez la souris) et code pour un facteur de transcription de 58 kDa de type bHLH-LZ (basic-helix-loop-helix-leucine zipper) appartenant à la famille MiT, qui comprend également les facteurs TFEB, TFEC et TFE3 (Hemesath et al., 1994). Le gène *Mitf* comprend 229 kpb et est formé de 9 exons contenant chacun leur propre promoteur alternatif générant ainsi 9 isoformes différentes : MITF-A, B, C, D, E, H, J, M et Mc. Ces isoformes partagent les exons 2 à 9, codant pour les deux domaines de transactivation ainsi que le motif bHLH-Zip impliqué dans la dimérisation et la liaison à l'ADN et diffèrent par leur domaine N-terminal codé par l'exon 1 (Hemesath et al., 1994). Chaque isoforme présente un profil d'expression tissulaire spécifique. Par exemple, l'isoforme 1A est exprimée de manière ubiquitaire, les isoformes 1H et 1D sont retrouvés principalement dans le cœur (Steingrímsson et al., 1994, 2004) et dans l'épithélium pigmentaire de la rétine (Bharti et al., 2008; Takeda et al., 2002) respectivement. L'expression de l'isoforme MITF-M étant quant à elle restreinte à la lignée mélanocytaire (Tassabehji et al., 1994), nous nous concentrerons donc sur celui-ci dans les sections suivantes.

MITF se fixe à l'ADN sous forme d'homodimère ou bien d'hétérodimère avec un autre membre de la famille MiT et régule l'expression de ses gènes cibles en se liant à des motifs E-box caractérisés par la séquence CA[C/T]CTG (Aksan and Goding, 1998). MITF peut également se lier à des motifs appelés M-box (TCATGTGCT) contenant la séquence E-box et retrouvés dans les promoteurs des gènes associés à la mélanogenèse (Bertolotto et al., 1998; Hemesath et al., 1994).

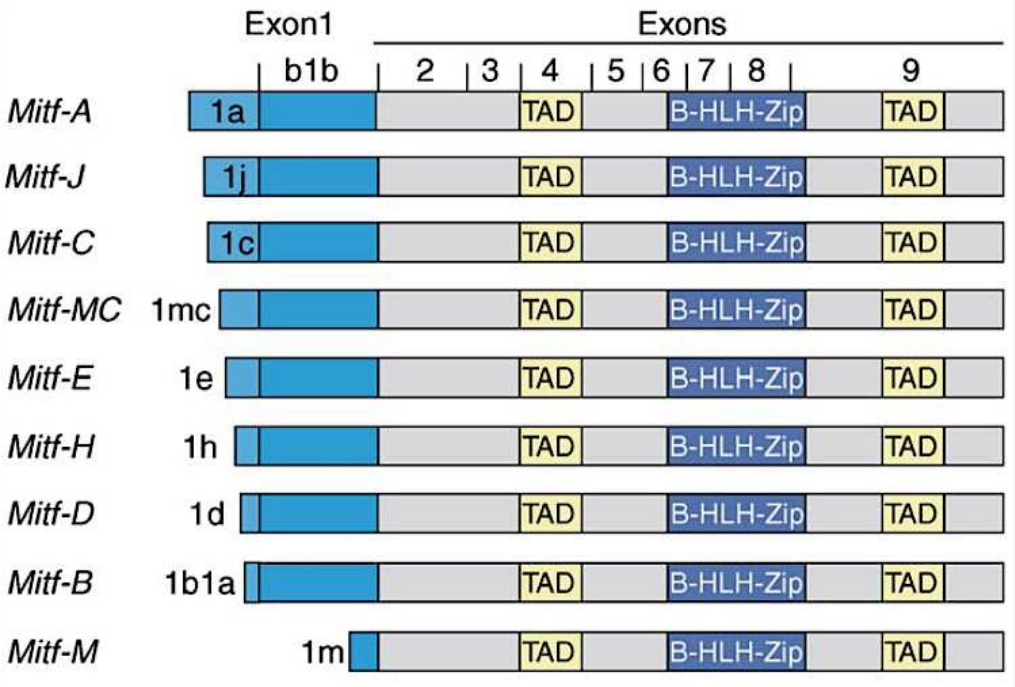


Figure 9 : Structure des isoformes de MITF

Neuf promoteurs différents ont été décrits pour MITF. Les isoformes diffèrent par leur exon 1. Les exons 2 à 9 sont communs à toutes les isoformes et codent pour les domaines de transactivation (TAD) et les domaines hélice-boucle-hélice (bHLH-Zip). Issu de Levy et al., 2006

1.4.2. Régulation

L'expression de MITF est finement régulée aussi bien lors de la mise en place du lignage mélanocytaire qu'au cours de la mélanogenèse. Cette régulation fait intervenir à la fois des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels.

1.4.2.1. Régulation transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle de *MITF* fait intervenir de nombreux facteurs de transcription (Figure 10).

Dans un premier temps, *MITF* peut être régulé par les facteurs de transcription **SOX10** et **PAX3**. Plusieurs études ont démontré que SOX10 et PAX3 se lient au promoteur de *MITF* et coopèrent pour activer son expression lors de la mise en place du lignage mélanocytaire (Bondurand et al., 2000; Lee et al., 2000; Potterf et al., 2001; Verastegui et al., 2000). Elworthy *et al*. ont également mis en évidence que l'injection d'un ARNm *Sox10* dans des embryons de poisson zèbre induit l'expression de *Mitf* (Elworthy et al., 2003).

La fixation de PAX3 au promoteur de *MITF* peut être empêchée par le facteur **FOXD3** (Forkhead transcrition factor). Celui-ci est exprimé dans le tube neural dorsal pendant la première vague de migration des CCN et dans les précurseurs neuronaux et gliaux en migration et prévient la formation des mélanoblastes en réprimant l'expression de *MITF* (Thomas and Erickson, 2009).

De plus, l'augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc ainsi que l'activation de la MAPK p38 en réponse aux UV conduisent à l'activation du facteur de transcription **CREB**. Celui-ci régule positivement l'expression de *MITF* en se liant au motif CRE (cAMP response element) de son promoteur (Bertolotto et al., 1998; Tada et al., 2002). Il a été montré que la capacité de CREB à activer *MITF* en réponse à l'AMPc est dépendante d'un autre facteur de transcription, SOX10 (Huber et al., 2003). A l'inverse, la liaison de CREB sur le promoteur de *MITF* peut être inhibée par le facteur **ATF4** (Activating transcription factor 4). ATF4 est induit à la suite de la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2α en réponse à différents stress cellulaires. En effet, Falleta *et al*. ont mis en évidence dans des lignées de mélanome qu'un stress du réticulum endoplasmique (RE) provoqué par une privation en glutamine conduit à une augmentation d'ATF4 qui réprime alors l'expression de *MITF* en entrant en compétition avec CREB pour la fixation sur son promoteur (Falletta et al., 2017). Un mécanisme similaire a été décrit par Ferguson *et al*. en réponse à une privation en glucose (Ferguson et al., 2017).

Le facteur **LEF1** associé à la β-caténine consécutivement à l'activation de la voie Wnt se lie également au promoteur de *MITF* pour activer sa transcription. En effet, Takeda *et al*. ont démontré que l'ajout exogène de la protéine Wnt3a dans des mélanocytes en culture active le promoteur de *MITF* via le site de liaison LEF1 et que cette activation est inhibée par la coexpression d'une forme dominante négative du facteur LEF1 (Takeda et al., 2000). De façon intéressante, MITF coopère également avec LEF1 pour favoriser sa propre expression (Saito et al., 2002).

ONECUT-2, appartenant à la famille des facteurs de transcription à homéodomaine Onecut et exprimé dans les mélanocytes, induit également l'expression de *MITF*. L'introduction d'une mutation dans son site de liaison par mutagénèse dirigée réduit l'activité du promoteur de *MITF* de 75%, néanmoins aucune mutation impactant l'expression de *MITF* n'a été décrite chez l'Homme (Jacquemin et al., 2001).

ZEB2, un facteur de transcription impliqué dans la transition épithélio-mésenchimateuse (EMT), a également été décrit comme activant l'expression de *MITF* au cours du développement des mélanoblastes et de leur différenciation en mélanocytes (Denecker et al., 2014). L'expression de *ZEB2* dans ces cellules a également été associée à une diminution de l'expression de ***ZEB1*** qui a notamment été décrit comme un répresseur de *MITF* dans l'épithélium pigmentaire rétinien (Liu et al., 2009b).

Dans des lignées cellulaires de mélanomes, **BRN2**, un facteur de transcription à domaine POU, a été décrit à la fois comme un activateur (Wellbrock et al., 2008) et un répresseur (Goodall et al., 2008) de l'expression de *MITF*. De plus, il été observé que l'expression de ***GLI2***, un facteur de transcription de type Kruppel, est inversement corrélée à celle de *MITF* dans des cellules de mélanomes, suggérant qu'il pourrait également participer à la répression de *MITF* dans ce contexte (Javelaud et al., 2011).

En plus de sa régulation transcriptionnelle, *MITF* est également soumis à une régulation post-transcriptionnelle au travers, à la fois du contrôle de la polyadénylation de son ARNm par **CPEB4** (Pérez-Guijarro et al., 2016) et de l'action des **microARN** (Bell and Levy, 2011; Kunz, 2013).

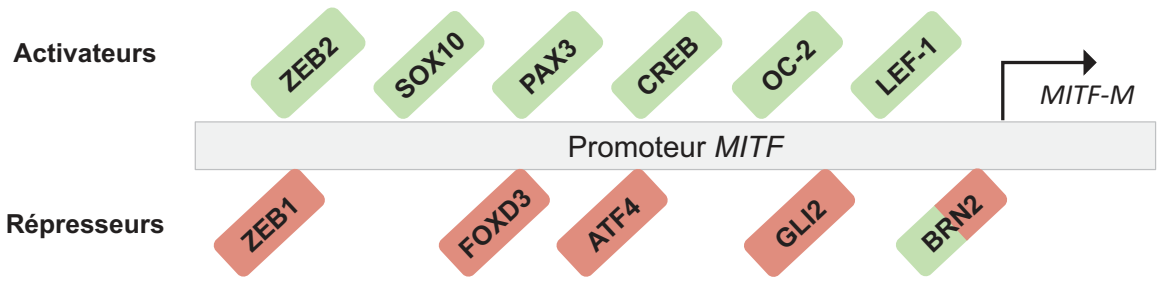


Figure 10 : Régulateurs transcriptionnels de MITF

Les principaux facteurs de transcription activant (en vert) ou réprimant (en rouge) l'expression de MITF sont représentés. D'après Goding and Arnheiter, 2019.

1.4.2.2. Régulation post-traductionnelle

L'activité de MITF est également modulée par de nombreuses modifications post-traductionnelle incluant des phosphorylations, des ubiquitinations, des sumoylations ou encore des clivages protéiques (Figure 11).

Phosphorylations

L'activation du récepteur tyrosine kinase KIT conduit à la phosphorylation de MITF par ERK1/2 et p90RSK sur les résidus Ser73 et Ser409 respectivement (Hemesath et al., 1998). La phosphorylation sur la Ser73 favorise l'interaction de MITF avec son co-facteur, l'histone acétyl-transférase p300/CBP qui augmente ses propriétés transcriptionnelles (Price et al., 1998).La Ser409 peut également être phosphorylée par la sérine/thréonine kinase AKT et sert d'évènement d'initiation pour la phosphorylation des Ser405, Ser401 et Ser397 par la kinase GSK3β. Ces trois phosphorylations conduisent à la déstabilisation de MITF (Wang et al., 2016). GSK3β a également été décrite comme capable de phosphoryler la Ser298 de MITF et d'augmenter son activité transcriptionnelle vis-à-vis de *TYR* (Takeda et al., 2000).

Acétylations

MITF interagit avec les lysine acétyl-transférases p300/CBP (Price et al., 1998; Sato et al., 1997). Il a récemment été mis en évidence que MITF peut être acétylé sur 5 lysines (K21, K33, K43, K243, and K248) et que l'acétylation de la lysine 243 réduit l'affinité de MITF pour ses sites de liaison à l'ADN. De plus, les auteurs ont également montré qu'un mutant K243Q, mimant une acétylation constitutive, favorise la formation de tumeur à partir de xénogreffes de cellules de mélanome chez la souris, suggérant que l'acétylation de MITF pourrait influencer la tumorigénicité des mélanomes (Louphrasitthiphol et al., 2020).

Ubiquitinations

MITF peut être ubiquitinée par la E2 ligase UBC9 (Ubiquitin Conjugating Enzyme 9) sur la lysine Lys201, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome (Xu et al., 2000). Cette ubiquitination est dépendante de la phosphorylation de la sérine Ser73. Au contraire, MITF peut être déubiquitinée par USP13, favorisant alors sa stabilisation et son accumulation intracellulaire (Zhao et al., 2011).

Sumoylation

MITF possède deux sites de sumoylation : Lys182 et Lys316. La sumoylation de ces sites dépend d'une enzyme hétérodimérique activatrice de SUMO E1, SAEI/SAEII et d'une enzyme conjugatrice de SUMO E2, UBC9 (Murakami and Arnheiter, 2005). Il a été montré que ces modifications impactent la liaison de MITF aux promoteurs de ses gènes cibles. Il a également été indiqué que la SUMO E3 ligase PIAS3 peut promouvoir la sumoylation de MITF et réprimer ses capacités de liaison à l'ADN (Levy et al., 2002, 2003). De plus, la mutation E318K, qui interfère avec la sumoylation de la Lys316 a été décrite comme une prédisposition au développement de mélanomes et de carcinomes rénaux et augmente la capacité de migration et d'invasion des cellules de mélanome in vitro (Bertolotto et al., 2011).

Clivage protéique

Enfin, la protéine MITF peut être clivée au cours de la mort cellulaire par apoptose. En effet, il a été mis en évidence que la liaison de TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) aux récepteurs DR4 et DR5 (death receptor 4 et 5) des mélanocytes conduit à l'activation des caspases 3, 6 et 7 qui clivent MITF au niveau de l'asparagine 345. Cela conduit à la formation de fragments aux propriétés pro-apoptotiques. Néanmoins le mécanisme moléculaire par lequel ces fragments favorisent la mort cellulaire reste à déterminer (Larribere et al., 2005).

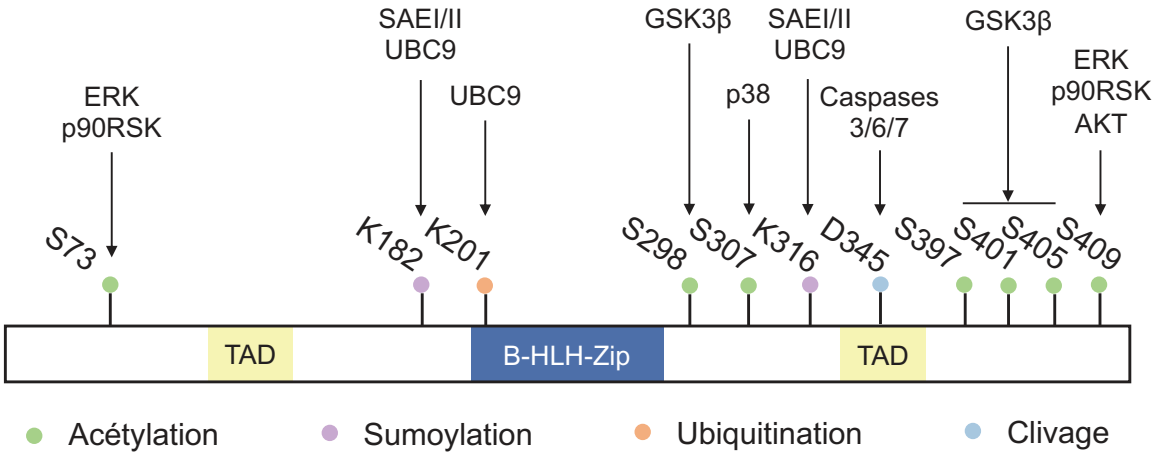


Figure 11 : Régulations post-traductionnelle de MITF

D'après Goding and Arnheiter, 2019.

1.4.1. Rôle dans l'homéostasie des mélanocytes

MITF est décrit comme un régulateur majeur de l'homéostasie des mélanocytes. En effet, sa perte de fonction, par mutation ou inactivation, conduit à une absence totale de cellules pigmentées chez le poisson zèbre (Lister et al., 1999). De plus, chez la souris, l'allèle mutant *Mitf*^{mi}, portant la mutation classique du gène *Mitf* induite par les radiations (Hertwig, 1942) et résultant de la délétion d'un des quatre résidus arginine dans la région basique du gène (Hodgkinson et al., 1993) conduit à la présence de taches blanches sur le pelage à l'état hétérozygote et à une absence totale de pigmentation, une microphtalmie sévère et une surdité à l'état homozygote (Hertwig, 1942; Silvers, 1979) Il a également été montré que MITF est essentiel au développement précoce des mélanocytes et à la survie et à la prolifération des mélanoblastes. En effet, la *Mitf*^{mi} entraine une réduction du nombre de mélanoblastes au cours du développement chez la souris (Hornyak et al., 2001; Opdecamp et al., 1997). L'importance de MITF s'explique par la régulation d'un grand nombre de gènes - 465 gènes ont été montrés comme directement régulés par MITF (225 induits, 240 réprimés, (Strub et al., 2011)) – qui interviennent dans de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, la pigmentation, la prolifération, la survie, la maintenance du génome et le métabolisme.

MITF joue tout d'abord un rôle clé dans la différenciation des mélanocytes, en régulant l'expression des enzymes de la mélanogenèse : TYROSINASE (Bentley et al., 1994; Galibert et al., 2001), TYRP1 et DCT (Bertolotto et al., 1998; Lang et al., 2005; de la Serna et al., 2006). L'expression de DCT nécessite notamment la coopération de MITF avec d'autres facteurs de transcription tels que CREB (Bertolotto et al., 1998), SOX10 (Ludwig et al., 2004) ou LEF1 (Yasumoto et al., 2002) et est réprimée par PAX3 (Lang et al., 2005). MITF régule également d'autres facteurs impliqués dans la pigmentation, tels que des protéines responsables de la maturation des mélanosomes telles que SILV (aussi nommé PMEL17 ou GP100, (Berson et al., 2001; Raposo et al., 2001)), MLANA (Hoashi et al., 2005), GPR143 (Vetrini et al., 2004) et de leur transport sur le réseau d'actine (RAB27A (Chiaverini et al., 2008), MYO5A (Alves et al., 2017)). De plus, MITF a été décrit comme impliqué dans la régulation de l'expression du récepteur MC1R qui permet l'activation de la voie AMPc/PKA lors de la mélanogenèse (Aoki and Moro, 2002).

MITF est également essentiel à la régulation de plusieurs facteurs impliqués dans la survie et à la prolifération du lignage mélanocytaire. Il participe tout d'abord à la régulation du cycle cellulaire en induisant l'expression de cyclines (cyclines B1, D1 (Strub et al., 2011)) et de kinases cycline-dépendantes (CDK2 (Du et al., 2004), CDK4 (Wellbrock et al., 2008)) favorisant ainsi l'entrée en mitose et la prolifération des cellules de mélanome. Il a également été montré que MITF régule l'expression du facteur de transcription T-Box Transcription Factor 2 (TBX2) qui bloque l'entrée en sénescence en réprimant $p21^{Cip1}$ et $p19^{ARF}$ (Béjar et al., 2003; Carreira et al., 2005). De plus, MITF participe à la survie cellulaire en induisant l'expression de facteurs anti-apoptotiques, BCL2 (McGill et al., 2002) et BIRC7 (Dynek et al., 2008). De la même manière, MITF régule aussi l'expression de l'Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 (APE1, (Liu et al., 2009a)) et de Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha (HIF1α, (Buscà et al., 2005)) et participe ainsi à la protection des cellules contre les signaux pro-apoptotiques liés au stress oxydant. Par ailleurs, il a été mis en évidence que MITF régule l'expression de DICER, une enzyme impliquée dans la régulation des microARNs et nécessaire à la survie des mélanocytes en culture. Plus précisément, MITF au travers de la régulation de DICER favorise l'expression du microARN miR17 qui réprime le facteur pro-apoptotique BIM (Bcl-2-like protein 11), favorisant ainsi la survie des mélanocytes (Levy et al., 2010).

La déplétion de MITF conduit à une augmentation du nombre de foci γH2AX, associés aux dommages à l'ADN (Giuliano et al., 2010), suggérant alors un rôle de MITF dans la maintenance du génome. En effet, MITF contrôle la transcription de facteurs de réparation de l'ADN incluant BRCA1 (Giuliano et al., 2010), LIG1, FANCA, RAD54 ou encore la télomérase codée par *TERT1* (Strub et al., 2011).

Au niveau du métabolisme cellulaire, il a été mis en évidence que MITF induit l'expression de PGC1α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), un régulateur majeur de la biogénèse mitochondriale impliqué dans le contrôle du métabolisme énergétique et favorise ainsi la phosphorylation oxydative (Haq et al., 2013).

Compte-tenu du rôle essentiel de MITF dans de nombreux processus cellulaires, il n'est donc pas étonnant que l'altération de son expression soit associée au développement de pathologies chez l'Homme. En effet, des mutations de *MITF* ont été mise en évidence dans des pathologies cutanées telles que le syndrome de Waardenburg ou le syndrome de Tietz (voir section suivante).

Par ailleurs, MITF a été largement décrit comme impliqué dans le développement des cancers de la peau dérivant des mélanocytes, les mélanomes. En effet, une amplification de *MITF* a été observée dans 10 à 20% de ces tumeurs, avec une incidence plus élevée parmi les mélanomes métastatiques et corrélée à une diminution de la survie des patients (Garraway et al., 2005). De plus, dans les mélanomes, plusieurs mutations somatiques de *MITF* ont été décrites bien que leurs conséquences biologiques restent à déterminer (Cronin et al., 2009). Une mutation germinale gain de fonction E318K de *MITF*, interférant avec la sumoylation de la Lys316, a également été mise en évidence et prédispose au développement des mélanomes (Bertolotto et al., 2011).

En outre, les mélanomes présentent une activation constitutive de la voie MAPK, due à des mutations dans *BRAF* (*BRAF*^{V600E}) et *NRAS* (*NRAS*^{Q61K}) (Davies et al., 2002). Cela favorise la phosphorylation de MITF, augmentant ainsi son activité transcriptionnelle tout en modulant sa stabilité (Wu et al., 2000; Xu et al., 2000). Il a également été mis en évidence que BRAF^{V600E} peut induire l'expression de *MITF* par le biais du facteur de transcription BRN2 (Wellbrock et al., 2008). De plus, il a été décrit que l'accumulation de la β-caténine, fréquemment observée dans les mélanomes, participe, via les facteurs de transcription TCF/LEF1, à la surexpression de *MITF* dans ce contexte (Widlund et al., 2002).

Bien que plusieurs études attribuent à MITF des fonctions pro-prolifératives, le désignant notamment comme un oncogène (Garraway et al., 2005), d'autres études lui suggèrent un rôle anti-prolifératif (Carreira et al., 2005). Ainsi, il a été mis en évidence que la surexpression de MITF dans des lignées de mélanome induit une diminution de la prolifération et de la tumorigénicité (Selzer et al., 2002; Wellbrock and Marais, 2005). De plus, une faible expression de MITF dans une cohorte de patients a été associée à une augmentation du risque de métastases et à une diminution de la survie (Salti et al., 2000).

Afin de répondre à ces observations contradictoires, Carreira *et al*. ont proposé un modèle (modèle « rhéostat ») décrivant les effets de différents niveaux d'expression de *MITF*. Selon ce modèle, un haut niveau de MITF conduit à un arrêt du cycle cellulaire et à la différenciation, un niveau modéré favorise la prolifération et la survie, tandis qu'un faible niveau induit l'invasion (Carreira et al., 2006). De plus, il a été suggéré que les niveaux de MITF fluctuent entre les différents stades de croissance tumorale, permettant aux cellules cancéreuses d'osciller entre des phénotypes différenciés, prolifératifs et invasifs (Hoek and Goding, 2010).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux démontre que les variations des niveaux d'expression de MITF ainsi que de son activité jouent un rôle crucial dans la biologie des mélanocytes et le développement des mélanomes, et illustre la nécessité d'une régulation fine de MITF dans ces processus.

1.5. Pathologies associées à un dysfonctionnement du lignage mélanocytaire

Des mutations dans les gènes codants les différents acteurs du développement et de la physiologie du lignage mélanocytaire évoqués précédemment conduisent à de nombreuses pathologies chez l'Homme, décrites dans le Tableau 1. Ces mutations peuvent impacter la migration des mélanoblastes, la mélanogenèse, la formation des mélanosomes et leur transfert, ou encore la survie des mélanocytes. Elles provoquent ainsi des défauts de pigmentation de la peau, des poils et des yeux mais également parfois des altérations de la vision et de l'ouïe compte-tenu de la présence respective de mélanocytes dans l'œil et dans l'oreille interne.

Tableau 1 : Pathologies associées à un dysfonctionnement du lignage mélanocytaire

Processus biologique	Pathologie		Gène muté et fonction	Références bibliographiques
Migration des mélanoblastes	Piebaldisme		*KIT* (prolifération, survie des mélanoblastes)	Fleischman et al., 1991; Giebel and Spritz, 1991
	Syndrome de Waardenburg (WS)	WS1/WS3	*PAX3* (régulation de *MITF*, expansion des mélanoblastes)	Hoth et al., 1993; Tassabehji et al., 1993
		WS2	*MITF* (mélanogenèse, survie du lignage mélanocytaire)	Hughes et al., 1994; Nobukuni et al., 1996
			SLUG (migration mélanoblastes)	Sánchez-Martín et al., 2003
		WS2/WS4	*SOX10* (régulation de *MITF*, survie mélanoblastes)	Bondurand et al., 2007; Pingault et al., 1998
		WS4	*EDN3* (migration et prolifération des mélanoblastes)	Edery et al., 1996
			EDNRB (migration et prolifération des mélanoblastes)	Attié et al., 1995; Pingault et al., 2001
	Syndrome de Tietz		*MITF* (mélanogenèse, survie du lignage mélanocytaire)	Amiel et al., 1998; Smith et al., 2000
Mélanogenèse	Albinisme oculo-cutané (OCA)	OCA1	*TYR* (mélanogenèse)	Barton et al., 1988; Oetting and King, 1999
		OCA2	*P* (transport intracellulaire de TYROSINASE)	Brilliant, 2001
		OCA3	*TYRP1* (mélanogenèse)	Chintamaneni et al., 1991
		OCA4	*MATP* (transporteur membranaire des mélanosomes)	Newton et al., 2001
	Albinisme oculaire		*OA1* (fonction inconnue)	Incerti et al., 2000
Formation des mélanosomes	Syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS)	HPS1	*HPS1* (biogénèse des organelles liées aux lysosomes)	Martina et al., 2003
		HPS2	*AP3B1* (tri des proteines vers les lysosomes)	Dell'Angelica et al., 1999
		HPS3	*HPS3* (biogénèse et maturation des mélanosomes)	Suzuki et al., 2001
		HPS4-6	*HPS4-6* (biogénèse des organelles liées aux lysosomes)	Martina et al., 2003; Zhang et al., 2003
		HPS7	*DTNBP1* (biogénèse des organelles liées aux lysosomes)	Li et al., 2003
	Syndrome de Chedial Higashi		*CHS1* (transport des protéines aux lysosomes)	Faigle et al., 1998
Transfert des mélanosomes	Syndrome Griscelli-Prunieras (GS)	GS1	*MYO5A* (transport des mélanosomes)	Ménasché et al., 2003
		GS2	*RAB27A* (transport des mélanosomes)	Bahadoran et al., 2001
		GS3	*MLPH* (transport des mélanosomes)	Ménasché et al., 2003
			MYO5A (transport des mélanosomes)	Ménasché et al., 2003
Survie des mélanocytes	Vitiligo		Locus de susceptibilité *AIS1*, *AIS2*, *AIS3*, *SLEV1*	Fain et al., 2003; Spritz et al., 2004

2. Mélanomes cutanés

Les cancers de la peau sont classés en trois groupes : les carcinomes basocellulaires et les carcinomes spinocellulaires qui se développent tous deux à partir des kératinocytes, et les mélanomes qui dérivent des mélanocytes.

Une prolifération incontrôlée des mélanocytes conduit à la formation de lésions cutanées qui peuvent être bénignes, appelées nævi ou plus communément grains de beauté, ou bien malignes, les mélanomes. Bien que 30% des mélanomes apparaissent à partir de nævi préexistants, la plupart se développent *de novo* à la suite de la transformation cancéreuse de mélanocytes (Pampena et al., 2017; Stolz et al., 1989; Weatherhead et al., 2007). Les mélanomes apparaissent majoritairement au niveau de la peau (mélanomes cutanés), cependant ils peuvent également se former dans l'iris, le corps ciliaire ou la choroïde (mélanomes de l'uvée) ou plus rarement sur les muqueuses respiratoires, digestives ou reproductives (mélanomes muqueux). Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons uniquement aux mélanomes cutanés.

Les mélanomes représentent les cancers de la peau les plus agressifs compte-tenu de leur importante capacité à former des métastases dans de nombreux organes incluant la peau, les nœuds lymphatiques, le foie, les poumons, les os et le cerveau. Malgré le développement de nouvelles approches thérapeutiques telles que les thérapies ciblées et l'immunothérapie, la mortalité causée par les mélanomes reste élevée en raison de nombreux mécanismes de résistances liés à l'importante flexibilité et adaptabilité des tumeurs.

2.1. Épidémiologie et facteurs de risque

Bien que les mélanomes représentent moins de 5% des cancers cutanés, ils sont responsables de la majorité des décès associés à ce type de cancer. Leur incidence est variable selon les régions du monde : elle est notamment plus élevée en Australie, Nouvelle-Zélande, Europe de l'ouest et du nord et Amérique du nord (Figure 12). En France, les mélanomes se placent au 6ème rang dans le classement des cancers en termes d'incidence et au 18ème en termes de mortalité. 16 449 nouveaux cas et 2 125 décès ont été déclarés en 2020.

Les mélanomes représentent le type de cancer dont l'incidence annuelle augmente le plus rapidement. En effet, celle-ci a augmenté de plus de 50% au cours de la dernière décennie (Globocan 2020, International Agency for Research on Cancer). De plus, de façon alarmante, l'Organisation Mondiale de la Santé prédit une augmentation du nombre de décès par mélanome cutané de 20% d'ici 2025 et de 74% d'ici 2040.

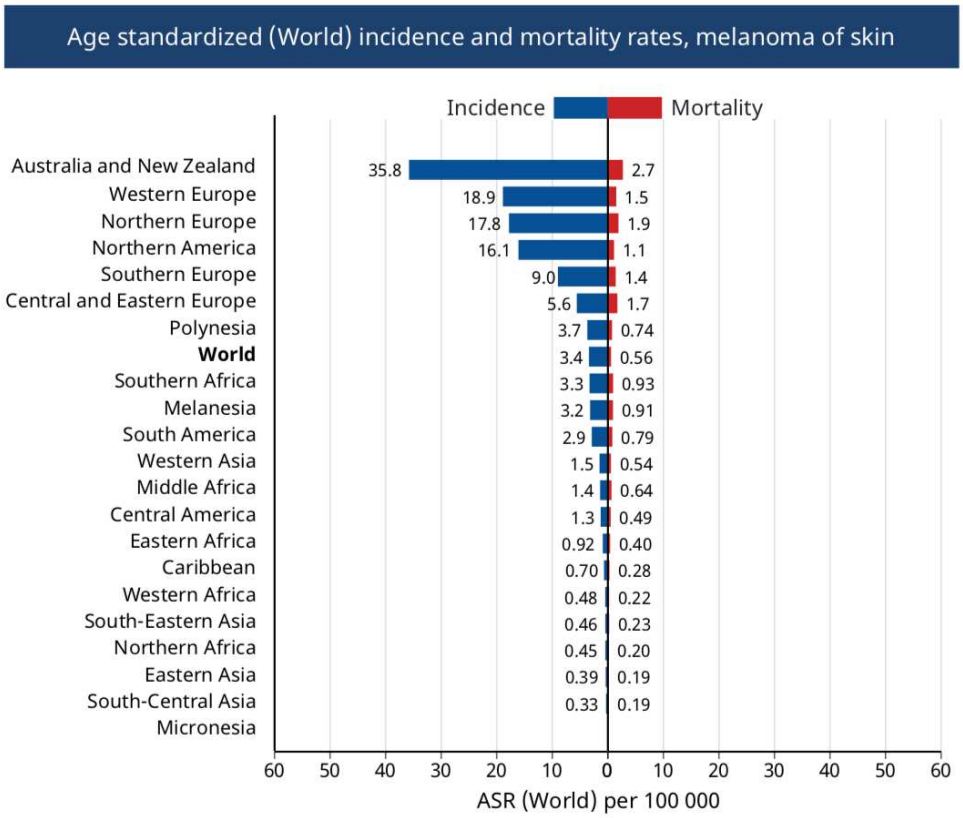


Figure 12 : Taux d'incidence et de mortalité des mélanomes à travers le monde

Source : Globocan 2020

Les principaux facteurs de risque des mélanomes sont l'exposition intense et intermittente aux rayonnements UV et l'apparition de brulures liées au soleil notamment celles survenues pendant l'enfance (Gandini et al., 2005). Le phototype cutané, et ainsi la façon dont la peau réagit au soleil est également à prendre en considération. En effet, les peaux très claires ne bronzant pas ou peu (phototypes I et II) sont plus à risque de développer un mélanome que les peaux foncées (Bliss et al., 1995; Fitzpatrick, 1988). De plus, la présence de nævi nombreux (>100) ou atypiques constitue un facteur de risque supplémentaire (Gandini et al., 2005; Watt et al., 2004). Par ailleurs, environ 10% des mélanomes ont une origine héréditaire et sont liés à des mutations dans des gènes de susceptibilité *CDKN2A*, *CDK4*, *MC1R* ou *MITF* (Bertolotto et al., 2011; Kamb et al., 1994; Robinson and Healy, 2002; Zuo et al., 1996).

2.2. Diagnostic et classification

Le diagnostic du mélanome survient généralement après l'apparition d'un nævus anormal, d'une lésion ou d'une inflammation de la peau. L'examen clinique de la lésion suspecte repose sur la règle ABCDE : lésion asymétrique (A), à bords (B) irréguliers, de couleur (C) hétérogène, de diamètre (D) supérieur à 5 mm et évolutive (E).

Une classification basée sur l'aspect morphologique et la localisation de la tumeur primaire a été proposée par Clark et al. (Clark et al., 1984) et distingue quatre sous-types majeurs de mélanomes (Figure 13) :

- mélanome superficiel extensif, est la forme la plus commune (70% des cas) et apparait principalement sur des zones exposées au soleil. Il présente une croissance lente, radiale et superficielle avant d'envahir les couches plus profondes de la peau. Il apparait chez les patients jeunes et peut se développer à partir d'un nævus préexistant.
- mélanome nodulaire, représente la forme la plus agressive (20% des mélanomes). Il se caractérise par une croissance rapide et une importante capacité d'invasion. Il se développe principalement *de novo*.
- mélanome lentigo malin ou mélanome de Dubreuilh, concerne 5 à 10% des cas, se développe sur des zones exposées au soleil de façon chronique, quasi-exclusivement chez les patients âgés et présente une évolution lente (5 à 15 ans).
- mélanome acro-lentigineux, est un mélanome rare (5% des cas), il se développe chez les patients de phototype V et VI au niveau de la paume des mains, la plante des pieds et sous les ongles.

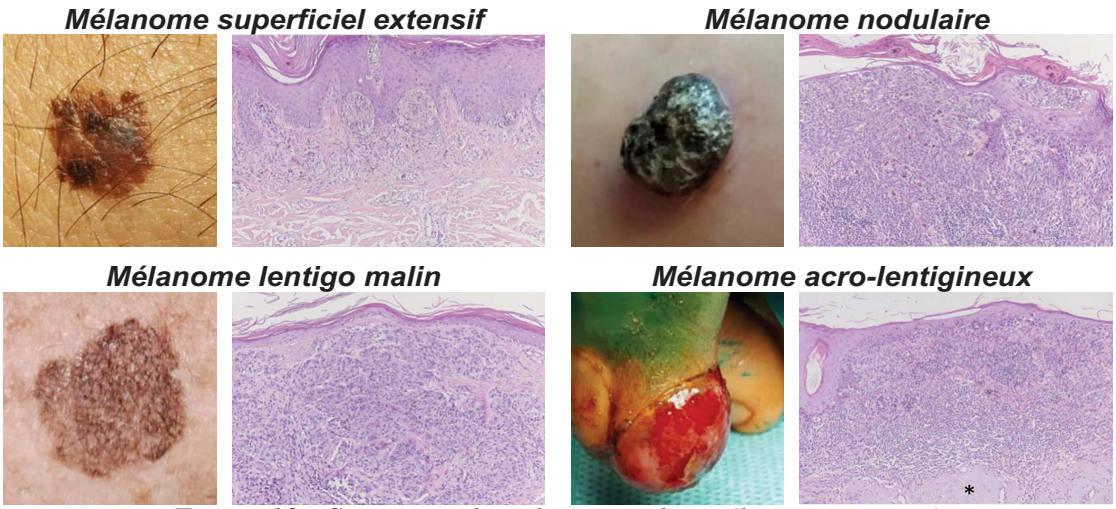


Figure 13 : Sous-types histologiques des mélanomes cutanés

Issu de Scatena et al., 2021.

Le stade tumoral est déterminé en prenant en considération la taille de la lésion, l'épaisseur de la tumeur (indice de Breslow), la présence d'ulcérations, l'atteinte ganglionnaire et la présence de métastases (Gershenwald et al., 2017) :

- Stade 0 : Tumeur *in situ*
- Stades I et II : Tumeur localisée. Subdivisés en stade IA, IB, IIA, IIB et IIC selon l'épaisseur de la tumeur et la présence d'ulcérations.
- Stade III : Dissémination métastasique régionale. Caractérisé par la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux drainant la tumeur et/ou de métastases en transit, de métastases satellites ou microsatellites.
- Stade IV : Dissémination métastatique à distance.

2.3. Initiation et progression des mélanomes cutanés

Le développement des mélanomes a été décrit par Clark *et al*. comme un processus multi-étapes (Clark et al., 1984). Selon ce modèle, une première phase de prolifération des mélanocytes suivie d'une entrée en sénescence conduit à la formation de lésions bénignes, les nævi. Un échappement à la sénescence permet ensuite aux cellules de proliférer tout d'abord de façon superficielle dans l'épiderme (phase de croissance radiale, RGP) puis d'envahir le derme (phase de croissance verticale, VGP) avant de former des métastases et de se disséminer dans l'organisme (Figure 14). Néanmoins, comme évoqué précédemment, la plupart des mélanomes se développent *de novo*, sans association avec un nævus préexistant, ce qui suggère que ces tumeurs sont capables de contourner la sénescence par des mécanismes qui seront décrit ci-après. De plus, la durée de chaque phase peut être très variable au cours du développement des mélanomes selon l'acquisition plus ou moins rapide d'altérations génétiques favorisant la progression tumorale.

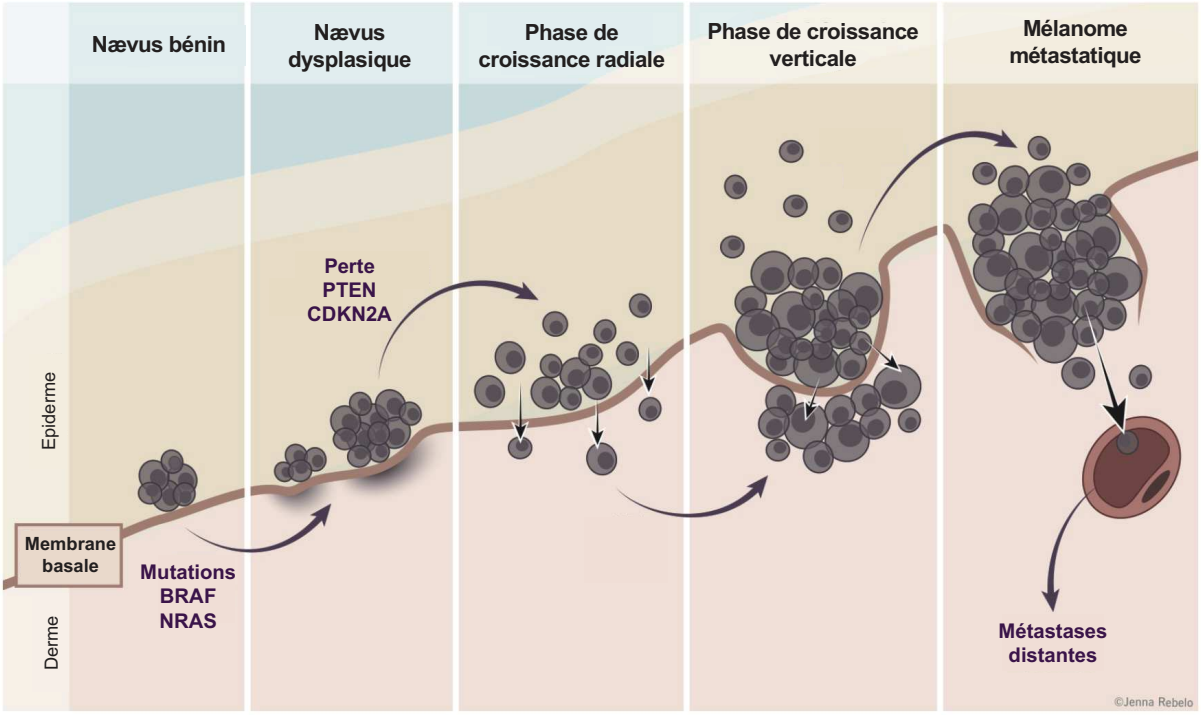


Figure 14 : Étapes de progression des mélanomes

Selon le modèle de Clark, le développement des mélanomes est initié par la transformation d'un nævus bénin en nævus dysplasique. Les étapes suivantes comprennent une phase de croissance radiale, une phase de croissance verticale (invasion du derme) et la propagation à distance (métastases). Adapté de McMaserPathophysiology Review (J. Seuradge et E. Wong).

2.3.1. Transformation des mélanocytes

La transformation des mélanocytes est initiée par des mutations conduisant à l'activation anormale de la voie des MAPK qui joue un rôle majeur dans la prolifération et la survie cellulaire (Fecher et al., 2008). En effet, il a été observé que cette voie est constitutivement activée dans 90% des mélanomes (Cohen et al., 2002), à la suite de mutations somatiques « gain-de-fonction » dans les protéines RAS ou RAF (Zhuang et al., 2005) (Figure 15).

La plupart des mutations concerne l'oncogène *BRAF*, muté dans 60% des mélanomes, et concerne principalement la valine en position 600 (V600). Celle-ci est remplacée par un acide glutamique (V600E) dans 95% des cas ou de façon plus occasionnelle par une lysine (V600K) ou un acide aspartique (V600D). La mutation $BRAF^{V600E}$ reproduit la phosphorylation du domaine kinase et conduit à son activation constitutive et à l'augmentation de la phosphorylation de ERK (Davies, 2012).

Des mutations du gène *NRAS* sont également observées dans 15% des mélanomes. *NRAS* constitue d'ailleurs le premier oncogène à avoir été identifié dans les mélanomes (Albino et al., 1984; Padua et al., 1985). Les mutations les plus fréquentes ciblent la glutamine en position 61 (Q61), remplacée par une lysine (Q61K) ou une arginine (Q61R), et conduisent à la formation d'une protéine constitutivement active.

Les mutations de *BRAF* et *NRAS* semblent mutuellement exclusives (Goel et al., 2006) mais peuvent être associées aux mutations d'autres acteurs tels que *NF1* (Neurofibromin 1). Ce dernier représente le 3ème gène le plus fréquemment muté dans les mélanomes primaires et code pour une protéine régulant l'activité de GTPases, telles que RAS, en favorisant l'hydrolyse du GTP en GDP. Une inactivation de *NF1* est observée dans 14% des mélanomes (Maertens et al., 2013) et de façon plus fréquente dans les mélanomes exprimant des formes non mutées de *BRAF* et *NRAS* (Krauthammer et al., 2015). Cette inactivation permet de maintenir RAS dans une forme active et favorise ainsi la signalisation de la voie MAPK (Nissan et al., 2014).

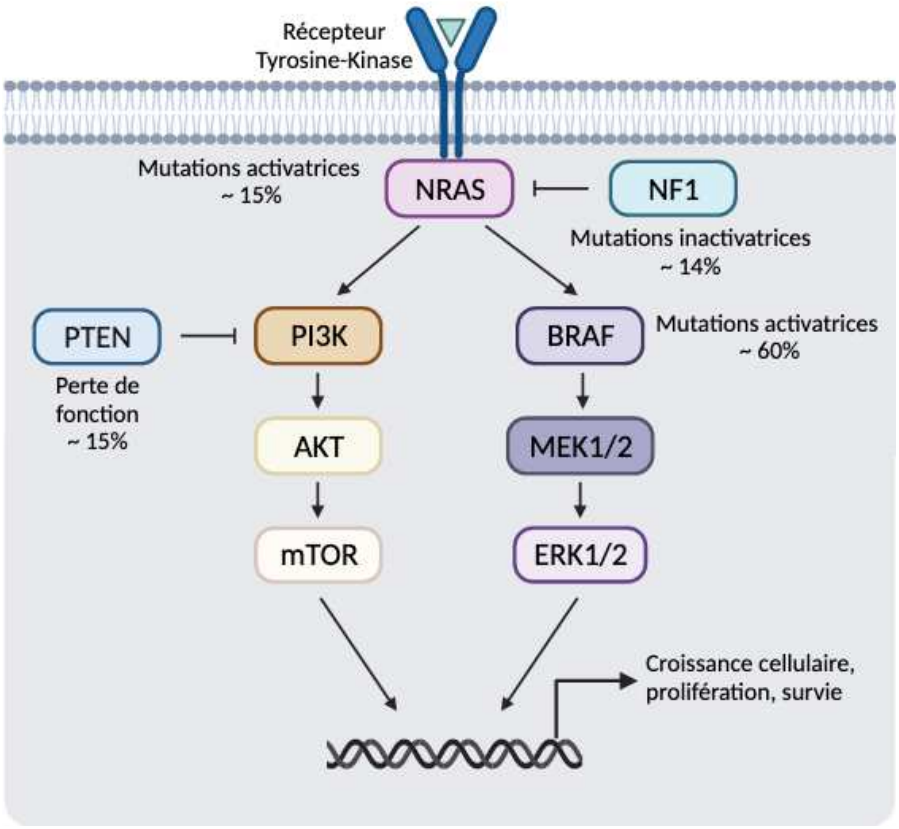


Figure 15 : Altérations des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT dans les mélanomes

Les principales mutations affectant les voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT dans les mélanomes et leurs fréquences sont indiquées.

L'hyperprolifération résultant de l'activation de ces oncogènes *BRAF* et *NRAS*, associée ou non à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur tels que *NF1*, conduit à l'induction d'un état de sénescence (oncogene-induced senescence ou OIS), qui se caractérise par un arrêt du cycle cellulaire lié à une augmentation de l'expression de $p16^{INK4A}$ et une accumulation de p53 (Michaloglou et al., 2005; Serrano et al., 1997). $p16^{INK4A}$ inhibe la phosphorylation de la protéine Rb (rétinoblastome) par CDK4 et CDK6 et induit alors la séquestration des facteurs de transcription E2F-1, 2 et 3 dans un complexe inactif pRb/E2F bloquant la progression du cycle cellulaire (Lukas et al., 1995; Schulze et al., 1994). Cet OIS empêche ainsi la progression des mélanomes et conduit à l'apparition de lésions bénignes, les nævi.

2.3.2. Échappement à la sénescence et phase de croissance radiale

Afin de contourner cet état de sénescence précédemment décrit et de permettre la prolifération des mélanocytes dans l'épiderme au cours de la phase de croissance radiale, des altérations génétiques additionnelles, concernant principalement les gènes *CDKN2A*, *PTEN* et *TERT*, sont nécessaires.

CDKN2A code 2 régulateurs du cycle cellulaire $p16^{INK4A}$ et $p14^{ARF}$. Comme évoqué précédemment $p16^{INKA}$ inhibe CDK4 et CDK6 et ainsi la phosphorylation de Rb (Serrano et al., 1993). La protéine $p14^{ARF}$, quant à elle, inhibe l'ubiquitine E3-ligase MDM2 (Murine Double Minute 2) responsable de la dégradation du suppresseur de tumeur p53 par le protéasome (Sherr and Weber, 2000). L'inhibition de Rb et la stabilisation de p53 favorisent alors l'arrêt du cycle cellulaire et peuvent conduire à l'apoptose. L'expression de $p16^{INK4A}$ et $p14^{ARF}$ est altérée dans la plupart des mélanomes, par délétion de *CDKN2A* (Curtin et al., 2009), mutations germinales ou somatiques ou encore méthylation du promoteur (Straume et al., 2002).

Bien que p53, décrit comme le gardien du génome, soit muté dans plus de 50% des cancers, peu de mutations de *TP53* sont décrites dans les mélanomes (Albino et al., 1984; Hodis et al., 2012). Néanmoins, les fonctions de p53 sont altérées en raison de la perte de $p14^{ARF}$ qui favorise sa dégradation via MDM2 (Zhang et al., 1998).

De plus, des surexpressions de MDM2 et MDM4 ont également été mises en évidence dans les mélanomes (Gembarska et al., 2012; Muthusamy et al., 2006; Polsky et al., 2001). Tandis que l'exon 6 de *MDM4* est habituellement exclu par épissage alternatif dans les tissus adultes normaux, conduisant à un variant *MDM4-S* rapidement dégradé et donc une absence de protéine MDM4 dans ces tissus, Dewaele *et al*. ont montré que l'exon 6 est fréquemment inclus dans différents cancers humains, y compris dans les mélanomes. La forme complète de MDM4 qui en résulte participe alors à la répression de p53, à la prolifération cellulaire et à la résistance aux thérapies des cellules de mélanome (Dewaele et al., 2016).

La perte du suppresseur de tumeur *PTEN* (Phosphatase and TENsin homolog), par mutation ou délétion, est fréquemment décrite dans les mélanomes (Bastian et al., 1998; Goel et al., 2006; Guldberg et al., 1997; Tsao et al., 1998). La phosphatase PTEN réprime la voie PI3K en prévenant l'activation de la kinase AKT. Ainsi, la perte de *PTEN* dans les cellules de mélanome conduit à une activation aberrante de la voie de signalisation PI3K/AKT et favorise la prolifération et la survie des cellules (Stahl et al., 2003; Wu et al., 2003). Le rôle crucial de PTEN dans le développement des mélanomes est notamment supporté par l'étude de Dankort *et al*. démontrant que la perte de *PTEN* est un évènement indispensable à la survenue de mélanomes dans un modèle murin muté *BRAF* (Dankort et al., 2009).

Par ailleurs, des mutations fréquentes dans le promoteur du gène *TERT* ont été observées dans les mélanomes. Elles permettent une expression aberrante de la télomérase, une enzyme impliquée dans la maintenance des télomères, participant ainsi à l'immortalisation des cellules (Hayward et al., 2017; Horn et al., 2013; Huang et al., 2013).

2.3.3. Phase de croissance verticale et invasion

Au cours de la phase de croissance verticale, bien que les mélanocytes ne soient pas des cellules épithéliales, un processus semblable à la transition épithélio-mésenchymateuse est observé. En effet, les cellules de mélanome perdent le contact avec les kératinocytes environnants, acquièrent des capacités de migration et d'invasion et progressent alors en profondeur dans le derme.

Ce processus s'accompagne d'un important changement de profil d'expression génique, rendu possible par la forte plasticité des cellules de mélanome, et est caractérisé par une diminution de l'expression de gènes associés à un profil prolifératif et l'apparition d'une signature invasive (Hoek et al., 2008). Cette signature comprend notamment les facteurs de transcription SNAIL (SNAIL1/SNAIL2), ZEB (ZEB1/ZEB2) et TWST1.

Une perte d'expression des facteurs de transcription *ZEB2* et *SNAIL2*, impliqués dans la différenciation des mélanocytes, est observée lors de la progression des mélanomes, en faveur d'une augmentation de l'expression de *TWIST1* et *ZEB1* qui favorisent l'EMT et l'invasion (Caramel et al., 2013). La migration des cellules de mélanome fait également intervenir des modifications d'expression des molécules d'adhésion telles que les cadhérines et les intégrines. Une perte d'expression de la E-cadhérine est notamment observée au profit de l'expression de la N-cadhérine. Ces modifications sont régulées par les facteurs de transcription TWIST1 et ZEB1, eux-mêmes induits par la voie de signalisation PI3K/AKT (Hao et al., 2012). De plus, cette substitution E-cadhérine/N-cadhérine favorise la prolifération et la survie cellulaire. En effet, la perte de la E-cadhérine conduit à l'accumulation cytoplasmique de la β-caténine tandis que la N-cadhérine favorise l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK (Loh et al., 2019).

Il a également été décrit que les cellules possédant une faible expression de MITF ($MITF^{low}$) présentaient de plus importantes capacités invasives que les populations avec une forte expression de MITF ($MITF^{high}$) qui, elles, sont davantage tournées vers la prolifération (Hoek et al., 2006). Dans les mélanomes, l'expression de *MITF* peut être réprimée par le facteur de transcription BRN2 (aussi nommé POU3F2, (Goodall et al., 2008)) et par le TGF-β qui inhibe la signalisation PKA et induit également GLI2, un répresseur de *MITF* (Javelaud et al., 2011). MITF se lie aux promoteurs des gènes *RaLP* et *MCAM*, tous deux impliqués dans la migration cellulaire, et réprime leur expression. Cela suggère donc que la diminution de l'expression de MITF dans les cellules de mélanome pourrait lever la répression de ces deux acteurs et favoriser la motilité cellulaire (Fagiani et al., 2007; Rao et al., 2016).

La migration est également favorisée par le remodelage du cytosquelette d'actine à la suite de dérégulation des petites GTPases Rho, RAC1 et CDC42. Des mutations somatiques de *RAC1* ont notamment été identifiée dans les cellules de mélanome et favorisent leur motilité (Hodis et al., 2012; Krauthammer et al., 2012).

L'invasion par les cellules de mélanomes implique également la dégradation de la matrice extracellulaire. Pour cela, plusieurs métalloprotéases matricielles (MMP), incluant les MMP1, 2, 9 et 13, sont sécrétées par les cellules et permettent la dégradation de la membrane basale et l'invasion du derme (Hofmann et al., 2000).

2.3.4. Métastases

Les cellules de mélanomes ayant acquis des capacités de survie, de migration et d'invasion par les mécanismes décrits précédemment quittent alors la tumeur primaire et rejoignent ensuite la circulation lymphatique et sanguine afin de se disséminer et former des métastases. La dissémination des cellules de mélanome dépend particulièrement de l'abondance des vaisseaux lymphatiques (Dadras et al., 2005). Celle-ci est notamment influencée par la production de facteurs VEGF-C et D (Vascular Endothelial Growth Factor) par les tumeurs, qui se lient aux récepteurs VEGFR-3 à la surface des cellules endothéliales et favorisent la lymphangiogenèse (Harrell et al., 2007; Skobe et al., 2001).

Les cellules de mélanome ont tendance à former tout d'abord des métastases dans les nœuds lymphatiques (42 à 74% des cas) puis se disséminent dans des organes distants tels que le foie (54 à 77%), les poumons (70 à 87%), les os (23 à 49%) et le cerveau (36 à 54%) (de la Monte et al., 1983). La distribution des métastases dans les différents sites secondaires semble être notamment influencée par l'expression de récepteurs aux cytokines à la surface des cellules de mélanome. Par exemple, les récepteurs CXCR4 et CCR7 sont préférentiellement associés à la présence respective de métastases pulmonaires (Murakami et al., 2002) et lymphatiques (Wiley et al., 2001).

La présence de métastases et leur localisation influencent grandement les chances de survie des patients. En effet, en absence de traitement, le taux de survie à 1 an est estimé à 36% en présence d'un seul site métastatique, 13% pour deux sites et moins d'1% pour 3 sites et plus. De même, le taux de survie à 1 an est de 40% pour les sites non viscéraux (peau, nœuds lymphatiques) contre seulement 11% en cas de métastases viscérales (Balch et al., 1983).

2.4. Traitements du mélanome

A un stade précoce, le mélanome localisé et non invasif peut être traité par exérèse chirurgicale avec un taux de survie de 90 à 100%. Néanmoins, à des stades plus avancés et en présence de métastases, la chirurgie n'est plus une option thérapeutique et des traitements systémiques doivent alors être mis en place.

Les chimiothérapies conventionnelles, basées sur l'utilisation d'agents alkylants tels que la dacarbazine ou le temozolomide qui agissent par effet cytotoxique en bloquant la réplication cellulaire, se sont révélées peu efficaces pour le traitement des mélanomes avec un taux de réponse avoisinant les 10% sans amélioration de la survie globale (Legha, 1989; Lui et al., 2007; Tsao et al., 2004).

Une avancée considérable dans la prise en charge des patients atteints de mélanome a été réalisée avec le développement de thérapies ciblées telles que les inhibiteurs de BRAF et MEK et l'immunothérapie (Figure 16).

2.4.1. Thérapies ciblées

Comme évoqué précédemment, BRAF est la kinase la plus fréquemment mutée dans les mélanomes, ce qui en fait donc une cible de choix pour le développement de thérapies ciblées. En 2011, le vemurafenib (Roche-Plexxikon) a été le premier inhibiteur sélectif du mutant $BRAF^{V600}$ approuvé pour le traitement des mélanomes. Il agit par compétition avec le site de liaison à l'ATP du domaine kinase et a montré un taux de réponse de 48%, une survie sans progression médiane de 5,3 mois et une diminution du risque de décès de 63% par rapport à la dacarbazine. Parallèlement, le dabrafenib (GSK), un autre inhibiteur de $BRAF^{V600}$ aux propriétés similaires à celles du vemurafenib, présente toutefois une efficacité supérieure pour le traitement des métastases cérébrales (Shah and Dronca, 2014). Cependant, une résistance à ces inhibiteurs de BRAF survient rapidement chez l'ensemble des patients après le traitement et est majoritairement causée par une réactivation de la voie MAPK (Sullivan and Flaherty, 2013). Pour pallier cela, des inhibiteurs des kinases MEK1/2, en aval de BRAF dans la voie MAPK, tels que le trametinib ont été mis au point. Le trametinib, en association avec le dabrafenib, a notamment permis un meilleur effet à long terme et une nette augmentation de la survie des patients avec un taux de survie globale de 71 % à 5 ans (Flaherty et al., 2012; Long et al., 2018; Robert et al., 2019).

Bien que ces traitements aient considérablement amélioré la survie des patients, ils présentent toutefois des effets secondaires fréquents (plus de 30% des cas) incluant une fatigue, une arthralgie ainsi qu'une toxicité cutanée se traduisant par des éruptions cutanées et une photosensibilité. Plus rarement, des carcinomes épidermoïdes, associés le plus souvent à des mutations de RAS, apparaissent chez environ 20% des patients traités au Vemurafenib et 10% des patients traités au Dabrafenib (Welsh and Corrie, 2015).

2.4.2. Immunothérapies

Un des mécanismes mis en place par la tumeur pour permettre son développement est l'échappement au système immunitaire, notamment en inhibant l'activation des lymphocytes T. En effet, ces derniers possèdent à leur surface des molécules inhibitrices des points de contrôle immunitaires tels que les récepteurs CTLA-4 et PD1. Les ligands de ces récepteurs, respectivement B7 et PDL1-2, sont présents à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et leur liaison inhibe l'activation des lymphocytes T afin de moduler la réponse immunitaire. La surexpression de ces ligands par les cellules cancéreuses leur permet donc de mimer ce mécanisme physiologique et de favoriser une immunotolérance.

Afin de réactiver la réponse immunitaire anti-tumorale, des inhibiteurs de CTLA-4 et de PD1 ont été développés pour le traitement des mélanomes. Ces thérapies peuvent être proposées en première intention mais son préférentiellement utilisées chez les patients atteints de mélanomes non mutés pour BRAF, non résécables ou métastatiques à des stades avancés. L'utilisation de l'ipilimumab, un anticorps monoclonal anti-CTLA4, a montré un taux de réponse de 10% et une survie globale médiane de 10 mois (Hodi et al., 2010). Un suivi sur le long terme a notamment montré que 26% des patients répondant à l'ipilimumab survivent plus de 5 ans (Larkin et al., 2019). De même, un anticorps monoclonal anti-PD1, le nivolumab, a également montré une amélioration de la survie des patients avec un taux de réponse de 31% et une durée médiane de survie de 2 ans (Topalian et al., 2014). De plus, la combinaison de l'ipilimumab et du nivolumab augmente le taux de réponse à 53% et 58% de survie à 3 ans (Wolchok et al., 2013, 2017).

Ces traitements présentent toutefois une toxicité considérable, plus fréquente pour l'ipilimumab que le nivolumab, liée à une activation excessive et non spécifique du système immunitaire. Ceci conduit à des inflammations plus ou moins sévères de divers organes qui peuvent provoquer des éruptions et des prurits cutanés (15-30%), des colites (1-15%), des hépatites (3 – 25%), des pneumonites (< 5%) ou encore des encéphalites (< 5%) (Martins et al., 2019).

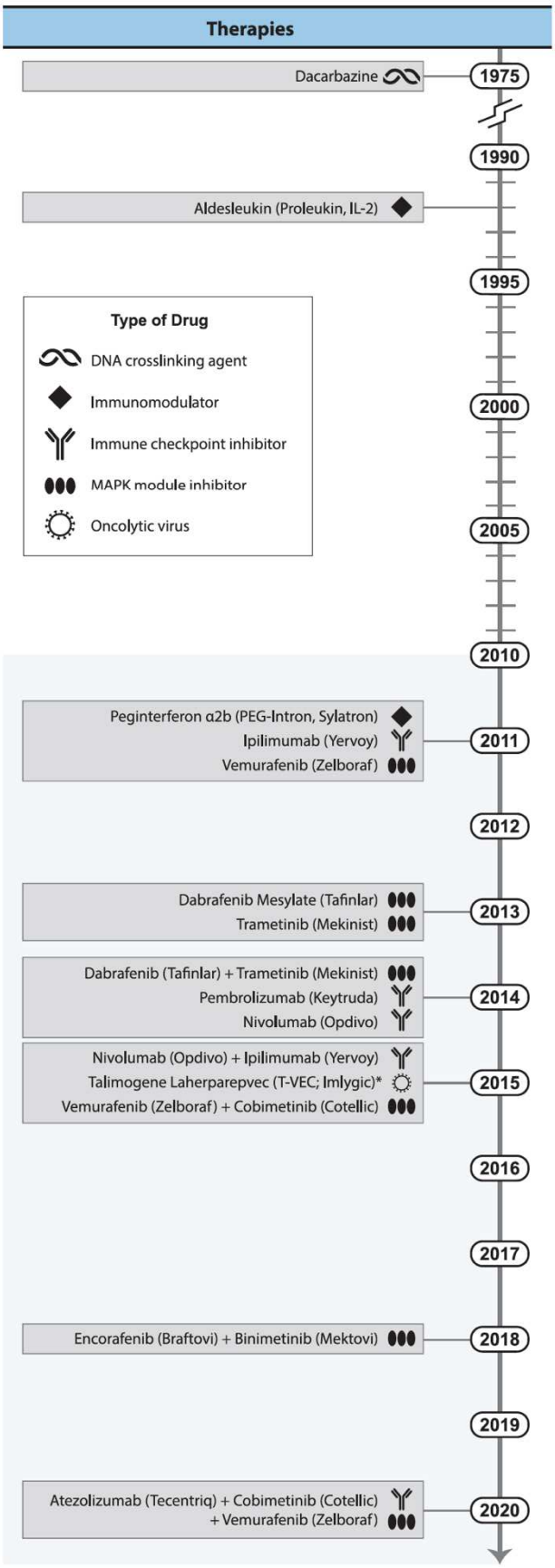


Figure 16 : Chronologie des approbations de traitements par la Food and Drug Administration américaine pour les patients atteints de mélanome avancé
Issu de Patton et al., 2021

2.5. Mécanismes de résistance aux thérapies

Malgré des réponses des patients sans précédent, une des limitations à l'efficacité des thérapies ciblées dans le traitement des mélanomes est l'apparition rapide de résistances. Plusieurs mécanismes dit « génétiques » ont été décrits et conduisent notamment à la réactivation de la voie MAPK, ce qui constitue un des mécanismes principaux de résistance aux inhibiteurs de BRAF. Elle peut être induite par une amplification du gène *BRAF* (Corcoran et al., 2010), l'apparition de variants résistants de BRAF par épissage alternatif (Poulikakos et al., 2011; Vido et al., 2018), des mutations dans les gènes codant MEK1/2 (Emery et al., 2009; Wagle et al., 2011) ou encore la surexpression de la MAPK COT qui active ERK indépendamment de MEK (Johannessen et al., 2010). Une activation aberrante de la voie PI3K/AKT, causée par la surexpression de certains récepteurs tyrosine kinase (Nazarian et al., 2010; Villanueva et al., 2010) ou des mutations activatrices dans différents acteurs de la voie (Shi et al., 2014), sont également fréquemment observées et permettent de contourner la voie MAPK.

Néanmoins, environ 40% des tumeurs résistantes aux inhibiteurs de BRAF et MEK ne présentent pas d'altération génétique suggérant qu'il existe d'autres mécanismes de résistance non génétique qui seront détaillés dans les sections suivantes.

2.5.1. Hétérogénéité et plasticité tumorale

La difficulté à éradiquer les mélanomes s'explique également par le caractère hétérogène de ces tumeurs. En effet, cette caractéristique a tout d'abord été mise en évidence par l'identification de deux types de populations cellulaires exprimant différents niveaux de *MITF*. Les cellules exprimant fortement *MITF* (MITFhigh) ont été décrites comme prolifératives tandis que les celles exprimant peu *MITF* (MITFlow) ont été associées à des propriétés invasives (Hoek et al., 2006). Il a également été mis en évidence que les cellules de mélanome, en raison de leur importante plasticité, peuvent passer d'un état à un autre, un évènement nommé « phenotype-switching » (Hoek et al., 2008). De plus, différentes études ont montré que les cellules $MITF^{low}$ sont capables d'initier la formation de tumeur (Cheli et al., 2011) et sont résistantes aux inhibiteurs de la voie MAPK et aux immunothérapies (Hugo et al., 2015; Kemper et al., 2014; Roesch et al., 2010; Shaffer et al., 2017; Verfaillie et al., 2015).

Plus récemment, des analyses du transcriptome à l'échelle de la cellule unique à partir de lignées cellulaires, de tumeurs de patients et de xénogreffes dérivées de tumeurs de patients, ont permis une caractérisation plus précise de l'hétérogénéité des mélanomes par l'identification de 4 profils de cellules de mélanome coexistant au sein des tumeurs (Rambow et al., 2018; Tsoi et al., 2018). Les deux premiers sont caractérisés par une expression de *MITF* : élevée et associée à l'expression de gènes de la pigmentation pour le type « pigmenté » et modérée et associée à une signature proliférative pour le type « prolifératif ». Deux autres populations exprimant de faibles niveaux de *MITF* ont été décrites : le type « neural crest stem cell » caractérisé par l'expression de marqueurs de la crête neurale dont SOX10, et le type « invasif » associé à l'expression de gènes impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire et dans la motilité.

De façon intéressante, il a été mis en évidence que l'exposition aux inhibiteurs de MAPK favorise l'émergence des cellules « pigmentées » et l'enrichissement en cellules « neural crest stem cells » et « invasives ». Ces trois profils cellulaires ont été associés à des résistances aux thérapies et pourraient ainsi favoriser la résurgence des tumeurs après traitement (Hugo et al., 2015; Müller et al., 2014; Rambow et al., 2018; Shaffer et al., 2017; Verfaillie et al., 2015).

Par ailleurs, Rambow *et al*., ont également décrit un cinquième profil, caractérisé par l'expression de gènes induits en condition de privation en nutriment, appelé « starved melanoma cell ». Ces cellules pourraient jouer un rôle de précurseur pour la formation des cellules « pigmentées », « neural crest stem cell » et « invasives », ce qui suggère un lien entre le métabolisme tumoral et l'apparition de cellules résistantes aux thérapies (Rambow et al., 2018).

2.5.2. Flexibilité métabolique

Le développement tumoral s'accompagne de nombreux changements métaboliques afin de soutenir la croissance, la prolifération continues et l'adaptation au manque de nutriments et d'oxygène des cellules (Hanahan and Weinberg, 2011).

2.5.2.1. Métabolisme du glucose

Ces modifications du métabolisme énergétique impliquent le passage de la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) à la glycolyse aérobie cytoplasmique, décrit sous le terme d'effet Warburg (Warburg, 1956) (Figure 17). Cette propriété est notamment utilisée en clinique, grâce la tomographie par émission de positons (TEP) utilisant le 18F-fluorodéoxyglucose (18F-FDG), un analogue du glucose radioactif, afin de visualiser la captation du glucose, et ainsi d'identifier les tumeurs en raison de leur métabolisme glycolytique accru par rapport à la plupart des tissus sains (Zhu et al., 2011). Bien que ce passage à la glycolyse aérobie entraîne classiquement une utilisation moins efficace du glucose, elle permet une production d'ATP plus rapide, représente une source d'intermédiaires métaboliques pour répondre à la demande accrue en biomacromolécules par les tumeurs et favorise également la production de NADPH et de glutathion aux effets antioxydants (Lunt and Vander Heiden, 2011). La glutamine peut également être utilisée comme source alternative de carbone pour le cycle de Krebs afin de favoriser la synthèse des acides gras et nucléiques (Hensley et al., 2013).

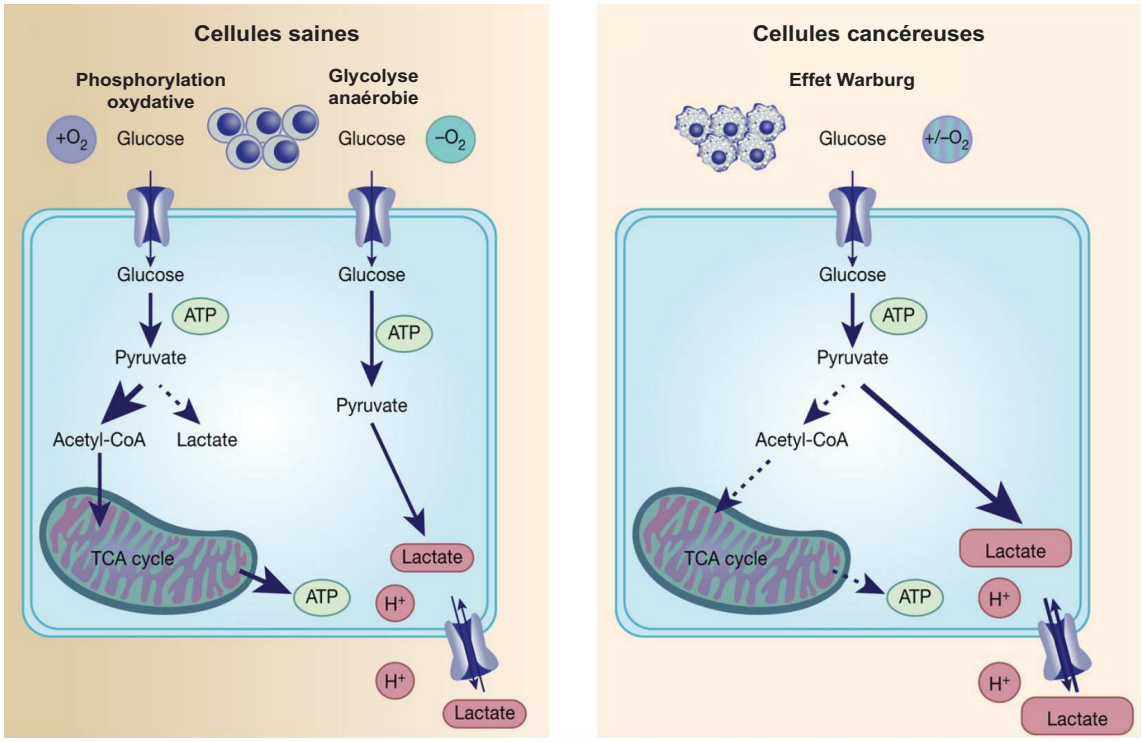


Figure 17 : Effet Warburg

Les tissus sains métabolisent le glucose en fonction des niveaux d'oxygène. Les conditions normoxiques favorisent le métabolisme complet du glucose dans les mitochondries (phosphorylation oxydative). Dans des conditions de faible teneur en oxygène, la majorité du glucose est métabolisée en lactate (glycolyse anaérobie). En revanche, les cellules cancéreuses métabolisent principalement le glucose en lactate indépendamment des niveaux d'oxygène intracellulaire (effet Warburg). Adapté de Unterlass and Curtin, 2019.

Dans les mélanomes, l'effet Warburg est notamment médié par l'activation constitutive de la voie MAPK (Figure 18). En effet, la mutation $BRAF^{V600E}$ induit l'expression du facteur lié à l'hypoxie, HIF1α, qui régule l'expression de plusieurs enzymes et transporteurs associés à la glycolyse (Kumar et al., 2007). HIF1α régule également l'expression du gène codant pour la Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1 (PDK1, (Kim et al., 2006)). PDK1 est responsable de la phosphorylation inhibitrice de la pyruvate deshydrogénase (PDH), un complexe mitochondrial faisant le lien entre la glycolyse et le cycle de Krebs en convertissant le pyruvate en acétyl-coenzyme A (Ac-CoA) (Holness and Sugden, 2003). Ainsi, l'induction de HIF1α conduit à une diminution de la respiration mitochondriale et de l'OXPHOS. Le proto-oncogène Myc est également induit par l'activation de la voie MAPK et participe à la glycolyse en favorisant l'expression du transporteur de glucose 1 (GLUT1) et de la lactate déshydrogénase (LDH) responsable de la conversion du pyruvate en lactate. L'expression de ces trois acteurs de la glycolyse, HIF1α, PDK1 et GLUT1, est aussi régulée par la voie PI3K/AKT, activée de façon aberrante dans les mélanomes (Barthel et al., 1999; Chae et al., 2016; Land and Tee, 2007).

La répression de l'OXPHOS est également médiée par la diminution de l'expression de MITF et conséquemment de son gène cible *PCG1A* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) qui participe à la biogénèse mitochondriale et à la régulation de la phosphorylation oxydative (Haq et al., 2013). Il a également été mis en évidence que l'enzyme nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) régulée par la voie MAPK et responsable de la maintenance du niveau intracellulaire d'un cofacteur clé de la glycolyse, le nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+), réprime l'expression de *MITF* dans les cellules de mélanome (Ohanna et al., 2018).

Par ailleurs, l'augmentation de la production de lactate associée à cette reprogrammation métabolique impacte de façon considérable le microenvironnement tumoral et notamment les cellules immunitaires. En effet, le lactate supprime les réponses pro-inflammatoires et conduit à l'apparition de macrophages de phénotype M2, connus pour favoriser le développement tumoral (Colegio et al., 2014). De plus, l'activation des lymphocytes T est inhibée en raison de la compétition pour le glucose provoquée par l'augmentation de la glycolyse des cellules tumorales (Cham et al., 2008) mais également par des défauts de maturation des cellules dendritiques provoqués par la sécrétion de lactate (Nasi et al., 2013). Cette reprogrammation métabolique des cellules de mélanome permet donc la formation d'un microenvironnement immunotolérant.

Bien que l'inhibition de la voie MAPK par les thérapies ciblées conduise à une diminution de la glycolyse, les cellules de mélanome développent une résistance en réactivant la phosphorylation oxydative afin de maintenir leur métabolisme énergétique malgré le traitement, notamment au travers de la réactivation de l'axe MITF-PGC1α (Corazao-Rozas et al., 2013; Haq et al., 2013; Parmenter et al., 2014). Cette reprogrammation métabolique s'accompagne également d'une augmentation de l'utilisation de la glutamine comme source alternative au glucose (Baenke et al., 2016). De plus, le métabolisme oxydatif des cellules de mélanome a été récemment associé à leur résistance aux inhibiteurs de checkpoint immunitaire anti-PD1 (Najjar et al., 2019). L'utilisation de molécules inhibant la phosphorylation oxydative, en combinaison avec les inhibiteurs de BRAF, a ainsi été décrite comme une piste prometteuse pour surmonter les résistances (Aida et al., 2017; Brummer et al., 2019; Vashisht Gopal et al., 2019).

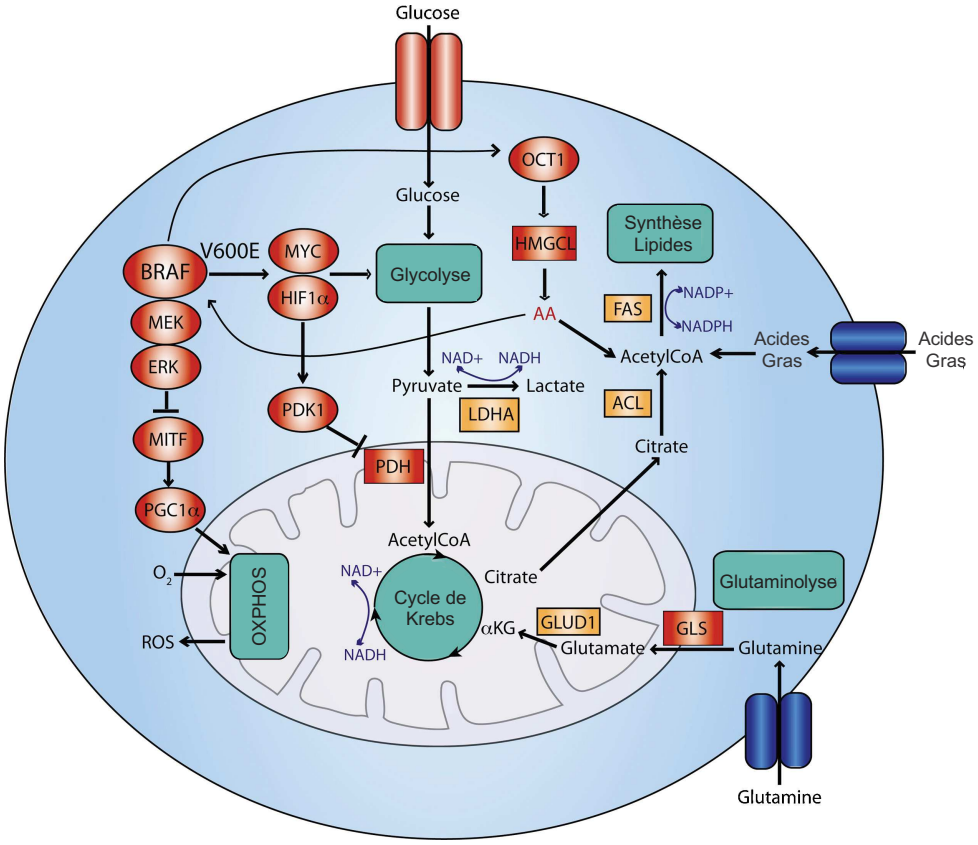


Figure 18 : Reprogrammation métabolique causée par la mutation BRAF^{V600E}

Les voies de signalisation métaboliques impactées par la mutation BRAF^{V600E} dans les cellules de mélanomes sont indiquées en rouge. Adapté de Smith et al., 2016.

2.5.2.2. Métabolisme des lipides

Au-delà du métabolisme du glucose, le métabolisme des lipides est également fréquemment modifié dans les cellules cancéreuses. Dans les mélanomes, une augmentation de l'expression du transporteur des acides gras, CD36, a été observée après traitement avec des inhibiteurs de BRAF et MEK (Aloia et al., 2019; Rambow et al., 2018), suggérant une implication du métabolisme des acides gras dans la biologie des tumeurs et leur résistance aux thérapies.

Les mélanomes présentent, en effet, une activation aberrante de la voie de synthèse des lipides, permettant notamment la synthèse de phospholipides essentiels à la constitution des membranes et favorisant la prolifération cellulaire. Cette voie de synthèse est régulée par le facteur SREBP1 (Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1) qui contrôle l'expression de différentes enzymes impliquées dans la synthèse d'acides gras, incluant l'ATP citrate lyase (ACLY), l'acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1), la fatty acid synthase (FASN) et la stearoyl-CoA desaturase (SCD) (Currie et al., 2013). Tandis que l'expression de SREBP1 est inhibée par le vemurafenib dans les cellules de mélanome BRAF mutées sensibles, celle-ci est maintenue dans les cellules résistantes, protégeant ainsi de l'oxydation lipidique médiée par les ROS en réponse au traitement (Talebi et al., 2018). L'inhibition de SREBP1 sensibilise les cellules de mélanomes résistantes au vemurafenib et réduit considérablement la croissance tumorale des xénogreffes de mélanome in vivo (Talebi et al., 2018).

Par ailleurs, une augmentation de l'oxydation des lipides est corrélée à une diminution de la survie chez les patients mutés *BRAF* (Shen et al., 2020) Il a récemment été mis en évidence que les cellules de mélanome persistantes, après traitement aux inhibiteurs de BRAF et MEK, présentent également une augmentation de l'oxydation des lipides, notamment médiée par l'enzyme ACOX1 (Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1). Sa surexpression est associée à une faible réponse aux thérapies ciblées. Au contraire, son inhibition sensibilise aux inhibiteurs de BRAF et MEK. De même, la combinaison d'un inhibiteur de l'oxydation des lipides (thiorizadine) et des inhibiteurs de BRAF/MEK conduit à la mort des cellules résistante et à une réponse antitumorale durable (Shen et al., 2020).

Enfin, le métabolisme des sphingolipides est également altéré dans les mélanomes. Les sphingolipides sont des lipides de structure, composant les radeaux lipidiques membranaires mais jouent également un rôle de signalisation intracellulaire et régulent la croissance, la prolifération, la migration ou encore l'invasion.

Dans les cellules cancéreuses, certains sphingolipides ont montré des effets opposés sur le devenir des cellules. Plus particulièrement, une augmentation des céramides en réponse aux chimiothérapies ou au stress oxydant induit la mort cellulaire, la senescence ou l'arrêt du cycle. Au contraire, la production de sphingosine-1-phosphate (S1P) par les sphingosine kinases (SK) inhibe l'apoptose et favorise la survie et la prolifération (Ogretmen and Hannun, 2004). Dans les mélanomes, une dérégulation de l'expression et de l'activité de plusieurs enzymes du métabolisme des sphingolipides limite l'accumulation des céramides et promeut la production de sphingosine et de SP1 (Garandeau et al., 2015). Notamment, une forte expression de la céramidase acide ASAH1, qui génère de la sphingosine à partir des céramides, a été observée dans les cellules de mélanome prolifératives. Au contraire, l'expression d'ASAH1 est réduite dans les cellules invasives et est associée à une augmentation de la motilité cellulaire. De façon intéressante, *ASAH1* a été identifiée comme une cible transcriptionnelle directe de MITF, mettant en évidence pour la première fois un rôle de MITF dans la régulation du métabolisme des sphingolipides (Leclerc et al., 2019).

Par ailleurs, des changements de niveaux sériques des sphingolipides ont été décrits chez les patients atteints de mélanome en fonction de leur réponse aux thérapies ciblées. Plus particulièrement, des niveaux plus faibles de céramides ont été observés chez les patients non-répondants aux inhibiteurs de BRAF en comparaison avec les patients répondants (Garandeau et al., 2019). De plus, il a été montré qu'une forte expression des récepteurs à la S1P, S1PR1 et S1PR3, corrèle avec la résistance des lignées cellulaires de mélanomes aux inhibiteurs de BRAF (Garandeau et al., 2019). De même, une forte expression de SK1 est associée à une réduction de la survie des patients atteints de mélanomes traités avec des anti-PD1 et à l'expression d'une signature immunosuppressive dans les tumeurs (Imbert et al., 2020). Ces travaux ont également mis en évidence que l'inhibition de la voie de synthèse de S1P induit l'apoptose des cellules de mélanome résistantes (Garandeau et al., 2019), diminue la croissance tumorale in vivo (Garandeau et al., 2019; Imbert et al., 2020) et améliore la réponse aux inhibiteurs de point de contrôle en limitant l'infiltration de lymphocytes T régulateurs au profit de lymphocytes T cytotoxiques (Imbert et al., 2020).

Ainsi, ces études décrivent un rôle essentiel de l'adaptation du métabolisme lipidique dans la résistance des cellules de mélanomes et identifient de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour améliorer les réponses aux traitements (Figure 19).

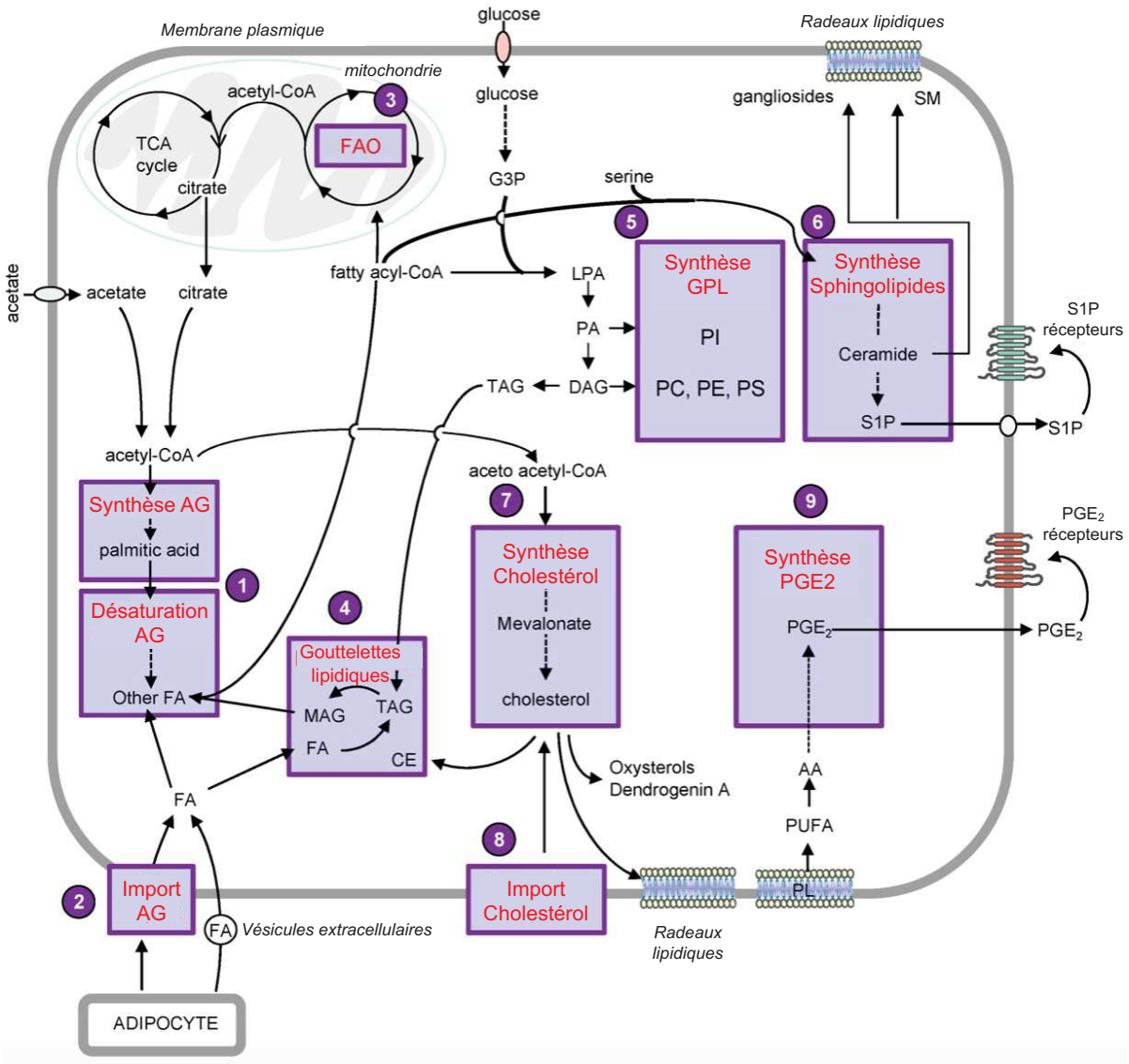


Figure 19 : Altération du métabolisme lipidique dans les cellules de mélanome

Les voies lipidiques modifiées dans les mélanomes sont représentées : (1) synthèse et désaturation des acides-gras (AG), (2) import d'AG, (3) oxydation des lipides, (4) gouttelettes lipidiques, (5) synthèse des glycérophospholipides (GPL), (6) synthèse des sphingolipides, (7) synthèse et (8) import du cholestérol, (9) synthèse des prostaglandines E2 (PGE2). D'après Pellerin et al., 2020.

2.5.3. Reprogrammation de la traduction

De plus en plus d'études suggèrent qu'une reprogrammation de la traduction, en réponse à différents signaux de stress, incluant l'activation d'oncogènes, le stress du réticulum endoplasmique, ou encore des stress du microenvironnement tels que la privation en nutriments ou l'exposition aux traitements, favorise la progression des mélanomes et leur résistance aux thérapies. Cette reprogrammation de la traduction est notamment médiée par l'induction d'une réponse intégrée au stress (ISR) et par le complexe Elongator.

2.5.3.1. Réponse intégrée au stress

L'initiation de la traduction est considérée comme l'étape limitante de la synthèse protéique. Elle nécessite la formation du complexe eIF4F (Eukaryotic Initiation Factor 4F) composé de la protéine de liaison à la coiffe eIF4E, de la protéine d'échafaudage eIF4G et de l'ARN hélicase eIF4A. Ce complexe se lie à la coiffe à 7 méthylguanosine située à l'extrémité 5′ des ARNm. Un complexe de pré-initiation, composé de la sous-unité ribosomique 40S, des facteurs eIF3, eIF1, eIF1A et eIF5 ainsi que du complexe ternaire comprenant eIF2 lié au GTP et l'ARN de transfert (ARNt) méthionine initiateur (ARNtiMet), est également formé et se fixe au complexe eIF4F pour former le complexe d'initiation 48S. Ce dernier balaye alors la région 5' non traduite de l'ARNm et est rejoint par la sous-unité ribosomique 60S lors de la reconnaissance du codon d'initiation AUG pour initier la traduction (Jackson et al., 2010) (Figure 20).

En réponse à différents signaux de stress, l'activation d'une réponse intégrée au stress (ISR) conduit à la phosphorylation de la sous-unité alpha du facteur eIF2 (eIF2α) sur le résidu Ser51. Cette phosphorylation fait notamment intervenir les kinases PERK (Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase) et GCN2 (General Control Nonderepressible 2) activées respectivement par le stress du réticulum endoplasmique (RE) à la suite d'une accumulation de protéines mal repliées et la privation en nutriments. Cela inhibe alors la réaction d'échange du GDP contre le GTP sur le complexe eIF2, catalysée par le facteur eIF2B et empêche l'initiation de la traduction. La phosphorylation de eIF2α conduit ainsi à une reprogrammation traductionnelle qui se traduit par une réduction globale de la traduction associée à une traduction sélective de l'ARNm du facteur de transcription ATF4 (Activating Transcription Factor 4) régulant de nombreux gènes impliqués dans l'adaptation cellulaire aux conditions de stress (Pakos-Zebrucka et al., 2016) (Figure 21).

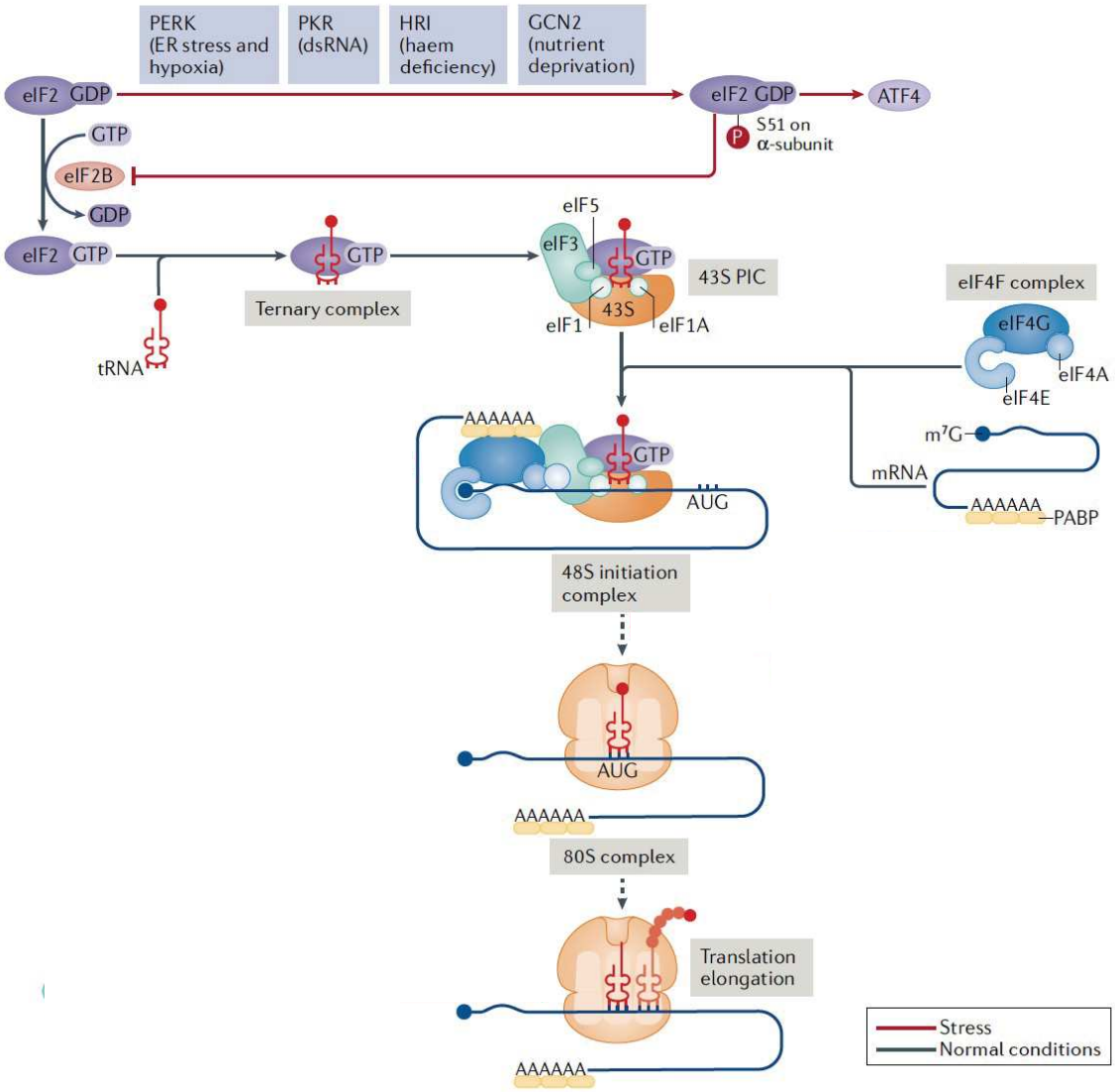


Figure 20 : Mécanisme d'inhibition de la traduction en réponse au stress

L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe (1) implique la formation d'un complexe de pré-initiation 43S (PIC), comprenant la sous-unité ribosomique 40S, le facteur d'initiation eucaryote 1 (eIF1), eIF1A, eIF3 et le complexe ternaire ; le complexe ternaire est constitué de eIF2 lié au GTP et de l'initiateur méthionyl tRNAi (tRNAiMet). En cas de stress, la phosphorylation de eIF2α inhibe la réaction d'échange du GDP contre le GTP sur le complexe eIF2, par le facteur eIF2B, et empêche l'initiation de la traduction. Tiré de Fabbri et al., 2021.

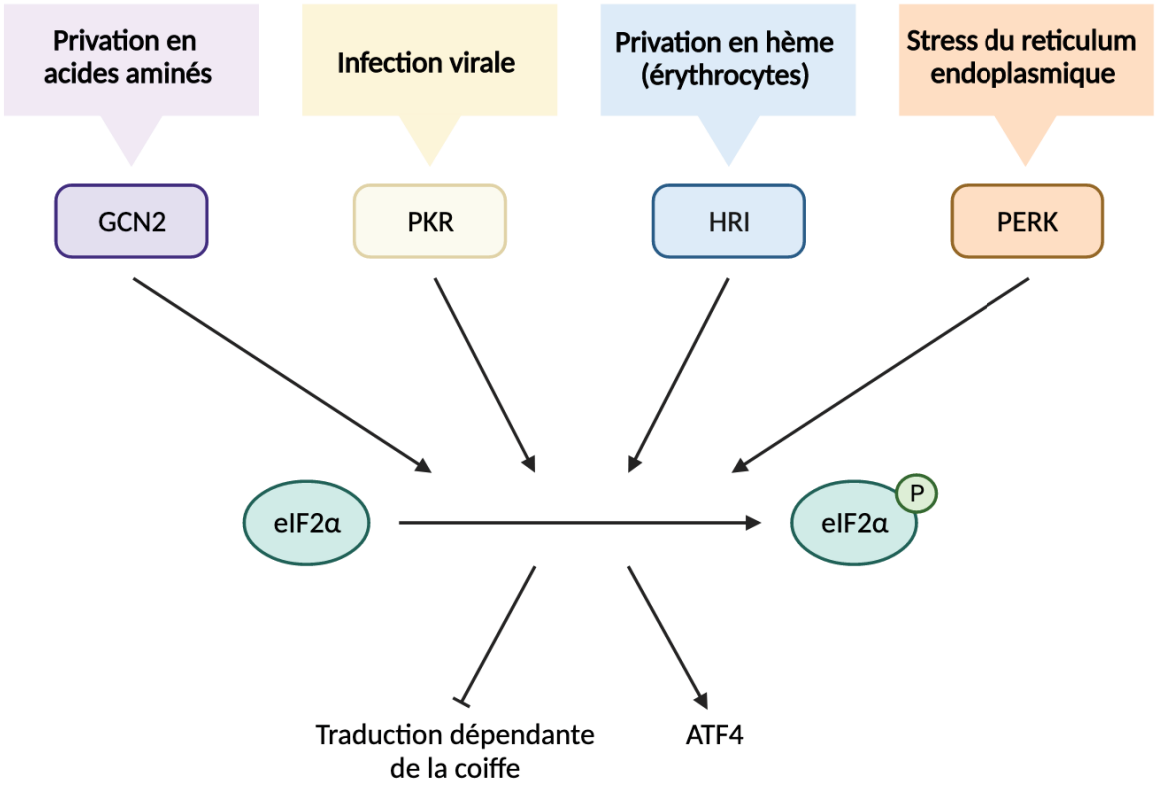


Figure 21 : Signalisation de la réponse intégrée au stress

La privation en acide aminé, les infections virales, la privation en hème et le stress du réticulum activent respectivement les kinases GCN2, PKR, HRI et PERK. Ces kinases phosphorylent eIF2α, ce qui conduit à une atténuation globale de la traduction dépendante de la coiffe tout en induisant l'expression d'ATF4. D'après Pakos-Zebrucka et al., 2016.

Dans le contexte des mélanomes, plusieurs études ont montré que la privation en nutriments conduit à une répression de la traduction par ce mécanisme, tout en favorisant l'apparition de résistances. En effet, il a été mis en évidence qu'une privation en glutamine provoque une reprogrammation traductionnelle médiée par eIF2α et réprime à la fois la transcription et la traduction de MITF, ce qui conduit à l'apparition d'un phénotype invasif associé à une résistance aux thérapies ciblées et à l'immunothérapie anti-PD1 (Falletta et al., 2017). Par la suite, cette même équipe a également montré que MITF régule la Stearoyl CoA desaturase-1 (SCD1) qui catalyse la transformation des acides gras saturés (Saturated Fatty Acid (SFA)) en acides gras monoinsaturés (Monounsaturated Fatty Acid (MUFA)). L'altération de cette balance SFA/MUFA causée par la diminution de MITF affecte la composition et les propriétés biophysiques des membranes cellulaires et induit alors un stress du RE qui se traduit par la phosphorylation de eIF2α. Cette cascade de signalisation forme donc une boucle d'amplification qui maintient la répression de *MITF*, ce qui favorise la dissémination métastatique (Vivas-García et al., 2020).

De même, Ferguson *et al*. ont observé qu'une privation en glucose induit l'expression d'ATF4 qui entre en compétition avec CREB pour le promoteur de *MITF* et réprime la transcription de ce dernier, favorisant également l'apparition d'un phénotype invasif et résistant aux thérapies (Ferguson et al., 2017). De plus, il a été décrit qu'une privation en asparagine conduit à l'induction d'ATF4, d'une part transcriptionnellement, par l'activation du récepteur GCN2 et la phosphorylation consécutive de eIF2α et d'autre part traductionnellement, par la répression du complexe eIF4F à la suite de l'activation de la voie MAPK. L'induction d'ATF4 par ces deux voies favorise la survie des cellules de mélanome (Pathria et al., 2019). Ce même mécanisme a été également décrit en réponse aux inhibiteurs de BRAF (Nagasawa et al., 2017, 2020).

Par ailleurs, la formation persistante du complexe eIF4F a été corrélée à la résistance des cellules de mélanome aux inhibiteurs de BRAF et MEK (Boussemart et al., 2014) et à l'expression de PD1 qui permet l'échappement au système immunitaire (Cerezo et al., 2018). De plus, il a été observé que les cellules persistantes après traitement au vemurafenib présentent une reprogrammation traductionnelle caractérisée par une diminution globale de la traduction et une augmentation de la traduction d'un sous-groupe d'ARNm associés aux modifications épigénétiques et aux réponses au stress (Shen et al., 2019). L'inhibition du complexe eIF4F permet de restaurer la sensibilité aux thérapies ciblées (Boussemart et al., 2014), la reconnaissance des cellules de mélanome par le système immunitaire (Cerezo et al., 2018) et de limiter l'apparition de cellules persistantes (Shen et al., 2019).

2.5.3.2. Complexe Elongator

Le complexe Elongator est composé de deux copies de chacune de ses 6 sous-unités, Elongator complex Protein 1 à 6 (ELP1-6), organisées en deux sous complexes : un complexe central comprenant ELP1-3 et un complexe accessoire formé de ELP4-6 (Kolaj-Robin and Séraphin, 2017). La sous-unité ELP3, correspondant à la sous-unité catalytique du complexe, comprend un domaine conservé d'acétylation (Histone acetyl-transferase, HAT) (Winkler et al., 2002) et un domaine de déméthylation (S-adenosylmethionine, SAM) (Okada et al., 2010). Le complexe Elongator peut réguler à la fois l'élongation de la transcription en acétylant les histones H3 et H4 dans le noyau, facilitant ainsi la transcription par l'ARN polymérase II (Kim et al., 2002) et la fidélité de la traduction en modifiant les ARN de transfert (ARNt) dans le cytoplasme.

En effet, l'ajout d'un groupement chimique 5-méthoxycarbonylméthyl (mcm^5U), 5-carbamoyl-méthyl-uridine (ncm^5U) ou 5-méthoxy-carbonyl-méthyl-2-thio-uridine (mcm^5s^2U) sur l'uridine présente en position 34 (U34) de l'anticodon des ARNt est nécessaire à la traduction de certains codons, tels que les codons UUU, UUC ou UUG, lors de l'élongation (Jackson et al., 2010). Ces modifications sont initiées par le complexe Elongator qui appose un groupe 5-carboxy-méthyl (cm^5) ensuite converti en mcm^5, ncm^5, ou mcm^5s^2 par une cascade enzymatique impliquant la méthyltransférase ALKBH8 (Alkylated DNA repair protein alkb homologue 8) et les thiolases CTU1/2 (Cytosolic Thiouridylase Subunit 1/2) (Huang et al., 2005; Lin et al., 2019; Rapino et al., 2017).

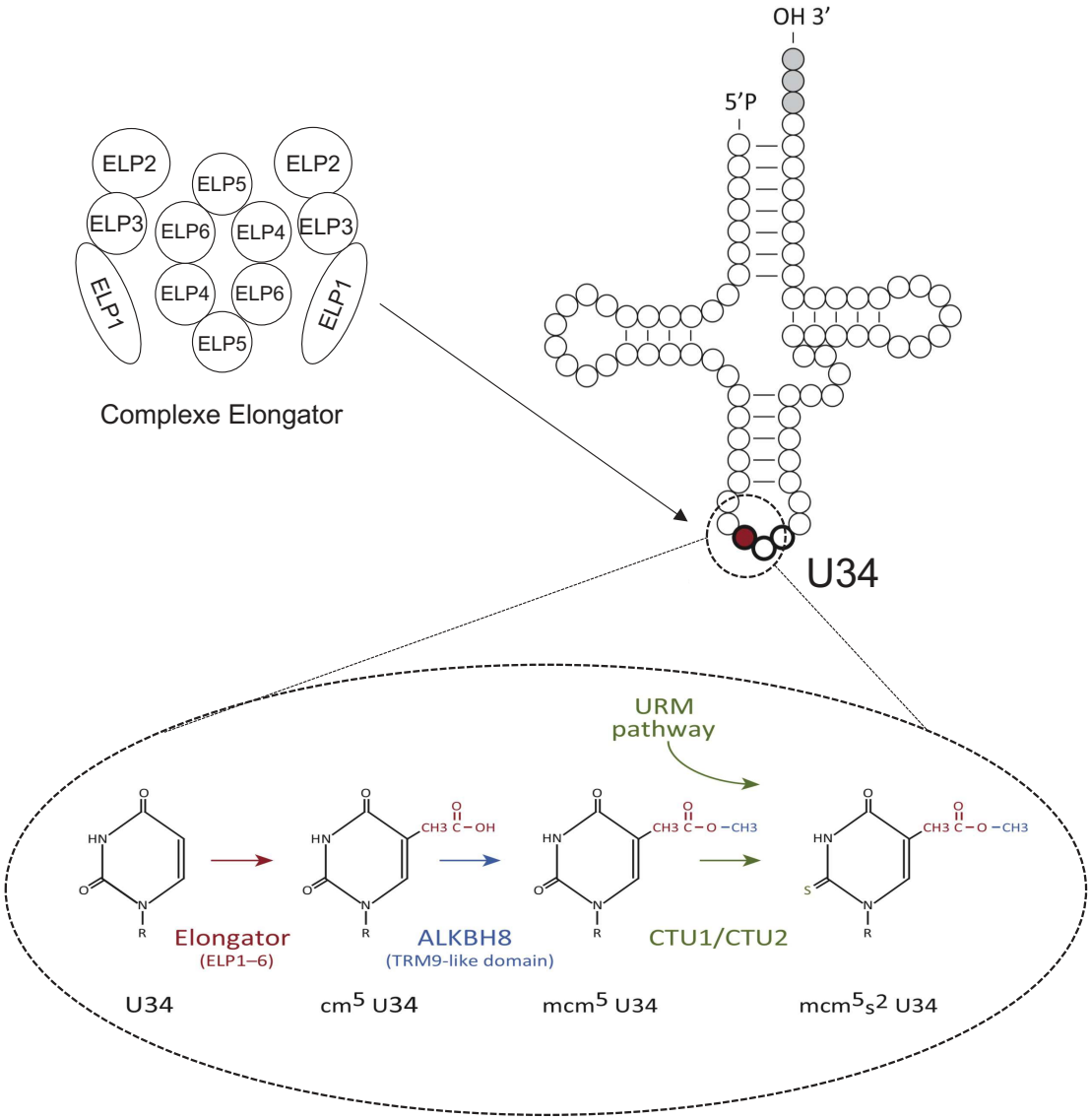


Figure 22 : Modification des ARN de transfert par le complexe Elongator

Le complexe Elongator appose un groupe 5-carboxy-méthyl (cm^5) sur l'uridine présente en position 34 (U34) de l'anticodon des ARNt, qui est ensuite convertie en mcm^5s^2 par une cascade enzymatique impliquant la méthyltransférase ALKBH8 et les thiolases CTU1/2. Adapté de Rapino et al., 2017.

Chez l'Homme, une activité altérée du complexe Elongator est associée à la dysautonomie familiale, une neuropathie touchant les neurones sensoriels et le système nerveux autonome, causée par une mutation dans un site d'épissage alternatif du gène codant ELP1 (Anderson et al., 2001). Certains variants d'ELP3 ont également été associés au développement d'une sclérose latérale amyotrophique, une maladie neurodégénérative impactant les neurones moteurs (Simpson et al., 2009). De plus, l'inactivation d'*Elp3* dans les neurones corticaux murins conduit à des défauts de neurogenèse et une microcéphalie, causés par l'induction d'une réponse aux protéines mal repliées (Laguesse et al., 2015).

Par ailleurs, il a également été mis en évidence que le complexe Elongator participe à la progression et à la résistance des mélanomes. En effet, le complexe Elongator a été décrit comme impliqué dans la migration, l'invasion et la tumorigénicité des cellules de mélanome (Close et al., 2012). Il a notamment été démontré que les mélanomes portant une mutation $BRAF^{V600E}$ présentent une expression accrue de ELP1, ELP3, CTU1 et CTU2 et que ces facteurs sont nécessaires à la traduction de HIF1α, une protéine riche en codons nécessitant des modifications de l'ARNt U34, ce qui favorise la glycolyse, l'invasivité et la résistance aux thérapies. De façon intéressante, la déplétion d'*ELP3* sensibilise de nouveau les cellules de mélanome au vemurafenib (Rapino et al., 2018).

Sur la base de l'ensemble de ces données, la reprogrammation de la traduction apparait comme un élément clé de la progression tumorale permettant à la fois une flexibilité phénotypique et métabolique des cellules de mélanome et leur résistance aux thérapies, ce qui en fait donc une cible intéressante pour le traitement des mélanomes. Mes travaux de thèse ont notamment permis d'identifier, dans les mélanocytes, un nouveau régulateur du complexe Elongator, la protéine multifonctionnelle E4F1 qui sera présentée dans le chapitre suivant.

2.6. Modèles murins d'étude du mélanome cutané

De nombreux modèles murins ont été développés pour permettre à la fois la compréhension de la physiopathologie des mélanomes, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, l'évaluation de l'efficacité, du mécanisme d'action et de la réponse aux thérapies ou encore la caractérisation des mécanismes de résistance. De nombreuses études reposent sur la xénogreffe de lignées cellulaires de mélanome chez la souris. Ce modèle, simple d'utilisation, permet d'évaluer la croissance tumorale et le développement de métastases. Néanmoins, les lignées cellulaires utilisées sont préalablement cultivées, in vitro, dans des conditions éloignées de celles de la tumeur d'origine.

Pour cette raison, ces modèles permettent moins souvent de prédire efficacement les résultats cliniques (Aktary et al., 2017). Afin d'obtenir un modèle plus représentatif de la tumeur initiale, des modèles de xénogreffes dérivées de patients (PDX) ont été développés. Dans ces modèles, un échantillon de tumeur de patient retirée chirurgicalement est implanté, de façon sous-cutanée, chez les animaux. Ces PDX permettent de préserver l'hétérogénéité tumorale et de prédire les réponses aux thérapies ciblées. Toutefois, une limite majeure de ces deux modèles de xénogreffe repose sur l'utilisation de souris immunodéficientes. Ils ne permettent donc pas d'étudier les effets des inhibiteurs de point de contrôle ni la contribution du système immunitaire à l'efficacité des thérapies ciblées (Patton et al., 2021).

Bien que la formation spontanée de mélanomes chez la souris soit rare, celle-ci peut aisément être induite dans des modèles génétiquement modifiés. Malgré un nombre de mutation plus limité que dans le cas des PDX, ces modèles immunocompétents rendent possible l'étude des réponses aux inhibiteurs de point de contrôle et présentent un développement tumoral spontané, plus proche de la physiopathologie normale d'un mélanome. Ces modèles reposent le plus souvent sur l'expression de gènes mutés connu pour induire la mélanomagenèse tels que les mutants de la voie MAPK : $Nras^{Q61K}$, $Hras^{G12V}$ ou encore $Braf^{V600E}$. La seule expression d'un de ces gènes peut ne pas suffire à induire un mélanome, ce qui nécessite alors l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur tels que le *Pten* ou le locus *Cdkn2a*. Des agents cancérigènes comme le 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) ou les rayonnements UV peuvent également être utilisés afin de favoriser le développement tumoral. Ces différentes modifications génétiques peuvent être restreintes spécifiquement au lignage mélanocytaire à l'aide de promoteurs particuliers tels que le promoteur *Tyr*. De même, l'expression ou l'inactivation de ces différents gènes d'intérêt peut également être conditionnelle grâce au système Cre/LoxP (Tyr::Cre) et inductible, comme sous l'effet 4-hydroxytamoxifène (Tyr::$CreER^{T2}$) (Aktary et al., 2017). Des exemples de modèles murins génétiquement modifiés et leur phénotype sont décrits dans le Tableau 2.

Mes travaux de thèse ont plus particulièrement reposé sur le développement de deux modèles murins génétiquement modifiés. Ces modèles combinent l'expression constitutive de $Nras^{Q61K}$ ou conditionnelle de $Braf^{V600E}$ dans les mélanocytes avec l'inactivation du locus *Cdkn2a* et l'expression du gène rapporteur $Rosa26^{mTmG}$. L'inactivation d'*E4f1* est également induite spécifiquement dans les mélanocytes à l'aide de la recombinase Tyr$CreER^{T2}$ afin d'étudier le rôle d'E4F1 dans le développement des mélanomes.

Tableau 2 : Exemple de modèles murins génétiquement modifiés de mélanome

Modèle murin		Phénotype
Tyr::HrasG12V	Surexpression d'une forme oncogénique de HRAS ($HRAS^{G12V}$) sous le contrôle du promoteur Tyr	• Ces souris présentent une hyperplasie mélanocytaire (nævus) et une hyperpigmentation mais ne développent pas de mélanome. • L'inactivation du locus *Cdkn2a* induit le développement d'un mélanome avec une pénétrance de 61% et une latence inférieure à 6 mois (Chin et al., 1997).
Tyr::NrasQ61K	Surexpression d'une forme oncogénique de NRAS ($NRAS^{Q61K}$) sous le contrôle du promoteur Tyr	• Ces souris présentent une hyperpigmentation associée à la présence de mélanocytes dans l'épiderme et le derme. Une faible proportion de ces animaux (29%) développe un mélanome après plus d'un an. • L'inactivation de $p16^{Ink4a}$ accélère le développement tumoral avec une pénétrance > 90% et une latence de 6 mois. Des métastases sont également retrouvées dans les poumons et le foie (36%) (Ackermann et al., 2005).
Tyr ::BrafV600E	Expression constitutive du mutant $BRAF^{V600E}$ sous le contrôle du promoteur Tyr	• Ces souris présentent une hyperpigmentation ainsi que des lésions bénignes sénescentes (nævi). 10% des animaux développent un mélanome sur le long terme avec présence de métastases pulmonaires (Goel et al., 2009).
LSL- BrafV600E	Expression conditionnelle du mutant $BRAF^{V600E}$ sous le contrôle de la recombinase $TyrCreER^{T2}$	• Ces souris présentent une hyperpigmentation ainsi que des nævi. • Des tumeurs dermiques hypopigmentées ont été décrites chez 54% des animaux 12 mois après recombinaison (Dhomen et al., 2009). • L'inactivation de $p16^{In4ka}$ accélère le développement de mélanome avec une pénétrance de 80% et une latence de 7 mois (Dhomen et al., 2009).
$Braf^{CA}$	Expression conditionnelle du mutant $BRAF^{V600E}$ sous le contrôle de la recombinase $TyrCreER^{T2}$	• Ces souris présentent une hyperpigmentation ainsi que des nævi mais ne développent pas de mélanome. • L'inactivation du locus *Cdkn2a* favorise la mélanomagenèse avec une pénétrance totale et la présence de métastases pulmonaires 21/10/2021 15:32:00. • L'inactivation de *Pten* induit le développement rapide de mélanome métastatique (nœuds lymphatiques, poumons) avec une pénétrance totale et une latence de 4-5 semaines (Dankort et al., 2009).

3. E4F1

3.1. Découverte

A la fin des années 80, de nombreuses études ont été menées afin d'identifier les mécanismes par lesquels les virus détournent la machinerie cellulaire pour transcrire et traduire leur propre génome. Ces études ont conduit à la découverte de nombreux facteurs impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire.

Les études visant à identifier les cibles de l'oncoprotéine E1A dans le cadre de l'infection par les adénovirus de type V a notamment conduit à la découverte des facteurs de transcription E2F et E4F. Ces facteurs régulent l'expression des gènes viraux *E2* et *E4* respectivement (Kovesdi et al., 1987; Lee and Green, 1987; Nevins et al., 1988). Les facteurs E2F constituent une famille de facteurs de transcription de 8 membres impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et interagissent notamment avec la protéine du rétinoblastome pRb. E4F quant à lui représente le seul membre de la famille E4F et est donc nommé E4F1. Bien que ces deux facteurs aient été identifiés à la même période, les fonctions d'E4F1 restent peu étudiées.

3.2. Structure

E4F1 est exprimée de façon ubiquitaire chez les vertébrés. Aucun orthologue n'a pour le moment été identifié chez les invertébrés. Les séquences humaines et murines présentent 86% d'homologie (Fernandes and Rooney, 1997) et sont localisées respectivement sur les régions 13.3 du chromosome 16 et 3.3 du chromosome 17 (Saccone et al., 1998). Le gène *E4F1* comporte 14 exons et code une protéine de 120 kDa. Les premières études ont initialement identifié deux formes d'E4F1 aux effets transcriptionnels opposés : une forme répressive de 120 kDa et une forme activatrice de 50 kDa. Cette dernière est formée par clivage de la forme longue après phosphorylation de celle-ci et est spécifiquement présente dans les cellules infectées par l'adénovirus de type V (Fernandes and Rooney, 1997).

La protéine E4F1 appartient à la famille Gli-Kruppel à doigts de zinc (Fognani et al., 1993). Elle est tout d'abord formée de 6 domaines à doigts de zinc. Deux d'entre eux, situés dans la partie N-terminale, sont impliqués dans la liaison à l'ADN et la régulation de l'expression de ses gènes cibles. Quatre autres, dans la région C-terminale, sont associés à un domaine basique hélice-boucle-hélice et sont responsables des interactions protéine-protéine (Fajas et al., 2000).

La protéine E4F1 comporte également un domaine E3 ligase en partie N-terminale (Le Cam et al., 2006). Ce domaine E3 ligase ne présente pas d'homologie de séquence avec les domaines E3 ligase connus tel que les domaines RING, HECT, ou U-box (Pickart and Eddins, 2004). Néanmoins, ce domaine présente une forte similarité avec deux régions IR1 et IR2 du domaine catalytique de la E3 sumo ligase RANBP2 (RAN Binding Protein 2, (Pichler et al., 2004; Tatham et al., 2005)), ce qui suggère qu'E4F1 peut agir comme E3 sumo ligase ou E3 ubiquitine ligase (Figure 23).

Les fonctions de facteur de transcription d'E4F1 ont premièrement été décrites pour la régulation du gène viral de l'adénovirus E4, grâce à sa liaison sur l'élément de réponse à l'AMPc (cAMP response element, CRE) au niveau du motif -ATGACGTCAAC- (Lee and Green, 1987; Raychaudhuri et al., 1987). La première cible d'E4F1 identifiée est le gène codant la Cycline A2, *CCN2A*, mettant ainsi en évidence un rôle d'E4F1 dans la régulation du cycle cellulaire (Fajas et al., 2001). Quelques années plus tard, une analyse à l'échelle du génome entier basée sur des techniques de combinaison d'immunoprécipitation de la chromatine et de séquençage (ChIP-seq) et de transcriptomique, sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) primaires et transformés ainsi que sur des cellules souches embryonnaires murines, a conduit à l'identification de la signature transcriptionnelle complète d'E4F1 (Lacroix et al., 2016; Rodier et al., 2015). Cette analyse a également permis de définir un nouveau motif de liaison consensus situé au niveau des sites de démarrage de la transcription (CTTTACGGC) (Rodier et al., 2015). Ce motif est notamment retrouvé dans la séquence d'E4F1, suggérant un mécanisme d'autorégulation. L'inactivation d'*E4f1* conduit à une diminution de l'expression de la plupart de ses cibles indiquant qu'E4F1 agit principalement comme un activateur transcriptionnel. Néanmoins, un petit nombre de gènes ont montré une expression accrue dans les cellules déficientes pour E4F1, démontrant qu'E4F1 peut également jouer le rôle de répresseur. L'analyse *Gene Ontology* de ces différents gènes cibles a mis en évidence qu'E4F1 régule des gènes impliqués majoritairement dans l'activité et l'homéostasie mitochondriale, les réponses aux dommages à l'ADN et les points de contrôle du cycle cellulaire (Rodier et al., 2015).

Comme évoqué précédemment, E4F1 présente également des fonctions E3 ligase. La protéine suppresseur de tumeur p53 a été la première protéine cellulaire identifiée comme étant ubiquitinée par E4F1. Bien que l'ubiquitination de p53 conduise habituellement à sa dégradation par le protéasome ou sa relocalisation subcellulaire, l'ubiquitination par E4F1 module son activité transcriptionnelle vis-à-vis de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Le Cam et al., 2006).

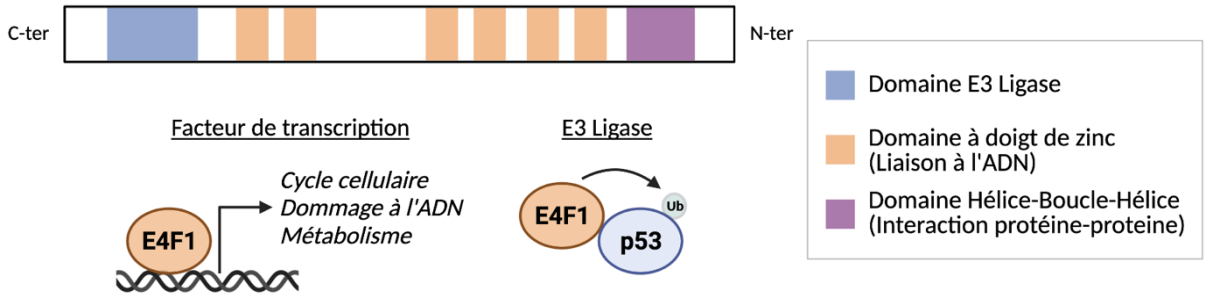


Figure 23 : Structure et fonctions d'E4F1

3.3. Fonctions

3.3.1. Régulation de la voie p53

Plusieurs études indiquent qu'E4F1 est un régulateur crucial de la voie BMI1-INK4A/ARF-p53 et interagit avec différents acteurs de cette voie (Figure 24).

p53

La protéine suppresseur de tumeur p53, également connue comme le gardien du génome, est un facteur de transcription dont l'activité a tout d'abord été décrite en réponse à divers signaux de stress aigus tels que les dommages à l'ADN, l'hypoxie, les stress oxydants ou oncogéniques, afin de contrôler le destin cellulaire régulant la prolifération, la sénescence, la réparation de l'ADN et la mort cellulaire. Plus récemment, de nouvelles données suggèrent également un rôle de p53 dans les réponses adaptatives plus fines impliquées notamment dans le contrôle du métabolisme cellulaire et ciblant la glycolyse, la phosphorylation oxydative ou encore le métabolisme lipidique.

La protéine p53 interagit avec la région C-terminale de E4F1. Cette interaction est nécessaire aux effets anti-prolifératifs d'E4F1 dans différentes lignées cellulaires humaines et murines (Sandy et al., 2000). Comme évoqué précédemment, cette interaction conduit également à l'ubiquitination de p53, ce qui régule sa liaison à la chromatine et l'expression de gènes cibles impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Le Cam et al., 2006). De plus, E4F1 interagit également avec p53, indépendamment de son activité E3 ligase, pour réguler le métabolisme des lipides et notamment SCD1 (Lacroix et al.).

INK4A/ARF

Le locus *CDKN2A*, comme mentionné dans le chapitre précédent, code deux protéines distinctes $p16^{INK4A}$ et $p14^{ARF}$ ($p19^{ARF}$ chez la souris) par épissage alternatif. Ces deux protéines régulent négativement la progression du cycle cellulaire en inhibant la phosphorylation de Rb et en stabilisant p53 (Serrano et al., 1993; Sherr and Weber, 2000).

Il a été mis en évidence que $p14^{ARF}$ séquestre E4F1 dans le nucléole et forme un complexe trimérique E4F1-p53- $p14^{ARF}$ induisant l'arrêt du cycle cellulaire en G2 des cellules d'ostéosarcome humain (Rizos et al., 2003).

BMI1

BMI1 appartient à la famille des protéines polycomb. Les protéines de cette famille agissent sous forme de complexes multimériques qui modifient post-traductionnellement certains résidus des queues d'histones afin de réprimer la transcription de gènes spécifiques impliqués entre autres dans le développement embryonnaire, l'hématopoïèse et la différenciation cellulaire. Elles forment deux complexes principaux, les Polycomb Repressive Complex 1 et 2 (PRC1 et PRC2, (Valk-Lingbeek et al., 2004)). Le complexe PRC1, qui comprend BMI1, est recruté à la chromatine à la suite de la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3) par le complexe PRC2 et réprime la transcription de ses cibles en mono-ubiquitinant la lysine 119 de l'histone H2A (Cao et al., 2005).

BIM1 réprime notamment le locus *CDKN2A* et impacte par ce biais le développement du système nerveux central et l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Ainsi, les souris *Bmi1* KO présentent une aplasie du système hématopoïétique dû à un défaut de renouvellement des cellules souches (Park et al., 2003). De même, in vitro, l'inactivation de BIM1 dans les HSC et les fibroblastes primaires conduit à une diminution de la prolifération et une entrée prématurée en sénescence causée par une augmentation de l'expression de $p16^{INK4A}$ et $p14^{ARF}$ (Bruggeman et al., 2005; Oguro et al., 2006).

Il a été démontré que E4F1 interagit physiquement avec BMI1 dans le cytoplasme des HSC (Chagraoui et al., 2006a) et participe à l'homéostasie de ces cellules.

La régulation de la voie BMI1-INK4A/ARF-p53 par E4F1 permet de moduler divers processus cellulaires tels que la prolifération ou encore le métabolisme et impacte ainsi le développement et l'homéostasie des tissus.

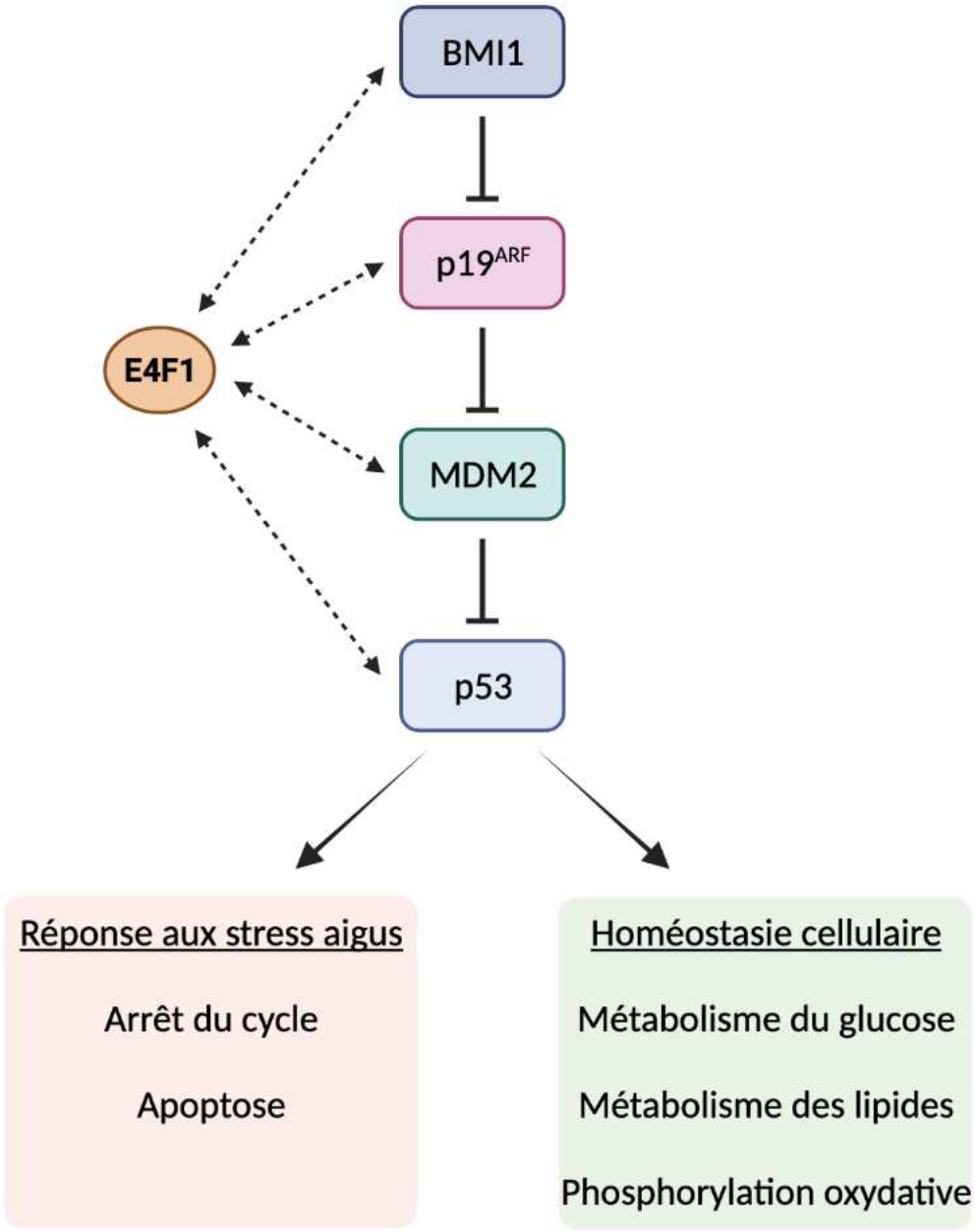


Figure 24 : Régulation de la voie p53 par E4F1

3.3.2. Régulation du cycle cellulaire

Dans le but d'identifier le rôle d'E4F1 dans la régulation du cycle cellulaire, différentes expériences de déplétion et de surexpression ont été réalisées et ont permis de mettre en évidence des fonctions d'E4F1 dans la prolifération, la régulation des points de contrôle, la réparation des dommages à l'ADN et la sénescence.

Prolifération

Il a tout d'abord été démontré qu'une surexpression d'*E4f1*, dans des fibroblastes murins NIH 3T3, provoque un arrêt du cycle cellulaire en G1/S, associé à une augmentation p21 et une réduction consécutive de l'activité de complexe cycline D - CDK4/6 (Fernandes et al., 1998). De plus, E4F1 est tout de même capable de bloquer la progression du cycle en absence de p21, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes. En effet, E4F1 lie le promoteur du gène CCNA codant la CYCLINE A au niveau de son domaine CRE et réprime son expression, ce qui conduit à un arrêt du cycle cellulaire. Cette liaison est notamment favorisée par l'interaction d'E4F1 avec pRb (Fajas et al., 2000, 2001) et l'effecteur de Ras, RASSF1A (Ahmed-Choudhury et al., 2005; Fenton et al., 2004). Au contraire, elle est inhibée par son interaction avec le facteur de transcription High Mobility Group A2 (HMGA2, (Tessari et al., 2003)).

Comme mentionné précédemment, l'arrêt du cycle cellulaire médié par E4F1 est dépendant de son interaction avec p53 (Sandy et al., 2000). De même, la formation d'un complexe E4F1-p53-$p14^{ARF}$ contribue à un arrêt du cycle en phase G2 (Rizos et al., 2003). De plus, l'ubiquitination de p53 par E4F1, sur les résidus lysine K319, K320 et K321, favorise l'association de p53 à la chromatine et conduit à l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle tels que *GADD45* et *p21* au détriment de gènes induisant la mort cellulaire (Le Cam et al., 2006). En effet, ces mêmes résidus lysines sont également modifiés par l'acétyltransférase CBP/p300, ce qui favorise l'apoptose (Liu et al., 1999). Ainsi, la compétition entre PCAF et E4F1 pour la modification de ces résidus de p53 détermine le destin des cellules entre arrêt du cycle et apoptose, faisant d'E4F1 un routeur de la réponse p53.

Paradoxalement, la perte d'E4F1 a également un effet anti-prolifératif, partiellement dépendant de p53. En effet, les MEFs primaires *E4f1* KO présentent un arrêt du cycle en phase G2. L'inactivation de p53 dans ces cellules leur permet de reprendre leur progression dans le cycle mais conduit à des défauts mitotiques et à la mort cellulaire. Ainsi, ces données suggèrent que la perte d'E4F1 induit un arrêt du cycle ou la mort selon le statut p53 des cellules (Rodier et al., 2015).

Points de contrôle du cycle et réparation des dommages à l'ADN

Les expériences de ChIP-seq visant à identifier les cibles d'E4F1 ont permis de mettre en évidence qu'E4F1 régule l'expression de facteurs impliqués dans les points de contrôle du cycle et la réponse aux dommages à l'ADN, incluant la checkpoint kinase 1 (CHK1), son régulateur la Protein phosphatase 5 (PP5C) ainsi que les protéines de réparation de l'ADN RAD52 (DNA Repair Protein RAD52 Homolog) et DDI2 (DNA Damage Inducible 1 Homolog 2) (Rodier et al., 2015). CHK1 est notamment impliquée dans la progression en phase S et ainsi que dans le blocage en G1/S et G2/M en réponse à des dommages à l'ADN. En plus de réguler son expression transcriptionnelle, il a été démontré qu'E4F1 interagit également physiquement avec la protéine CHK1 et la stabilise dans les cellules hématopoïétiques (Grote et al., 2015). Cette interaction semble nécessaire à l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN, puisque l'inactivation génétique d'*E4f1* ou l'inhibition pharmacologique de CHK1 compromettent l'arrêt du cycle et favorisent la mort cellulaire en réponse à un stress réplicatif induit par l'hydroxyurée dans les MEFs (Rodier et al., 2015). De plus, il a récemment été mis en évidence qu'E4F1 est directement impliqué dans la réparation de l'ADN. En effet, Moison *et al*. ont démontré, dans des cellules humaines U2OS, qu'E4F1 est recruté au niveau des cassures de l'ADN grâce à la poly-ADP ribose polymerase 1 (PARP1). E4F1 recrute alors à son tour le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF en interagissant avec sa sous-unité catalytique BRG1 afin de promouvoir la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Moison et al., 2021).

Sénescence

Des données de notre laboratoire suggèrent qu'E4F1 pourrait également être impliqué dans l'entrée en sénescence des cellules. En effet, son expression ectopique dans des MEFs primaires conduit à leur sénescence notamment caractérisée par une stabilisation de p21 et une augmentation de l'activité β-galactosidase. Cet effet est partiellement dépendant de p53, mais implique également d'autres fonctions d'E4F1 et notamment sa capacité à réguler, de manière indépendante de p53, des gènes contrôlant l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase, ce qui est cohérent avec le rôle décrit de ce complexe dans l'induction de la sénescence induite par les oncogènes (Kaplon et al., 2013).

3.3.3. Régulation du métabolisme

3.3.3.1. Activité mitochondriale

Les données de notre laboratoire démontrent qu'E4F1 régule la transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'activité mitochondriale parmi lesquels :

- *Tafaszzin*, *Crls1* et *Dnajc19*, participant à la synthèse des cardiolipines, des phospholipides spécifiques des membranes mitochondriales nécessaires à la stabilisation des protéines transmembranaires et notamment des complexes de la chaine respiratoire dans la membrane mitochondriale interne.
- *Ndufs5*, codant une sous unité de la NADH/Ubiquinone oxydo reductase, le complexe 1 de la chaine de transport des électrons.

Ainsi, l'inactivation d'*E4f1* dans des MEFS conduit à des défauts d'activité mitochondriale qui se traduisent par un stress énergétique, associé à une diminution des niveaux d'ATP intracellulaires et une diminution de la consommation de dioxygène, une inhibition de la synthèse des pyrimidines et une production élevée de ROS (Rodier et al., 2015).

3.3.3.2. Métabolisme du pyruvate

E4F1 a également été identifié comme un régulateur majeur de la pyruvate déshydrogénase (PDH), un complexe enzymatique essentiel au métabolisme du pyruvate au sein de la mitochondrie. La PDH permet la décarboxylation oxydative du pyruvate en Ac-CoA dans la matrice mitochondriale, permettant ainsi de faire le lien entre la glycolyse et le cycle de Krebs. La PDH est composée de multiples copies de trois enzymes catalytiques : la pyruvate dehydrogenase (PDHE1, sous-unité E1), dihydrolipoamide acetyltransferase (DLAT, sous-unité E2) et dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD, sous-unité E3) (Figure 25). L'activité de la PDH est modulée par des modifications post-traductionnelles et notamment l'état de phosphorylation de la sous-unité PDHE1. Ces phosphorylations inhibent l'activité de la PDH et sont médiées par les pyruvate dehydrogenase kinases (PDK1-4). A l'inverse, la PDH est activée sous l'effet des pyruvate dehydrogenase phosphatases (PDP1-2) (Patel et al., 2014).

Les travaux de mon laboratoire ont mis en évidence qu'E4F1 contrôle la transcription de gènes codant plusieurs composants et régulateurs de la PDH. En effet, les gènes cibles d'E4F1 incluent les gènes codant les sous-unités DLAT/E2 et DLD/E3, le transporteur mitochondrial de pyruvate BRP44L/MPC1, le transporteur mitochondrial de thiamine pyrophosphate (Slc25a19) qui fournit un cofacteur essentiel pour le complexe PDH, et une sous-unité régulatrice de la phosphatase qui contrôle le complexe au niveau post-traductionnel (Pdp1r) (Lacroix et al., 2016). Ainsi, il a été montré que l'inactivation d'*E4f1* dans différents types cellulaires (fibroblastes, kératinocytes, cellules musculaires et neuronales) conduit à une nette diminution de l'activité PDH. Ceci provoque alors une reprogrammation métabolique se traduisant par une diminution de la production d'Ac-CoA provenant du pyruvate et une augmentation de la production de lactate (Di Michele et al.; Goguet-Rubio et al., 2016; Lacroix et al., 2016). Ces changements métaboliques conduisent à d'importants phénotypes in vivo notamment dans les muscles squelettiques mais aussi dans la peau.

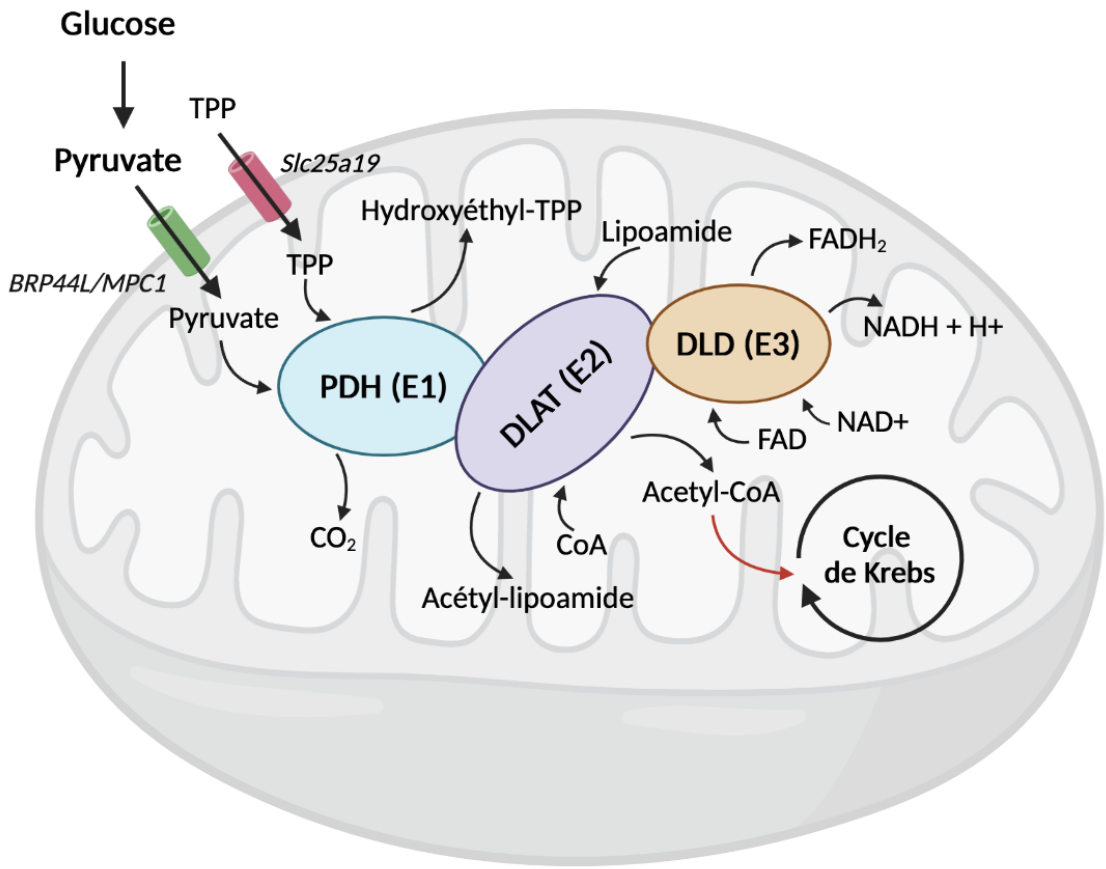


Figure 25 : Complexe pyruvate déshydrogénase

La pyruvate déshydrogénase, composée des sous-unités pyruvate dehydrogenase E1 (PDHE1), dihydrolipoamide acetyltransferase (DLAT) et dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD) permet la décarboxylation oxydative du pyruvate en Ac-CoA dans la matrice mitochondriale, permettant ainsi de faire le lien entre la glycolyse et le cycle de Krebs.

3.3.3.3. Métabolisme des lipides

La décarboxylation du pyruvate par la PDH fournit également aux cellules de nombreux précurseurs et co-facteurs, tels que l'Ac-CoA, le malonyl-CoA, l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA, pour la synthèse des acides gras et du cholestérol dans le cytoplasme. De façon cohérente avec le rôle d'E4F1 dans la régulation de la PDH, notre laboratoire a observé que la perte d'*E4f1* dans les MEFs conduit à une diminution de la production, à partir du glucose, d'Ac-CoA ainsi que de citrate un intermédiaire du cycle de Krebs aussi utilisé pour la synthèse lipidique (Lacroix et al., 2016). Dans les adipocytes in vivo ainsi que dans un modèle d'adipocytes différenciés à partir de MEFs in vitro, l'inactivation d'*E4f1* provoque une diminution drastique de la production et une augmentation de l'oxydation des lipides. Cela se caractérisent par une altération importante de l'accumulation des lipides dans le tissu adipeux in vivo. Ces défauts sont également associés à une diminution de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la synthèse des acides gras, tels que la *Fatty Acid Synthase* (*FASN*), l'*Acetyl-CoA Carboxylase* (*ACC*) et *Stearoyl-CoA Desaturase 1* (*SCD1*). Nos données démontrent que cette régulation est dépendante de p53. En effet, l'inactivation de *p53* restaure la capacité des adipocytes déficients en *E4f1* à synthétiser des acides gras. De plus, nous avons également mis en évidence que les niveaux de p53 et son association à la chromatine sont dérégulés dans les adipocytes déficients en *E4f1*. Tandis que les niveaux protéiques de p53 diminuent dans les adipocytes au cours de leur différenciation à partir des MEFs, celle-ci est maintenue dans les adipocytes *E4f1* KO et conduit à la répression de ses gènes cibles incluant notamment *Scd1*. Plus particulièrement, nous avons montré que E4F1 et p53 sont recrutés sur le promoteur de *Scd1* dans les MEFs non différenciées et que cette liaison est perdue au cours de leur différenciation adipocytaire. Au contraire, dans les cellules déficientes en *E4f1*, la liaison de p53 au promoteur *Scd1* est maintenue, induisant alors sa répression. Ainsi, E4F1 permet de lever l'inhibition du promoteur *Scd1* médiée par p53, en interagissant physiquement avec ce dernier et favorise ainsi la synthèse des acides gras (Lacroix et al.). L'ensemble de ces résultats démontrent donc un rôle essentiel d'E4F1 dans le métabolisme des lipides qui impacte notamment la fonction des adipocytes et l'homéostasie du tissu adipeux.

3.3.4. Conséquences physiologiques

3.3.4.1. Développement embryonnaire précoce

Dans le but d'étudier les fonctions d'E4F1 in vivo, notre laboratoire a généré des souris *E4f1* KO par recombinaison homologue du gène *E4f1* dans des cellules souches embryonnaires (cellules ES). Bien que les souris hétérozygotes *E4f1*$^{+/-}$ se développent normalement, sans différence avec les individus sauvages, la délétion homozygote d'*E4f1* provoque une létalité embryonnaire au stade péri-implantatoire (E4.5-E5.5). Les blastocystes isolés à partir des animaux *E4f1*$^{-/-}$ présentent d'importants défauts de progression mitotique et de ségrégation des chromosomes, qui conduisent à la mort des cellules (Le Cam et al., 2004). Ces résultats démontrent donc qu'E4F1 est indispensable au cours développement embryonnaire.

3.3.4.2. Développement embryonnaire tardif et tissus adultes

Afin de contourner cette létalité embryonnaire et d'étudier le rôle d'E4F1 à des stades plus avancés, notre équipe a généré des modèles murins génétiquement modifiés KO conditionnels (cKO) pour *E4f1* (*E4f1*^{flox}) basés sur le système Cre-LoxP, qui ont ensuite été croisés avec plusieurs lignées de souris exprimant chacune la recombinase Cre dans un tissu différent. Les principaux phénotypes de ces modèles murins sont résumés dans le Tableau 3 ci-dessous et seront détaillés dans les paragraphes suivants.

Tableau 3 : Principaux phénotypes des modèles murins génétiquement modifiés KO conditionnels pour E4f1

Organe (Promoteur)	**Principaux phénotypes**	**Références**
Organisme entier (RERT)	↓ poids corporel ↓ adiposité Ulcérations cutanées Hyperplasie transitoire de l'épiderme Hyperkératose Différenciation anormale des kératinocytes Perte des cellules de l'épiderme Perte des cellules souches épidermiques	Lacroix et al. Lacroix et al., 2010
Système nerveux central (Nestin)	Microcéphalie Apoptose des progéniteurs neuronaux	Di Michele et al.
Epiderme (K5/K14)	Hyperplasie transitoire de l'épiderme Hyperkératose Différenciation anormale des cellules basales Perte des cellules souches de l'épiderme	Lacroix et al., 2010 Goguet-Rubio et al., 2016
Muscles squelettiques (Acta)	Défaut d'endurance musculaire Acidose lactique chronique ↓ activité PDH	Lacroix et al., 2016
Tissu adipeux (AdipoQ /aP2)	Défauts de prise de poids ↓ adiposité Défaut d'accumulation des lipides Résistance à l'insuline Intolérance au glucose	Lacroix et al.

Système nerveux central

L'inactivation d'*E4f1* à l'aide d'une recombinase Cre sous le contrôle du promoteur *Nestin*, actif dans le système nerveux central (neurones et cellules astrogliales) a permis de mettre en évidence un rôle essentiel d'E4F1 dans le développement neuronal embryonnaire. En effet, l'inactivation d'*E4f1* dans le système nerveux central conduit à une mort périnatale. L'analyse des embryons *E4f1*$^{(Nes)cKO}$ a notamment montré une diminution de la prolifération des progéniteurs neuronaux apicaux et intermédiaires conduisant à terme à la mort de ces neurones et à une microcéphalie (Di Michele et al.). Ce phénotype ainsi que les mécanismes impliqués seront exposés en détail dans l'article 1 de la section résultats.

Cellules souches épidermiques

Notre laboratoire a également démontré qu'E4F1 est essentiel au maintien des cellules souches épidermiques et à l'homéostasie de la peau. En effet, l'inactivation conditionnelle d'*E4f1* dans la peau entière, à l'aide d'une recombinase Cre sous le contrôle du promoteur ubiquitaire *RERT*, conduit à de sévères défauts cutanés caractérisés par une hyperplasie transitoire suivie d'une perte totale des cellules de l'épiderme, d'importantes ulcérations de la peau ainsi qu'une alopécie. Pour confirmer que ce phénotype résulte de défauts spécifiques à l'épiderme, un modèle murin permettant l'inactivation spécifique d'*E4f1* dans l'épiderme grâce à une recombinase Cre sous le contrôle du promoteur constitutivement actif *K5* a été généré. Ces animaux présentent également une hyperplasie de l'épiderme mais décèdent rapidement après la naissance d'une déshydratation aigue. Néanmoins, des greffes de peau issue de ces individus sur des souris nude a permis de mettre en évidence que l'inactivation d'*E4f1* dans l'épiderme récapitule les défauts phénotypiques observés dans le modèle RERT. De plus, la caractérisation histologique de ces deux modèles murins a montré une prolifération aberrante des cellules basales de l'épiderme, des défauts de différentiation du lignage kératinocytaire et surtout, une perte des cellules souches épidermiques. L'inhibition de la voie Bmi1-Ink4a/Arf-p53 restaure partiellement les fonctions des cellules souches épidermiques et limite l'apparition des lésions cutanées, démontrant ainsi que ces phénotypes sont partiellement dépendant de cette voie de signalisation (Lacroix et al., 2010).

Afin de confirmer l'origine de ces défauts et d'identifier les autres mécanismes responsables de ces dérégulations, un modèle murin permettant l'inactivation d'*E4f1* dans les cellules basales de l'épiderme par une Cre recombinase sous le contrôle du promoteur inductible *K14* a été développé. Ce modèle murin récapitule l'ensemble des défauts cutanés observés précédemment, à savoir une hyperplasie de l'épiderme, une hyperkératose, des défauts de différenciation du lignage kératinocytaire et la perte des cellules souches épidermiques. Au niveau moléculaire, nous avons mis en évidence que ces altérations sont en partie causées par un dysfonctionnement de la PDH, à la suite de l'inactivation d'*E4f1*. En effet, la perte d'*E4f1* dans les kératinocytes conduit à une diminution de l'activité de la PDH et à une redirection du flux de pyruvate vers la production de lactate. L'augmentation de la sécrétion de lactate dans le microenvironnement cellulaire provoque un remodelage de ce dernier ainsi que l'altération de la lame basale consécutive à l'activation des MMP2 et MMP9. Cela conduit à la perte de contact entre les cellules souches épidermiques et leur niche, et à terme, à leur élimination (Goguet-Rubio et al., 2016).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux décrit un rôle crucial d'E4F1 dans l'homéostasie de la peau et des cellules souches épidermiques, au travers de ses fonctions de régulation de la voie p53 mais aussi du contrôle qu'il exerce sur l'activité de la PDH et le métabolisme du pyruvate.

Tissu adipeux

Comme évoqué dans la section 3.3.3.3, E4F1 régule, avec p53, le métabolisme des lipides. Ainsi, chez la souris, l'inactivation d'*E4f1* dans l'organisme entier (modèle RERT) conduit à une diminution du poids corporel des animaux et à une réduction de l'adiposité. Afin de caractériser de façon plus précise le rôle d'E4F1 dans le tissu adipeux, celui-ci a été inactivé spécifiquement dans les adipocytes à l'aide de recombinase sous le contrôle du promoteur aP2 ou AdipoQ. Les animaux *E4f1*(*aP2*)KO et *E4f1*(*AdipoQ*)KO présentent des défauts de prise de poids malgré une prise alimentaire et une activité locomotrice similaire ainsi qu'une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose, suggérant que l'inactivation d'*E4f1* dans ce modèle altère à la fois le métabolisme des acides gras et du glucose. De plus, une diminution des lipides circulants et une augmentation des corps cétoniques, traduisant une oxydation des lipides ont été observée dans le sérum de ces animaux. D'un point de vue moléculaire, nos travaux démontrent une répression, dépendante de p53, des gènes nécessaires à la synthèse des acides gras tels qu'*Acc*, *Fasn* et *Scd1* (voir section 3.3.3.3).

Ainsi, une diminution de la synthèse des lipides associée à une augmentation de leur oxydation altèrent leur accumulation dans les adipocytes. Conformément au le rôle de la voie E4F1-p53-SCD1 dans la régulation du métabolisme lipidique décrite précédemment, une diminution des acides gras mono insaturés (MUFAs) a également été observée dans les adipocytes *E4f1* cKO. De manière intéressante, une supplémentation alimentaire des souris *E4f1*(*aP2*)KO avec de l'oléate, une source de MUFAs, permet de réduire significativement les défauts phénotypiques causés par l'inactivation d'*E4f1* (Lacroix et al.). L'ensemble de ces résultats soulignent donc l'importance d'E4F1 dans le fonctionnement des adipocytes et l'homéostasie du tissu adipeux.

Muscles squelettiques

Les travaux de notre laboratoire ont également identifié un rôle important d'E4F1 dans les muscles squelettiques striés (Lacroix et al., 2016), un tissu dont la fonction physiologique repose sur une activité élevée de la PDH pendant l'activité physique (Patel and Korotchkina, 2003). L'inactivation spécifique d'*E4f1* dans les muscles squelettiques par une recombinase Cre sous le contrôle du promoteur *Acta* conduit à une diminution drastique de l'activité PDH dans ce tissu. Bien que ces animaux *E4f1*(*Acta*)KO ne présentent pas de déficience locomotrice spontanée, une importante diminution de leur endurance est observée lors d'exercices physiques. Ces défauts s'accompagnent également d'une acidose lactique chronique, cohérente avec une redirection du flux de pyruvate vers la production de lactate causée par un dysfonctionnement de la PDH. De façon intéressante, les animaux *E4f1*(*Acta*)KO présentent des phénotypes qui récapitulent certains des symptômes cliniques observés chez les patients atteints d'une déficience de la PDH (Patel et al., 2012). De plus, tout comme chez ces patients, la réactivation pharmacologique de la PDH ou un régime cétogène, source alternative d'énergie et d'Ac-CoA, restaure partiellement l'endurance physique et les niveaux de lactate sanguins des souris *E4f1*(*Acta*)KO. Ceci confirme ainsi un rôle essentiel d'E4F1, au travers du contrôle de la PDH, dans le maintien de la fonction musculaire.

Spermatogénèse

Les cellules de Sertoli, qui se trouvent dans les tubes séminifères des testicules, interagissent directement avec les cellules germinales et fournissent des facteurs essentiels au développement des cellules spermatogènes (Griswold, 1998). Des défauts de fonction des cellules de Sertoli provoquent une spermatogénèse anormale et une stérilité (Wu et al., 2020). Le nombre de cellules de Sertoli détermine également la taille des testicules et la production de sperme (Orth et al., 1988).

L'inactivation d'*E4f1* dans les cellules de Sertoli dans un modèle murin comportant une recombinase Cre sous le contrôle du promoteur *Amh* conduit à une réduction de la taille des testicules et à une diminution de la fertilité des animaux. Ces défauts s'expliquent par une altération de la prolifération des cellules de Sertoli déficientes en *E4f1* et une augmentation de l'apoptose des cellules germinales lors du développement néonatal (Yan et al., 2020). Ces travaux mettent ainsi en évidence un rôle d'E4F1 dans la régulation de la spermatogénèse et de la fertilité.

Cellules souches hématopoïétiques

Comme évoqué précédemment, BMI1 est un facteur essentiel à la maintenance de l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques (HSC, voir section 3.3.1). Les souris *Bmi1* KO présentent une aplasie du système hématopoïétique dû à un défaut de renouvellement des cellules souches (Park et al., 2003). Néanmoins, la déplétion d'*E4f1* par petits ARN en épingle à cheveux (shRNA) dans les HSC restore la viabilité des animaux *Bmi1* KO, suggérant que les fonctions de BMI1 dans ce modèle sont médiées par E4F1 (Chagraoui et al., 2006a).

Paradoxalement, il a également été montré que le KO d'*E4f1* dans les HSC provoque une insuffisance aiguë de la moelle osseuse, associée à une diminution de la stabilité de *Chk1* induisant une accumulation de dommages à l'ADN et des défauts mitotiques, conduisant par la suite à l'apoptose des progéniteurs des HSC (Grote et al., 2015).

Ainsi, ces résultats, bien que contradictoires, révèlent un rôle crucial d'E4F1 dans l'homéostasie du système hématopoïétique.

3.4. Régulation

Les mécanismes de régulation d'E4F1 restent pour le moment peu connus. Les premières études portant sur E4F1 décrivent que ce dernier pourrait être régulé par phosphorylation, contrôlant ainsi son association à la chromatine (Fognani et al., 1993). Néanmoins, aucune kinase impliquée dans la phosphorylation d'E4F1 n'a pour le moment été identifiée.

D'autres études suggèrent également qu'E4F1 pourrait être régulé par sumoylation. En effet, il a été montré que E4F1 peut être sumoylé par UBC9 à la suite de son interaction avec $p14^{ARF}$ (Rizos et al., 2005). Cette notion est également étayée par des résultats montrant qu'E4F1 peut former un complexe avec la protéine virale Gam1 et Histone Deacetylase 1 (HDAC1), cette dernière étant elle-même régulée par ubiquitination par un mécanisme impliquant Gam1 (Colombo et al., 2002, 2003).

Peu de conditions physiologiques ou physiopathologiques sont actuellement connues pour modifier les niveaux d'expression d'E4F1, à l'exception de infections virales à adénovirus et de certains cancers.

3.5. E4F1 et pathologies humaines

3.5.1. Syndrome de Leigh

Le syndrome de Leigh est un trouble métabolique inné grave, caractérisé par une encéphalomyélopathie nécrosante subaiguë progressive, qui touche environ un nouveau-né sur quarante mille. Ce syndrome résulte de mutations dans des gènes codant des composants du complexe PDH (*PDHA1*, *PDHC*, *PDHX*) ou de la chaîne de transport d'électrons tels que, entre autres, *NDUFA1*, *SURF1* et *MT-ATP6*. Les patients atteints du syndrome de Leigh présentent des atteintes du tronc cérébral et des ganglions de base ainsi qu'une acidose lactique chronique et développent un large éventail de symptômes moteurs et neurologiques, notamment une atonie musculaire, un retard de croissance et un retard mental, une ataxie et une perte de vision.

De manière intéressante, une mutation faux-sens homozygote (K144Q) a récemment été identifiée dans la région codante du gène humain *E4F1* chez deux frères et sœurs d'une famille italienne présentant des symptômes cliniques rappelant ceux des patients atteints du syndrome de Leigh. Cette mutation constitue la première mutation identifiée pour *E4F1* chez l'Homme. Elle est également associée à une diminution de l'expression transcriptionnelle des gènes cibles d'E4F1 dans les fibroblastes des patients porteurs, incluant notamment *DLAT* (Legati et al., 2016).

De façon cohérente avec ces observations, des modèles de souris déficientes en *E4f1* dans leurs muscles squelettiques ou dans le système nerveux central, présentent des phénotypes qui récapitulent certains des symptômes cliniques des patients atteints du syndrome de Leigh, notamment une acidose chronique au lactate, des défauts d'endurance musculaire, une microcéphalie et une dégénérescence neuronale (Di Michele et al.; Lacroix et al., 2016).

3.5.2. Cancers

Compte tenu de son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, de la prolifération et du métabolisme, ainsi que de ses interactions avec des oncogènes (BMI1, HMGA2) et de nombreux suppresseurs de tumeur (p53, pRb, $p14^{ARF}$, RASSF1A), il ne serait pas étonnant qu'E4F1 soit impliqué dans la tumorigenèse.

Bien qu'aucune mutation récurrente n'ait été identifiée à ce jour, de récentes données révèlent que l'expression d'E4F1 peut être modifiée dans différents cancers. En effet, une amplification ou une surexpression d'E4F1 a tout d'abord été observée dans les cancers du sein, de façon mutuellement exclusive avec les mutations BRCA1/2. Bien que cela ne semble pas impacter la survie des patients de bas grade, une expression élevée d'E4F1 aux stades avancés est associée à un mauvais pronostic et à une diminution de la survie (Moison et al., 2021). L'expression d'E4F1 est également augmentée dans les hépatocarcinomes causés par les virus de l'hépatite B et C. Son inhibition, in vitro, conduit à une augmentation de l'autophagie, des défauts métaboliques et un arrêt du cycle cellulaire (Dai et al., 2014). De même, E4F1 a été décrit comme surexprimé dans une large proportion d'échantillons humains de leucémies myéloïdes chroniques. Sa déplétion dans un modèle de sarcome histiocytaire (une leucémie myéloïde provenant de la lignée des monocytes/macrophages) conduit à une régression de la tumeur et à une mort cellulaire par autophagie causée par des défauts mitochondriaux et la production accrue de ROS (Hatchi et al., 2011a). Enfin, il a récemment été décrit qu'E4F1 peut être induit lors de la transformation des cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 (Tan et al., 2019). De façon intéressante, il a également été montré que l'expression d'E4F1 est induite par l'ARN long non codant TOB1-AS1 dans les cancers du poumon non à petites cellules et qu'une expression élevée d'E4F1 est associée à un meilleur pronostic et à une augmentation de la survie globale (Shangguan et al., 2019).

Ainsi, les effets d'E4F1 sur la survie des cellules cancéreuses semblent différer d'un type cellulaire à un autre et varient probablement également en fonction du statut p53 de ces tumeurs. Le rôle exact d'E4F1 dans la tumorigénèse reste pour le moment à déterminer.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Bien qu'E4F1 ait été identifié dès la fin des années 1980 comme une cible de l'oncoprotéine E1A, ses fonctions sont longtemps restées peu étudiées. A partir des années 2000, des travaux dont ceux de mon laboratoire ont établi qu'E4F1 agit à la fois comme un facteur de transcription et une E3 ligase pour réguler de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la survie et le métabolisme des cellules normales et transformées. Afin d'évaluer ses fonctions in vivo dans les tissus adultes, mon équipe a développé plusieurs modèles murins génétiquement modifiés basés sur le système Cre-LoxP. Le premier modèle conditionnel généré consistait en une inactivation d'*E4f1* dans l'organisme entier et a permis de démontrer qu'E4F1 est essentiel à l'homéostasie de la peau. En effet, la perte d'*E4f1* conduit à des défauts cutanés sévères caractérisés par une perte totale des cellules de l'épiderme, causée par la perte des cellules souches épidermiques. Au niveau moléculaire, il a été décrit que ces défauts impliquent à la fois la voie de signalisation Bmi1-p53-Arf et le contrôle du métabolisme du pyruvate. Par ailleurs, une caractérisation plus poussée de ce modèle a également révélé des défauts de pigmentation, suggérant que les fonctions d'E4F1 dans la peau ne se limitent pas aux kératinocytes mais pourraient s'étendre à d'autres types cellulaires cutanés.

Le premier objectif de ces travaux de thèse a donc été de caractériser les fonctions d'E4F1 dans les cellules cutanées responsables de la pigmentation, les mélanocytes. Dans ce but, j'ai généré un nouveau modèle murin permettant l'inactivation spécifique d'*E4f1* dans ces cellules à l'aide d'une recombinase Cre sous le contrôle du promoteur *Tyr*.

À la suite de la caractérisation de ce modèle, le second objectif de ma thèse a été de caractériser les mécanismes moléculaires sous-jacents aux défauts observés in vivo, à l'aide d'un modèle de mélanocytes pigmentés immortalisés.

Enfin, le troisième objectif de mes travaux a été d'identifier le rôle d'E4F1 dans le développement des mélanomes, un cancer cutané dérivant des mélanocytes, à l'aide de modèles murins portant des mutations des oncogènes $Braf^{V600E}$ et $Nras^{Q61K}$ ainsi que de lignées cellulaires de mélanomes humains cultivées à court terme.

RÉSULTATS

<u>Article 1</u> : E4f1 coordinates pyruvate metabolism and the activity of the Elongator complex to ensure protein translation fidelity during neuronal development.

Le syndrome de Leigh est une maladie neurodégénérative grave qui touche environ un nouveau-né sur quarante mille et qui résulte de déficiences mitochondriales dans le métabolisme du pyruvate ou dans la chaîne de transport des électrons. Les patients atteints du syndrome de Leigh présentent des atteintes du tronc cérébral et des ganglions de base ainsi qu'une acidose lactique chronique et développent un large éventail de symptômes moteurs et neurologiques, notamment une atonie musculaire, un retard de croissance et un retard mental, une ataxie et une perte de vision.

La protéine multifonctionnelle E4F1 a récemment été associée au syndrome de Leigh. En effet, deux frères et sœurs porteurs d'une mutation homozygote *E4F1*^{K144Q} ont développé des symptômes cliniques rappelant ceux observés chez les patients atteints du syndrome de Leigh. Notre laboratoire a précédemment identifié E4F1 comme un régulateur majeur de la pyruvate déshydrogénase (Lacroix, 2016). De manière cohérente, les souris knock-out (KO) dépourvues de E4F1 dans leurs muscles squelettiques présentent une activité PDH réduite et récapitulent certains des symptômes cliniques caractéristiques des patients atteints du syndrome de Leigh, notamment une acidose lactique chronique une intolérance à l'exercice (Lacroix et al. 2016). Cependant, le rôle d'E4F1 dans le système nerveux central n'a jusqu'alors pas été étudié.

Dans cette étude, nous avons généré des souris dépourvues de E4F1 dans le système nerveux central afin d'étudier son rôle au cours du développement neuronal. La caractérisation de ce modèle ainsi que de cellules mutées *E4F1* de patients a démontré qu'en plus de son rôle dans le métabolisme du pyruvate, E4F1 est un régulateur transcriptionnel clé d'ELP3, un gène codant pour la sous-unité catalytique du complexe Elongator. L'inactivation d'E4f1 dans les neurones au cours du développement embryonnaire conduit à une altération de l'édition des ARNt et à l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique et d'une réponse aux protéines mal repliées qui entraîne de graves défauts cérébraux et une microcéphalie. Ainsi, nos données illustrent pour la première fois un lien entre le métabolisme du pyruvate et la régulation de la traduction qui est perturbée chez les patients atteints du syndrome de Leigh.

E4F1 COORDINATES PYRUVATE METABOLISM AND THE ACTIVITY OF THE ELONGATOR COMPLEX TO ENSURE PROTEIN TRANSLATION FIDELITY DURING NEURONAL DEVELOPMENT

Di Michele Michela[1], Attina Aurore[2], Laguesse Sophie[3], Wendling Olivia[4], De Blasio Carlo[1], Frenois Francois-Xavier[5], Jahanault-Tagliani Céline[1], Rousseau Mélanie[1], Fuentes Maryse[1], Guegan Justine[6], Buscail Yoan[1,7], Encislai Betty[1], Dupré Pierrick[1], Michaud Henri-Alexandre[8], Rodier Geneviève[1], Ferraro Peyret Carole[9], Mathieu Hugo[1], Chaveroux Cédric[9], Pirot Nelly[1,7], Rubio Lucie[1], Torro Adeline[1], Compan Vincent[10], Sorg-Guzz Tania[4], Ango Fabrice[10], Kulyk Barbier H.[11], Bellvert Floriant[11], Portais Jean-Charles[11], Lebigot Elise[12], Legati André[13], Ghezzi Daniele[13], David Alexandre[10], Hirtz Christophe[2], Nguyen Laurent[3], Sardet Claude[1], Lacroix Matthieu[1,14] and Le Cam Laurent[1,14*]

[1]Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), INSERM U1194; Univ. Montpellier, Institut régional du Cancer de Montpellier (ICM), Montpellier, F-34298, France.

[2]University of Montpellier, IRMB-PPC, INM, CHU Montpellier, INSERM CNRS, Montpellier, France.

[3]GIGA-Stem Cells, Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics (GIGA-R), University of Liège, C.H.U. Sart Tilman, Liège, Belgium.

[4]CNRS, INSERM, CELPHEDIA, PHENOMIN-Institut Clinique de la Souris (ICS), Université de Strasbourg, 1 Rue Laurent Fries, Illkirch Graffenstaden, France.

[5]Department of Pathology, CHU, Imag'IN Platform, IUCT-Oncopole, Toulouse, France.

[6]iCONICS, Plateforme de Bioinformatique, Institut du Cerveau, ICM, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

[7]BioCampus, RHEM, University of Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France.

[8]CIM, IRCM, ICM, University of Montpellier, Montpellier, France.

[9]*Université Lyon, Cancer Research Centre of Lyon, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France.*

[10]*IGF, University of Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France.*

[11]*TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse F-31400, France. MetaToul-MetaboHUB, National Infrastructure of Metabolomics and Fluxomics, Toulouse, France*

[12]*Hopital Bicêtre, laboratoire de Biochimie, Exploration fonctionnelle des maladies héréditaires du métabolisme, Paris, France.*

[13]*Unit of Molecular Neurogenetics, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico 'Carlo Besta', 20126 Milan, Italy.*

[14]*Co-senior authors.*

[*] *Corresponding author: laurent.lecam@inserm.fr (L.L.C.)*

Keywords: E4F1, Leigh syndrome, pyruvate metabolism, Elongator, translation, integrated stress response.

Running title: E4F1 regulates translation fidelity through the Elongator complex in neurons.

SUMMARY

The Leigh syndrome is a severe inborn neurodegenerative encephalopathy commonly associated with pyruvate metabolism defects. The transcription factor E4F1, a key regulator of the pyruvate dehydrogenase complex (PDC), was previously found to be mutated in Leigh syndrome patients but the molecular mechanisms leading to cell death in E4F1-deficient neurons remain unknown. Here, we show that E4F1 regulates a transcriptional program coordinating AcetylCoenzyme A production by the PDC and its utilization by the Elongator complex to acetylate tRNAs and ensure protein translation fidelity in the central nervous system. E4F1 directly regulates *Dlat* and *Elp3*, two genes encoding key subunits of the PDC and the Elongator complex, respectively. Consistently, genetic inactivation of *E4f1* in neurons during mouse embryonic development decreased the activity of the PDC and of the Elongator complex, resulting in impaired tRNAs editing and the induction of an integrated stress response (ISR), neuronal cell death and microcephaly. Moreover, analysis of PDH-deficient cells unraveled a crosstalk between pyruvate metabolism and the Elongator complex that is perturbed in Leigh syndrome patients.

INTRODUCTION:

The Leigh syndrome is a severe neurodegenerative disease affecting one in forty thousand newborns that stems from mitochondrial deficiencies in pyruvate metabolism or in the electron transport chain (ETC). Mutations in over seventy-five genes have been linked to this inborn metabolic disorder, including mutations in genes encoding key components or regulators of the pyruvate dehydrogenase complex (PDC), a mitochondrial multisubunit complex that converts pyruvate into AcetylCoenzymeA (AcCoA) to fuel the tri-carboxylic acid cycle. Leigh syndrome patients display chronic lactate acidemia and bilateral necrotizing lesions of the basal ganglia and the brain stem. Affected children develop a broad range of motor and neurological symptoms, including muscular atonia, growth and mental retardation, ataxia and vision loss. No efficient cure has been identified so far for this life-threatening disease although few patients have shown a partial improvement of their clinical symptoms under a ketogenic diet, a regime that metabolically bypasses the PDC complex, or upon its pharmacological stimulation by dicholoro-acetate (DCA)[1,2]. Paradoxically, despite most of the genetic alterations implicated in Leigh syndrome have been identified, the molecular mechanisms underlying the clinical symptoms of these children, and in particular their neurological defects, remain poorly understood.

The multifunctional protein E4F1 was recently linked to the Leigh syndrome. Thus, two siblings harboring a homozygous *E4F1*^{K144Q} mutation developed clinical symptoms reminiscent of those observed in Leigh syndrome patients, including muscular hypotonia, microcephaly, hyperlactacidemia and organic aciduria. Brain MRI-imaging revealed symmetric necrotic lesions in the subthalamic nuclei and in the substantia nigra[3]. The E4F1 protein was originally identified as a transcriptional regulator of the E4 viral gene that is hijacked by the viral oncoprotein E1A during adenoviral infection[4]. Since, E4F1 was also characterized as an atypical E3 ligase of the tumor suppressor p53 that controls its transcriptional activities independently of degradation[5]. Beside its role in regulating the balance between cell proliferation and cell death[5-8], E4F1 was also identified as a major regulator of the PDC complex. Thus, E4F1 directly binds to the promoter region of several genes encoding essential

subunits or regulators of the PDC complex, including DLAT and DLD, the E2 and E3 core subunits of the PDC, respectively, the regulatory subunit of the PDH phosphatase complex (PDPR), the pyruvate transporter of the inner mitochondrial membrane MPC1, and the SLC25A19 protein involved in mitochondrial uptake of thiamine pyrophosphate, an essential co-factor of the PDC[9-11]. Consistently, knock-out (KO) mice lacking E4F1 in their skeletal muscles exhibit decreased PDC activity and display phenotypes that are comparable to some of the clinical symptoms of Leigh syndrome patients, including chronic lactate acidemia and exercice intolerance[9]. However, no major neurological defects were observed in this animal model, suggesting that the neuronal cell death observed in Leigh syndrome patients results from cell autonomous defects. Here, we generated mice lacking E4F1 in the central nervous system (CNS) to investigate its role during neuronal development. Detailed molecular characterization of this animal model during embryonic development and of E4F1-deficient primary fibroblasts demonstrated that in addition to its role in pyruvate metabolism, E4F1 is also a key transcriptional regulator of *Elp3*, a gene encoding the catalytic subunit of the Elongator complex. Elongator displays acetyl-transferase activity which targets a subset of tRNAs in the acceptor stem loop at the uridine wobble position 34 (U_{34}) to promote a stepwise cascade of chemical modifications (thiolation and methoxy-carbonyl-methylation) to produce mature tRNAs and thereby enhance protein translation fidelity[12]. Perturbation of E4F1-mediated control of the Elongator complex during embryonic development resulted in severe brain defects and microcephaly that are associated with impaired tRNA editing and the induction of an integrated stress / unfolded protein response and neuronal cell death[13]. Moreover, we identified a previously unknown crosstalk between PDH and ELP3 expression that is perturbed in Leigh syndrome patients. Altogether, our data highlight the importance of the links between pyruvate metabolism and tRNAs editing to ensure proteome homeostasis in the CNS.

RESULTS:

E4F1 plays a critical role in neuronal development.

To evaluate the roles of *E4f1* during neuronal development, we generated animals lacking E4F1 in their central nervous system (CNS) by crossing *E4f1* constitutive and conditional Knock-out (KO) mice with animals expressing the CRE recombinase under the control of the *Nestin* promoter that is predominantly active in neurons and astroglial cells, and with a reporter strain allowing Cre-mediated expression of the green fluorescent protein (GFP) from the ROSA26 locus (Supplementary Fig. S1A)[14-16]. In these compound mice (hereafter referred to as $E4f1^{(Nes)KO}$) and their control littermates ($CTL^{(Nes)}$), immunohistochemistry (IHC) analysis of the GFP reporter on head or whole embryo saggital sections isolated at different developmental stages confirmed that Cre-mediated recombination was mainly restricted to the CNS and the spinal cord (Fig. 1A and Supplementary Fig. S1B). The efficiency and the specificity of Cre-mediated inactivation of *E4f1* in the CNS was confirmed at E14.5 by immunoblotting and RT-qPCR, respectively (Fig. 1B-C). $E4f1^{(Nes)KO}$ mice were represented at the expected mendelian ratio at E14.5, E16.5 and E18.5 and showed no obvious growth developmental abnormalities, but were absent at P1, indicating that E4F1 deficiency in the CNS leads to perinatal death (Fig. 1D and Supplementary Fig. S1C, D). The width and length of $E4f1^{(Nes)KO}$ brain were significantly smaller than those of control littermates and those defects progressively increased during embryonic development, recapitulating the microcephaly observed in Leigh syndrome patients (Supplementary Fig. S1E).

Next, we performed high-resolution episcopic microscopy (HREM) and generated three-dimension (3D) volumic brain reconstructions of E14.5 and E16.5 $E4f1^{(Nes)KO}$ embryos and control littermates to evaluate the morphology of different regions of the CNS. These analyses revealed that the forebrain, midbrain and hindbrain neuroepithelium of E16.5 $E4f1^{(Nes)KO}$ embryos presented large areas of degeneration. These defects were illustrated by patchy losses of neuroepithelium or as areas of ballooning leading to alterations in the structure of all regions of the brain. The space between the brain and the cranium was also enlarged in E4F1-deficient mutants when compared to control littermates. 3D reconstructions showed that

the volume of the total and subdivided neural tissues (forebrain, midbrain, hindbrain) was smaller in *E4f1*$^{(Nes)KO}$ E16.5 embryos, whereas the volume of the total and subdivided ventricles appeared higher in E4F1-deficient animals than in control littermates. These brain lesions were less severe at E14.5, suggesting that the brain defects resulting from E4F1 deficiency started at E14.5 and worsened at later stages of embryonic development (Fig. 1F,G and Supplementary Fig. S2A, S2B). Histological analyses of hematoxylin and eosin (H&E) -stained sagittal sections of E14.5, E16.5 and E18.5 embryos confirmed the structural lesions observed by HREM and showed that these brain defects started at E14.5 and increased at later developmental stages. The thickness of the cortical plate (CP), which is enriched in neurons, was reduced in E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos. E4F1 deficiency in the brain resulted in decreased cellularity of all cortical layers (Supplementary Fig. S2C). Moreover, IHC and immunoblot analyses showed increased expression of the apoptotic marker cleaved caspase 3 (CC3) at E16.5 and E18.5, but not at E14.5 (Fig. 2A-C). To identify the neuronal populations in which E4F1 plays an important role, we determined in coronal brain sections prepared from E14.5 embryos the expression of CC3 and of the proliferation marker Ki67 in apical and intermediate progenitors, identified on the basis of SOX2 and TBR2 expression, respectively (Fig. 2D). These in situ analyses showed that E4F1 deficiency impaired proliferation of both apical and intermediate neuronal progenitors, likely explaining the decreased cellularity observed in the neuroepithelium (Fig. 2D). Consistent with our previous findings, no CC3 staining was observed at E14.5 in SOX2 or TBR2 positive progenitors, suggesting that the proliferation defects of E4F1-deficient progenitors at E14.5 preceded neuronal cell death at later stages of development (Fig. 2D). Altogether, these data indicate that E4F1 plays a critical role in neuronal proliferation and cell survival during mid-corticogenesis and that perturbation of E4F1 neuronal functions results in microcephaly and perinatal death.

E4F1 controls its core transcriptional program in neurons.

To gain insights into the molecular mechanisms underlying impaired neurogenesis in E4F1-deficient neurons, we compared the gene expression profile of total brains harvested from *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos at E14.5 using RNA sequencing (RNA-seq). Upon *E4f1* inactivation in the CNS, 187 genes displayed a fold change superior to 2 with a false discovery rate (FDR) inferior to 0,05, among which 120 were significantly down-regulated and 67 were up-regulated. Among the 35 most differentially expressed transcripts in E4F1-deficient neurons were *Dlat*, *Neurl4*, *Elp3*, *Wdr7*, *Taz*, *Fktn*, *Dnajc19*, *Senp8*, *Tti2*, *Rad52*, *Dph5*, *Mrfap1*, *Mrpl15*, and *Prbm1* (Fig. 3A,B and Supplementary Fig. S3A). Interestingly, all these genes were previously identified as E4F1-direct target genes in mouse fibroblasts and ES cells by chromatin immunoprecipitation (ChIP) combined with deep sequencing (ChIP-seq), indicating that E4F1 controls the same core transcriptional program in multiple cell types[9,11,17]. Impaired expression of a subset of genes composing this core E4F1 program was confirmed by RT-qPCR on mRNAs isolated from total brains or from forebrains of E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos (Fig. 3C and supplementary Fig. S3C). A more global comparison (GSEA) between E4F1 direct target genes identified by ChIP-seq in Mefs/ES cells and genes differentially expressed in *E4f1*$^{(Nes)KO}$ brains indicated that this core E4F1 program was statistically deregulated in E4F1-deficient neurons (Fig. 3D). Of note, gene set enrichment analysis (GSEA) also indicated that an ATF-mediated endoplasmic reticulum (ER) stress / unfolded protein response (UPR) was clearly induced in E4F1-deficient neurons (Fig. 3E, F).

E4F1 regulates the PDC complex and pyruvate metabolism in neurons

Among the top three most deregulated genes identified by RNA-seq in the brain of *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos was *Dlat*, a gene encoding the E2 subunit of the PDC complex. Interestingly, RT-qPCR analysis on forebrain mRNAs indicated that the role of E4F1 in the regulation of the PDC complex in neurons extended to a set of genes that were also previously identified as E4F1-direct target genes and which encode other key subunits or regulators of the PDC, including *Dld*, *Mpc1*, *Slc25a19*, and *Pdpr* (Fig. 4A). Furthermore, immunoblot

analyses confirmed that *E4f1* inactivation in neurons impinged on DLAT and MPC1 protein levels, whereas those of PDHA1, the E1 subunit of the PDC complex, that was measured as a control, and DLD, remained unaffected (Fig. 4B). Consistent with this expression profile, PDH activity was strongly impaired in the brain of *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos (Fig. 4C) and resulted in increased concentration of circulating lactate (Fig. 4D). Moreover, the protein levels of the lactate transporter MCT4 were upregulated in the brain of E4F1-deficient embryos (Fig. 4E). Altogether, these data show that *E4f1* inactivation in neurons impacts on pyruvate oxidation by the PDC and induces the metabolic reprogramming of these cells to favor the redirection of the glycolytic flux towards lactate production.

E4f1 controls the Elongator complex in neurons

Strikingly, our RNA-seq datasets indicated that *Elp3* mRNA levels were also strongly reduced in E4F1-deficient brains (Fig. 3A-B). *Elp3* encodes the catalytic subunit of the Elongator complex, an acetyl-transferase that was previously implicated in neurogenesis[13]. This prompted us to further investigate the links between E4F1 and the Elongator complex. Analysis of previous ChIP-seq experiments performed in murine Mefs and ES cells suggested that *Elp3* is a direct target gene of E4F1 (Fig. 5A)[9]. Accordingly, quantitative ChIP (qChIP) experiments performed with a previously validated polyclonal anti-E4F1 antibody showed that E4F1 binds the promoter region of *Elp3* in neuronal N2A cells on its canonical binding site (Fig. 5B)[17]. We then determined by RT-qPCR the mRNA levels of different key subunits of the Elongator complex in the forebrain of *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos. Consistent with the role of E4F1 in the direct regulation of *Elp3* transcription, the mRNA levels of *Elp3* were reduced in E14.5 E4F1-deficient brains, whereas those of *Elp1*, *Elp2* and *Elp4*, remained unchanged at E14.5 (Fig. 5C). At later developmental stages (E16.5 and E18.5), the mRNA levels of all these core subunits of the Elongator complex were affected by E4F1 deficiency, likely as a result of a positive feedback loop (Supplementary Fig. S4A). Immunoblotting showed that *E4f1* inactivation also impacted on ELP3 protein levels and, consistent with previous reports showing that depletion of the catalytic subunit ELP3 leads to the disruption of the Elongator

complex and reduces the stability of the other core subunits, ELP1 protein levels also decreased in the brain of *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos (Fig. 5D).

Next, we explored the impact of E4F1-deficiency on the activity of the Elongator complex. The Elongator complex acetylates a subset of tRNAs to initiate a stepwise cascade of modifications that lead to the attachment of carboxy-methyl (cm^5) moieties to the uridine located at the U_{34} position of the stem loop (Fig. 5E). Liquid-chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (LC-MSMS) analysis of tRNAs purified from E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ brains showed that the relative abundance of 5-carbamoylmethyl uridine (ncm^5U) and 5-methoxy-carbonyl-methyl-2-thio uridine (mcm^5s^2U) decreased in E4F1-deficient neurons, whereas that of other tRNAs modifications not linked to the Elongator complex, including m3C and Gm, remained unchanged (Fig. 5F). RT-qPCR analyses showed that the total amount of tRNAs targeted by the Elongator complex (tRNAs-Gln, tRNAs-Glu and tRNA-Lys) remained unchanged, confirming that the decreased abundance of mcm^5s^2U and ncm^5U was not the consequence of impaired production of these tRNAs (Supplementary Fig. S4C). Since the Elongator complex has also been involved in tubulin and histone acetylation, we evaluated the ratio of acetylated/total tubulin (AcTub/Tub) and of acetylated histone H3 on lysine 14/total Histone H3 (H3K14ac/H3)[18,19]. We failed to detect any significant differences of AcTub nor of H3K14ac, indicating that, at least in E4F1-deficient neurons, impaired ELP3 expression only impinged on tRNAs editing (Supplementary Fig. S4D).

Previous findings showed that consistent with its role in regulating translation fidelity, perturbations of the Elongator complex during corticogenesis leads to the induction of an UPR mediated by members of the Activating Transcription Factor (ATF) family[13]. In agreement with this notion, RNA-seq and RT-qPCR analyses indicated that E4F1-deficient brains exhibited increased mRNA levels of genes implicated in the ISR/UPR, including *Atf3*, *Atf5*, *Eif4ebp1, Asns*, *Sesn2*, *Slc6a9*, *Chop*, *Chac1*, *Trib3*, *Mthfd2*, *Slc3a2* and *Slc7a5* (Figs. 3A, 5G). ISR involves the derepression of integral ER membrane proteins that can activate independent signaling pathways.

Of note, the mRNA levels of *Xbp1* and its spliced transcripts *Xbp1-u* and *Xbp1-s*, as well as those of *Atf6*, remained unchanged in E4F1-deficient neurons, suggesting that *E4f1* inactivation specifically activated the branch of the UPR implicating the PERK kinase and ATF4, but not those implicating IRE1a or ATF6 (Fig. 5G). Consistent with this hypothesis, IF of brain sections of *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos confirmed the induction of ATF4 protein levels in E4F1-deficient neurons (Fig. 5H). IF analyses of brain sections prepared from *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos and control littermates confirmed that *E4f1* inactivation in neurons also led to the upregulation of ASNS (Fig. 5I). Altogether, these data demonstrate that *Elp3* is an E4F1 direct target gene and that E4F1 deficiency in neurons impacts on the activity of the Elongator complex. Our data also support the notion that perturbation of E4F1-mediated control of proteome homeostasis leads to the induction of an ISR/UPR and ultimately to neuronal cell death.

E4F1 coordinates pyruvate-derived AcCoA production by the PDC and tRNA editing

The key role of E4F1 in pyruvate metabolism and in the regulation of the Elongator complex prompted us to evaluate whether E4F1 coordinates, at the transcriptional level, the production of pyruvate-derived AcCoA by the PDC and its utilization by the elongator complex to promote tRNA editing and ensure protein translation fidelity. To challenge this hypothesis, we first evaluated *Dlat* and *Elp3* expression upon *E4f1* inactivation in primary mouse embryonic fibroblasts (Mefs). E4F1-deficient Mefs exhibited impaired *Dlat* and *Elp3* protein and mRNA levels (Fig. 6A,B). Moreover, and consistent with our findings in *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos, these cells also exhibited decreased amount of mcm^{5}s^{2}U and ncm^{5}U (Fig. 6C). Next, we performed stable isotope tracing experiments to evaluate whether pyruvate-derived AcCoA produced by the PDC serves as a co-factor and a carbon source for the Elongator complex for tRNAs editing. Mefs were incubated in presence of uniformally labelled ^{13}C-pyruvate for 6h and we then measured by LC-MSMS ^{13}C-enrichment in the ionized fragments of ncm^{5}U and mcm^{5}s^{2}U that were predicted to include the 2 heavy carbons provided by ^{13}C-AcCoA into the side chain of the uridine ring upon acetylation by the Elongator complex (Fig. 6D).

Mass isotopolog distribution (MID) revealed that the m+2 isotopologs of ncm^{5}U and mcm^{5}s^{2}U were significantly detected in Mefs incubated with ^{13}C-pyruvate, a process that was affected upon incubation with UK-5099, a pharmacological inhibitor of the pyruvate mitochondrial transporter MPC1 that indirectly blocks PDH activity (Fig. 6E). Hence, these data demonstrate that pyruvate-derived AcCoA produced by the PDC directly contributes to tRNAs editing.

PDH deficiency impacts on ELP3 expression

To further understand the relationship between pyruvate metabolism and the elongator complex, we depleted PDHE1 in Mefs using 2 independent shRNAs. Strikingly, *Pdhe1* knock-down cells displayed decreased ELP3 protein levels, unraveling a previously unknown crosstalk between the PDC and ELP3 expression (Fig. 6F). Consistent with these findings, we noticed that skin fibroblasts isolated from Leigh syndrome patients harboring mutations in the *PDHE1* or the *E4F1* genes, but not in those with mutations of *SURF1* or *NDUFS6*, also displayed reduced ELP3 protein levels (Fig. 6G). Since the Leigh syndrome is a monogenic disease, we next evaluated the effect of expressing ectopic wild-type (WT) PDHE1 on endogenous ELP3 in these patient-derived PDHE1-mutated cells. PDHE1 expression increased ELP3 protein levels, confirming that modulating PDC activity impinges on ELP3 expression (Fig. 6H). Hence, these data highlight a previously unknown interplay between pyruvate metabolism and the Elongator complex.

DISCUSSION

The Leigh Syndrome is a severe pediatric neurodegenerative disease linked to either PDC or ETC deficiencies. Prognosis for Leigh syndrome patients is very poor and current treatments provide limited improvement of their clinical symptoms[1]. The paucity of clinically relevant animal models recapitulating PDC deficiency has impeded our understanding of the molecular defects underlying these symptoms and the development of efficient treatments. Because the relative contribution of cell autonomous versus systemic metabolic defects to the various clinical manifestations associated with Leigh syndrome remain elusive, the development of genetically engineered mouse models allowing tissue specific inactivation of genes related to the Leigh syndrome is of major interest. To address these questions, we initially generated a skeletal muscle-specific conditional KO mouse strain allowing Cre-mediated inactivation of *E4f1*, a gene mutated in Leigh syndrome encoding a key transcriptional regulator of the PDC. These animals develop normally and do not display any obvious neurological abnormalities, but exhibit muscular endurance defects and chronic lactate acidemia similarly to Leigh syndrome patients[9]. Here, we report the generation and the detailed characterization of a complementary mouse model that we used to genetically inactivate *E4f1* in the CNS during embryonic development and show that these animals develop severe neurological defects leading to microcephaly, one of the common clinical manifestations of affected children. We used this animal model to further characterize the molecular defects of E4F1-deficient neurons, and consistent with previous findings, we confirmed the importance of E4F1 in the regulation of the PDC. More unexpectedly, we also found that E4F1 directly controls at the transcriptional level *Elp3*, a gene encoding the catalytic subunit of the Elongator complex, a multisubunit acetyl-transferase which promotes the production of a subset of mature tRNAs to ensure protein translation fidelity. Finally, we identified an unexpected crosstalk between the PDC and ELP3 that is perturbed in cells isolated from PDH-deficient patients, suggesting that impairement of protein translation fidelity might be a common feature of cells exhibiting impaired PDH activity.

How metabolic perturbations lead to changes in gene expression is a field of active research. Many studies highlighted the role of different metabolites, including AcCoA and S-Adenosyl-Methionine (SAM) in the regulation of the epigenome[20]. By serving as essential co-factors of acetyltransferases and methyltransferases, these metabolites directly contribute to DNA or histone modifications, thereby influencing transcription. Although it is known for decades that some of these acetyl- or methyl- transferases also target RNAs, including mRNAs, tRNAs, or ribosomal RNAs, the importance of their metabolic co-factors in regulating the epitranscriptome remains poorly understood[21]. Using an innovative stable isotope tracing method, we formally demonstrate, for the first time, that pyruvate-derived AcCoA produced by the PDC significantly contributes to tRNAs modifications linked to the Elongator complex that are implicated in the production of mature tRNAs. Altogether, our data support a model where E4F1 regulates a transcriptional program that coordinates AcCoA production by the PDC and its utilization by the Elongator complex to promote tRNAs editing. Perturbation of this program decreases the abundance of tRNAs modifications initiated by the Elongator complex, and likely as the result of impaired protein translation fidelity, leads to the induction of an ISR and ultimately to neuronal cell death.

It is noteworthy that some antibiotics, including tetracyclines, have been shown recently to significantly improve the fitness of glucose-deprived cells isolated from patients suffering mitochondrial diseases, including those exhibiting mutations of the complex I subunit-encoding gene *Ndufs4* which is also mutated in Leigh syndrome. Strikingly, doxycycline selectively attenuates mitochondrial translation in *Ndufs4*-mutated cells, resulting in the induction of an ATF4-driven ISR. However, the protective effects provided by these antibiotics in these cells was independent of this ATF4-driven response but was rather attributed to the induction of a mitohormetic response which restored a proper redox balance and thereby improved cell survival[22]. These results suggest that modulating mitochondrial translation, a process amenable to pharmacological intervention, plays a pivotal role in protecting cells exhibiting ETC deficiency under nutrient-starved conditions.

In the case of E4F1-deficient neurons, it is possible that the ATF4-driven ISR is a protective mechanism induced in response to translation fidelity defects rather than a pathway contributing to neuronal cell death. Interestingly, previous studies also suggested that modulating mTORC1 activity, or activating a hypoxic response, can rescue phenotypes associated to respiratory chain deficiencies by inducing metabolic shifts preventing the ETC to produce reactive oxygen species[23,24]. The efficiency of these approaches in case of PDH-deficient-related mitochondrial diseases has not been evaluated yet. Our data pave the way for further studies aiming at evaluating whether the interplay between the PDC and the Elongator complex also represents a new avenue for therapeutic intervention for this devastating disease.

METHODS:

Animal housing

Mice, generated in a mix 129Sv/J; C57Bl/6 background, were housed in a pathogen free barrier facility in accordance with the ethic committee for animal warefare (n°APAFIS#18030-201812111250227). Mice were maintained under chow (A03, Safe) containing 22kcal% protein, 65kcal% carbohydrate and 13kcal% fat. Mice were genotyped by PCR on tail genomic DNA using Red-N extract kit (Sigma), with specific primers available upon request.

Patient material

Skin fibroblasts were isolated from Leigh syndrome patients or control individuals after their written informed consent. This work was conducted according to the Declaration of Helsinki principles.

RNA extraction and quantitative PCR

Total RNAs were isolated from various organs or from cells using TriZol Reagent (Invitrogen). cDNAs were synthesized from 500ng of total RNA using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Quantitative realtime PCR was performed on a LightCycler 480 (Roche). The relative mRNA copy number was calculated using Ct values and was normalized to *tubulin β5* mRNA levels. Primers used for RT-qPCR analyses are available upon request.

Protein extraction and western blotting

For total protein extracts, isolated brains were lysed in Laemmli buffer (80mM Tris pH=6,8, 2% SDS, 12% sucrose, 2% β-mercaptoethanol, bromophenol blue) and immunoblotting was performed using the following antibodies: homemade anti-E4F1, anti-cleaved Caspase 3 (Cell Signaling), anti-DLAT (Santa Cruz), anti-MPC1 (Santa Cruz), anti-DLD (Cell Signaling), anti-PDHE1 (Cell Signaling), anti-ELP3 (Cell Signaling), anti-ELP1 (Cell Signaling), TUBULIN (Cell Signaling) and ACTIN (Sigma).

Quantitative chromatin immunoprecipitation (qChIP) assays

For qChIP assays in cells, Mefs were incubated with 1% formaldehyde/1% paraformaldehyde for 5min. Nuclei were isolated and chromatin was extracted and sonicated (epishear, Active motif). qChIPs on the *Elp3* locus were carried out using a control irrelevant IgG or an affinity-purified rabbit anti-E4F1 polyclonal antibody, essentially as described in Rodier *et al.*[27]. Primers used for qChIP assays are available upon request.

Lentivirus production

Lentiviral particles encoding *Dlat* or *Elp3* were produced in 293T packaging cells by transient transfection using Jet-PEI reagent (Ozyme). 72hrs after transfection, viral supernatants were harvested and added on cells overnight in presence of polybrene (5µg/ml, Sigma). Antibiotic selection was performed 48 hours later after transduction with puromycin (2 µg/mL, invitrogen).

Immunohistochemistry, Immunofluorescence and histological analyses

Tissue biopsies were either fixed in 4% neutral-buffered formalin (24h) and paraffin embedded or frozen in Tissue-Tek OCT (Sakura) for cryosectioning. Paraffin-embedded tissues were sectioned and processed for immunohistochemistry (IHC) or hematoxylin and eosin (H/E) stainings. IHC was performed on 4µm sections and stained with the following antibodies: anti-GFP (Fisher), anti-MCT4 (Cell Signaling), anti-ATF4 (Cell Signaling), anti-ASNS (Cell Signaling) and anti-cleaved Caspase 3 (Cell Signaling). Revelation was performed according to the manufacturer's recommendations with secondary biotinylated anti-rat or anti-rabbit antibodies and streptavidin-peroxidase complex (ABC Vectastain kit, Vector Laboratories), and the peroxidase substrate DAB (Vector Laboratories). For immunofluorescence, Alexa488-coupled secondary antibodies were diluted at 1/1000 (Alexa-Invitrogen).

High-Resolution Episcopic Microscopy (HREM)

The samples were fixed in Bouin's fixative for 24 h minimum, then washed and stored in 70% EtOH. Fixed samples were gradually dehydrated in an increasing series of ethanol concentrations (90%, 95%, 100%, 3 h each) and were embedded in a methacrylate resin (JB-4 kit, Polysciences, Warrington, PA, USA) containing eosin and acridin orange as contrasts agents. All embryos were oriented sagittally in the mold. Embryos from E14.5 and E16.5 stages were sectioned to generate 7-µm-thick sections. 2-D raw data were imported into Avizo visualization software (Version 9.4.0, Thermofisher Scientific, Bordeaux, France) for volumetric visualization, segmentation, and quantitative analysis. No realignment of images was necessary due to the precise positioning of the block after each section. Each dataset was subsampled in Avizo to obtain cubic voxels, allowing orthogonal and oblique views of the tissue sample. Automatic segmentation was performed using the Watershed algorithm. After segmentation, the Avizo software generated a mask that allowed us to obtain the quantitative data.

Statistical analysis

Statistical significance was evaluated using two-sided non-parametric Mann-Whitney U tests P values inferior to 0.05 were considered as statistically significant.

REFERENCES

1- Management of Leigh syndrome: Current status and new insights. Chen L, Cui Y, Jiang D, Ma CY, Tse HF, Hwu WL, Lian Q. Clin Genet. 2018 Jun;93(6):1131-1140.

2- Leigh Syndrome: A Tale of Two Genomes. Bakare AB, Lesnefsky EJ, Iyer S. Front Physiol. 2021 Aug 11;12:693734.

3- New genes and pathomechanisms in mitochondrial disorders unraveled by NGS technologies. Legati A, Reyes A, Nasca A, Invernizzi F, Lamantea E, Tiranti V, Garavaglia B, Lamperti C, Ardissone A, Moroni I, Robinson A, Ghezzi D, Zeviani M. Biochim Biophys Acta. 2016 Aug;1857(8):1326-1335.

4- Identification of an E1A-inducible cellular factor that interacts with regulatory sequences within the adenovirus E4 promoter. Raychaudhuri P, Rooney R, Nevins JR. EMBO J. 1987 Dec 20;6(13):4073-81.

5- E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. Le Cam L, Linares LK, Paul C, Julien E, Lacroix M, Hatchi E, Triboulet R, Bossis G, Shmueli A, Rodriguez MS, Coux O, Sardet C. Cell. 2006 Nov 17;127(4):775-88.

6- Association of p14ARF with the p120E4F transcriptional repressor enhances cell cycle inhibition. Rizos H, Diefenbach E, Badhwar P, Woodruff S, Becker TM, Rooney RJ, Kefford RF. J Biol Chem. 2003 Feb 14;278(7):4981-9.

7- pRB binds to and modulates the transrepressing activity of the E1A-regulated transcription factor p120E4F. Fajas L, Paul C, Zugasti O, Le Cam L, Polanowska J, Fabbrizio E, Medema R, Vignais ML, Sardet C. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jul 5;97(14):7738-43.

8- Cyclin A is a mediator of p120E4F-dependent cell cycle arrest in G1. Fajas L, Paul C, Vié A, Estrach S, Medema R, Blanchard JM, Sardet C, Vignais ML. Mol Cell Biol. 2001 Apr;21(8):2956-66.

9- E4F1 controls a transcriptional program essential for pyruvate dehydrogenase activity. Lacroix M, Rodier G, Kirsh O, Houles T, Delpech H, Seyran B, Gayte L, Casas F, Pessemesse L, Heuillet M, Bellvert F, Portais JC, Berthet C, Bernex F, Brivet M, Boutron A, Le Cam L, Sardet C. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Sep 27;113(39):10998-1003.

10- E4F1-mediated control of pyruvate dehydrogenase activity is essential for skin homeostasis. Goguet-Rubio P, Seyran B, Gayte L, Bernex F, Sutter A, Delpech H, Linares LK, Riscal R, Repond C, Rodier G, Kirsh O, Touhami J, Noel J, Vincent C, Pirot N, Pavlovic G, Herault Y, Sitbon M, Pellerin L, Sardet C, Lacroix M, Le Cam L. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Sep 27;113(39):11004-9.

11- The transcription factor E4F1 coordinates CHK1-dependent checkpoint and mitochondrial functions. Rodier G, Kirsh O, Baraibar M, Houlès T, Lacroix M, Delpech H, Hatchi E, Arnould S, Severac D, Dubois E, Caramel J, Julien E, Friguet B, Le Cam L, Sardet C. Cell Rep. 2015 Apr 14;11(2):220-33.

12- The Elongator subunit Elp3 is a non-canonical tRNA acetyltransferase. Lin TY, Abbassi NEH, Zakrzewski K, Chramiec-Głąbik A, Jemioła-Rzemińska M, Różycki J, Glatt S. Nat Commun. 2019 Feb 7;10(1):625.

13- A Dynamic Unfolded Protein Response Contributes to the Control of Cortical Neurogenesis. Laguesse S, Creppe C, Nedialkova DD, Prévot PP, Borgs L, Huysseune S, Franco B, Duysens G, Krusy N, Lee G, Thelen N, Thiry M, Close P, Chariot A, Malgrange B, Leidel SA, Godin JD, Nguyen L. Dev Cell. 2015 Dec 7;35(5):553-567.

14- Transcription factor E4F1 is essential for epidermal stem cell maintenance and skin homeostasis. Lacroix M, Caramel J, Goguet-Rubio P, Linares LK, Estrach S, Hatchi E, Rodier G, Lledo G, de Bettignies C, Thépot A, Deraison C, Chébli K, Hovnanian A, Hainaut P, Dubus P, Sardet C, Le Cam L. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Dec 7;107(49):21076-81.

15-The E4F protein is required for mitotic progression during embryonic cell cycles. Le Cam L, Lacroix M, Ciemerych MA, Sardet C, Sicinski P. Mol Cell Biol. 2004 Jul;24(14):6467-75.

16- Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G. Nat Genet. 1999 Sep;23(1):99-103.

17- Description of an optimized ChIP-seq analysis pipeline dedicated to genome wide identification of E4F1 binding sites in primary and transformed MEFs. Houlès T, Rodier G, Le Cam L, Sardet C, Kirsh O. Genom Data. 2015 Jul 14;5:368-70.

18- Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, Gillard M, Close P, Malaise O, Laguesse S, Cornez I, Rahmouni S, Ormenese S, Belachew S, Malgrange B, Chapelle JP, Siebenlist U, Moonen G, Chariot A, Nguyen L. Cell. 2009 Feb 6;136(3):551-64.

19- Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. Winkler GS, Kristjuhan A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19;99(6):3517-22.

20- Metabolism and the Epigenome: A Dynamic Relationship. Haws SA, Leech CM, Denu JM. Trends Biochem Sci. 2020 Sep;45(9):731-747.

21- Metabolic Regulation of the Epitranscriptome. Thomas JM, Batista PJ, Meier JL. ACS Chem Biol. 2019 Mar 15;14(3):316-324.

22- Tetracyclines promote survival and fitness in mitochondrial disease models. Perry EA, Bennett CF, Luo C, Balsa E, Jedrychowski M, O'Malley KE, Latorre-Muro P, Ladley RP, Reda K, Wright PM, Gygi SP, Myers AG, Puigserver P. Nat Metab. 2021 Jan;3(1):33-42.

23- mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. Johnson SC, Yanos ME, Kayser EB, Quintana A, Sangesland M, Castanza A, Uhde L, Hui J, Wall VZ, Gagnidze A, Oh K, Wasko BM, Ramos FJ, Palmiter RD, Rabinovitch PS, Morgan PG, Sedensky MM, Kaeberlein M. Science. 2013 Dec 20;342(6165):1524-8.

24- Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. Jain IH, Zazzeron L, Goli R, Alexa K, Schatzman-Bone S, Dhillon H, Goldberger O, Peng J, Shalem O, Sanjana NE, Zhang F, Goessling W, Zapol WM, Mootha VK. Science. 2016 Apr 1;352(6281):54-61.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, R18069FF), the Ligue contre le Cancer (équipe labélisée) and with the institutional support of INSERM. We are grateful for the technical support of the Montpellier Rio Imaging (MRI), the histopathology (RHEM) and animal (RAM) facilities. We thank members of the LLC team for critical reading of the manuscript. MDM and CDB were supported by fellowships from the laboratory of Excellence (LABEX, grant ANR R18069FF).

Author Contributions

MDM, ML, DA, NL, CS, LLC designed the experiments and analyzed, discussed, and interpreted the data. MDM, MR, ML, CDB, RL, TA, FFX, CT, EB, DP, MAH, CV, AF, HC, performed the in vivo experiments. MDM, CDB, ML, MF, RG, HM, DA performed the in vitro experiments. JG performed the computational analysis of RNA-seq data. FB, BY, EB, FPC, CC, PN, SGT performed the histological study. AL, LE, DG provided fibroblasts from Leigh syndrome patients. MDM, ML and LLC wrote the manuscript. All authors gave a final approval of the submitted manuscript.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Characterization of genetically engineered mice lacking E4F1 in the central nervous system (CNS). A. Immunohistochemistry (IHC) analysis of the GFP reporter on brain saggital sections prepared from E14.5, E16.5 and E18.5 *E4f1*$^{-/flox}$*; NestinCre*$^{+/tg}$*; ROSAmTmG*$^{+/KI}$ (*E4f1*$^{(Nes)KO}$) and control *E4f1*$^{+/flox}$*; NestinCre*$^{+/tg}$*; ROSAmTmG*$^{+/KI}$ (*CTL*$^{(Nes)}$) embryos. **B.** RT-qPCR analysis of *E4f1* mRNA levels in tissues of E18.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos (mean ± SEM, n=5). **C.** Quantitative immunoblot analysis of E4F1 and ACTIN (loading control) protein levels in the brain of E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$) embryos. Histobars represent the quantification of these immunoblots performed on n=4 independent samples for each genotype. **D.** The table indicates the expected and measured numbers of embryos of the indicated genotype at different developmental stages. **E.** Analysis of brain lesions in E14.5 and E16.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos by High Resolution Episcopic Microscopy (HREM). Histobars represent the volume of the neuroepithelium tissue and of brain ventricules for the indicated genotype at E14.5 and E16.5 (mean ± SEM, n=3). **F.** Images show 3D volume reconstructions of different areas of the brain (forebrain in red, hindbrain in green, telencephalon in blue) and of ventricules (1st ventricule in purple, 2nd ventricule in brown and 4th ventricule in red) of *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ littermates using serial sections of the entire brain. **p<0,01; *p<0,05; ns, not significant.

Figure 2. E4F1 plays a critical role in corticogenesis during mouse embryonic development. A. Immunoblot analysis of cleaved-Caspase 3 (CASP3) and ACTIN (ACT, loading control) protein levels in the brain of E14.5, E16.5 and E18.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. **B.** IHC analysis of cleaved-Caspase 3 stainings in brain saggital sections prepared from E14.5, E16.5 and E18.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. Insets show images at higher maginification of the forebrain neuroepithelium. Scale bars, 200 µm. **C.** Histobars represent the quantification of these stainings (number of positive cells per surface area) in different regions of the brain (mean ± SEM, n=5). **D.** Schematic representation of neuronal cell differentiation. **E.** Immunofluorescene analysis of apical (SOX2 positive), intermediate (TBR2

positive) neuronal progenitors, well differentiated neurons (TBR1 positive), cleaved-Caspase 3 (CASP3) and Ki67 positive cells in brain coronal sections prepared from E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. Histobars represent the quantification of SOX2-, TBR2-, TBR1-, CASP3- and Ki67-positive cells (mean ± SEM, n=3 with 100 cells analyzed in each experiment). ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns, not significant.

Figure 3. Expression profiling of E4F1-deficient brains. A. Expression profiling by RNA-seq of brains prepared from E14.5, *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos (n=3 for each genotype). The heatmap represents the relative expression of the top 35 differentially expressed genes. **B.** Volcano plot of differentially expressed genes in E14.5, *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos. **C.** The mRNA levels of a subset of E4F1 direct target genes (*E4f1*, Ndufs5, *Dnajc19*, *Taz, Wdr7*) were determined by RT-qPCR analysis in total RNAs prepared from the the forebrain of E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos (mean ± SEM, n=5). **D.** Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to evaluate changes in E4F1 target genes in E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos. The normalized enrichment scores (NES), and false discovery rates (FDRs) are indicated in the GSEA plot. **E.** Top 10 gene set enrichment analysis (GSEA) plots in mouse embryo brains at E14.5. **F.** Gene set enrichment analysis (GSEA) of the Endoplasmic Reticulum (ER) stress signature in E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos. The normalized enrichment scores (NES), and false discovery rates (FDRs) are indicated in the GSEA plot. ***p<0,001; ns, not significant.

Figure 4. E4F1 regulates pyruvate metabolism in neurons. A. The mRNA levels of genes encoding key subunits or regulators of the pyruvate dehydrogenase complex (PDC) (*Dlat*, *Dld*, *Pdhe1*, *Mpc1*, *Slc25a19*, *Pdpr*) were determined by RT-qPCR analysis using total RNAs prepared from forebrains of E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos (mean ± SEM, n=5). **B.** Immunoblot analysis of E4F1, DLAT, DLD, PDHE1, MPC1 and ACTIN (loading control) protein levels in the brain of E18.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. Histobars represent the quantification of these immunoblots (mean ± SEM, n=4). **C.** PDH activity was measured in protein extracts prepared from E18.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos (mean ± SEM, n=5).

D. Circulating lactate levels in E18.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos (mean ± SEM, n=40). **E.** Immunofluorescence analysis of MCT4 transporter on brain saggital sections prepared from E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and control *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. ***p<0,001; *p<0,05; ns, not significant.

Figure 5. E4F1 controls the Elongator complex and tRNA editing in neurons. A. E4F1 ChIP-Seq read densities on *Elp3* promoter in mouse ES cells (mES) and *p53*^{KO};*Ha-Ras*^{V12} transformed MEFs (tMEFs). The E4F1 consensus motif determined by MEME is shown on the top. **B.** E4F1 chromatin-immunoprecipitation on *Elp3* promoter in N2A cells. Results are represented as the relative ratio between the mean value of immunoprecipitated chromatin (calculated as a percentage of the input) with the anti-E4F1 antibody and the one obtained with a control irrelevant antibody (mean value ± SEM, n = 3). **C.** Relative mRNA levels of genes encoding key subunits of the Elongator complex (*Elp1*, *Elp2*, *Elp3*, *Elp4*) were determined by RT-qPCR analysis using total RNAs prepared from forebrains of E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos (mean ± SEM, n=5). **D.** Immunoblot analysis of ELP1, ELP3 and ACTIN (loading control) protein levels in the brain of E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. **E.** Schematic representation of the different tRNAs modifications initiated by Elongator-mediated acetylation of the wooble uridine U_{34}. **F.** Liquid-chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MSMS) analysis of 5-carbamoylmethyl uridine (ncm^{5}U) and 5-methoxy-carbonyl-methyl-2-thio uridine (mcm^{5}s^{2}U), and of the m3C and Gm tRNA modifications that are unrelated to the Elongator complex in the brain of E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. The relative abundance of these tRNA modifications was normalized to the total amount of Uridine, Cytosine and Guanine respectively (mean ± SEM, n=5). **G.** Relative mRNA levels of genes involved in the ER stress / UPR in the forebrain of E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos (mean ± SEM, n=5). **H.** IHC analysis of ATF4 on brain saggital sections prepared from E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and control *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. **I.** Immunofluorescence analysis of ASNS on brain saggital sections prepared from E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and control *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns, not significant.

Figure 6. E4F1 coordinates AcCoA production by the PDC and its utilization by the Elongator complex. A. Relative mRNA levels of *E4f1*, *Dlat* and *Elp3* genes were determined by RT-qPCR analysis using total RNAs prepared from *CTL* and *E4f1*^{cKO} Mefs. (mean ± SEM, n=4). **B.** Immunoblot analysis of E4F1, DLAT, ELP3 and TUBULIN (loading control) protein levels in *CTL* and *E4f1*^{cKO} Mefs. Histobars represent the quantification of these immunoblots (mean ± SEM, n=4). **C.** LC-MSMS analysis of 5-carbamoylmethyl uridine (ncm^{5}U) and 5-methoxy-carbonyl-methyl-2-thio uridine (mcm^{5}s^{2}U), and Um tRNA modifications in *CTL* and *E4f1*^{cKO} Mefs. The relative abundance of these tRNA modifications was normalized to the total amount of Uridine (mean ± SEM, n=4). **D.** Schematic representation of ^{13}C incorporation from [U-^{13}C]-AcCoA into the wooble uridine of tRNAs by the elongator complex. **E.** Stable isotope tracing experiments in Mefs treated for 16 hours with DMSO or the MPC1 inhibitor UK-5099 (50uM) cultured for the last 6 hours in the presence of uniformly labelled [U-^{13}C]-pyruvate. LC–MSMS was used to detect the relative amounts of the ^{13}C-labelled M+2 isotopologs of ncm^{5}U and mcm^{5}s^{2}U. The relative abundance of these tRNA modifications was normalized to the total amount of Uridine (mean ± SEM, n=2). **F.** Immunoblot analysis of PDHE1, ELP3 and TUBULIN (loading control) protein levels in two independant populations of Mefs (1 and 2) transduced with two different ShRNAs directed against *PdhA1* mRNA. Histobars represent the quantification of these immunoblots (mean ± SEM, n=4). **G.** Immunoblot analysis of ELP3 and ACTIN (loading control) protein levels in dermal fibroblasts of heathy donor or Leigh patients harboring PDHA1, SURF1, NDUFS6 or E4F1 mutations. **H.** Immunoblot analysis of ELP3 and ACTIN (loading control) protein levels in dermal fibroblasts of Leigh patients harboring PDHA1 mutation transduced with lentiviral particles encoding the PDHE1 subunit. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns, not significant.

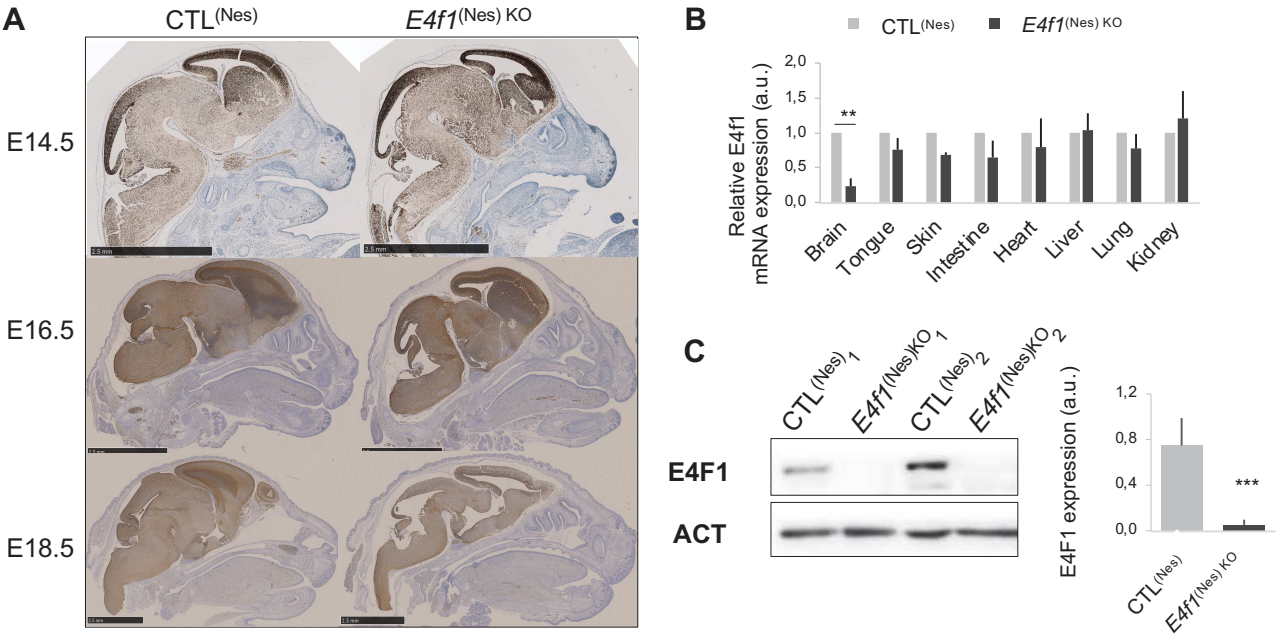
Supplemental Figure S1. A. Schematic representation of crosses to generate CNS specific *E4f1*$^{(Nestin\text{-}cre)KO}$ mice. **B.** Immunohistochemistry (IHC) analysis of the GFP reporter on whole E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and control *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. **C.** Macroscopical picture of whole E18.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and control *CTL*$^{(Nes)}$ embryos showing no major morphological abnormalities. **D.** Weight of *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and control *CTL*$^{(Nes)}$ embryos at different embryonic developmental stage. E. Width and Length of brain from E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and control *CTL*$^{(Nes)}$ embryos (n=19WT and n=13KO). **p<0,01; ns, not significant.

Supplemental Figure S2. A. Analysis of brain lesions in E14.5 and E16.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos by High Resolution Episcopic Microscopy (HREM). Histobars represent the volume of the neuroepithelium tissue and of brain ventricules for the indicated genotype at E14.5 and E16.5 (mean ± SEM, n=3). **B.** 3D reconstruction by HREM analysis of neural tissue (green : telencephalon and diencephalon, blue: midbrain, red: hindbrain) and ventricular system (yellow: lateral ventricle, pink: third ventricle, orange: mesencephalic vesicle, red: fourth ventricle) at E14.5 (n=3). Scale bar = 25 units. **C.** Microphotographs of H&E-stained sections of saggital brain sections prepared from representative E14.5 and E16.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. Green and red insets show higher magnification of the neuroepithelium in the forebrain and the telencephalon, respectively. Scale bars, 200 µm. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns, not significant.

Supplemental Figure S3. A. List of the top 20 differentially expressed genes in E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ embryos with a fold change superior to 1.4 and with a False Discovery Rate (FDR) inferior to 0,05. Genes in green are E4F1 target genes, and genes in pink are genes associated to the UPR/ISR stress response. **B.** Gene set enrichment analysis (GSEA) in mouse embryo brains at E14.5 (NES: normalized enrichment score). **C.** Relative mRNA levels of E4f1, Dnajc19, Ndufs5, Dlat, Dld, Pdpr, Mpc1 and PdhA1 were determined by RT-qPCR analysis using total RNAs prepared from the entire brain of E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos (mean ± SEM, n=5). ***p<0,001; *p<0,05; ns, not significant.

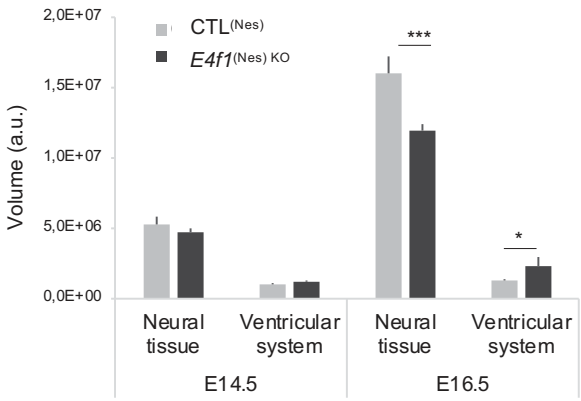
Supplemental Figure S4. A. Relative mRNA levels of genes encoding key subunits of the Elongator complex (*Elp1*, *Elp2*, *Elp3*, *Elp4*) were determined by RT-qPCR analysis using RNAs prepared from total brain of *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos at different embryonic developmenta stage (mean ± SEM, n=5). **B.** Aminoacyl tRNA levels in brain of *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos at E14.5 measured by RT-qPCR (n=5). **C.** Immunoblot analysis of E4F1, Acetyl-alpha-Tubulin, alpha-Tubulin, acetylated histone H3 on lysine 14 (H3K14), total H3 and ACTIN (loading control) protein levels in the brain of E14.5 *E4f1*$^{(Nes)KO}$ and *CTL*$^{(Nes)}$ embryos. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns, not significant.

Figure 1



D

		Number of mouse embryos	
		Expected (%)	Observed (%)
E14.5	CTL (Nes)	205 (75)	182 (67)
	E4f1 (Nes)KO	68 (25)	91 (33)
E16.5	CTL (Nes)	159 (75)	151 (71)
	E4f1 (Nes)KO	53 (25)	61 (29)
E18.5	CTL (Nes)	166 (75)	153 (69)
	E4f1 (Nes)KO	55 (25)	68 (31)
P1	CTL (Nes)	54 (75)	72 (100)
	E4f1 (Nes)KO	18 (25)	0 (0)



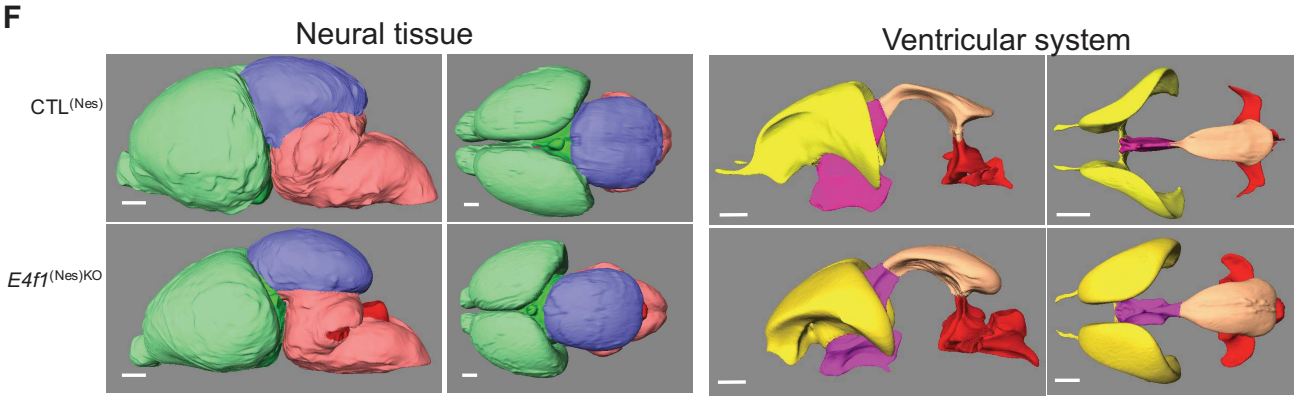


Figure 2

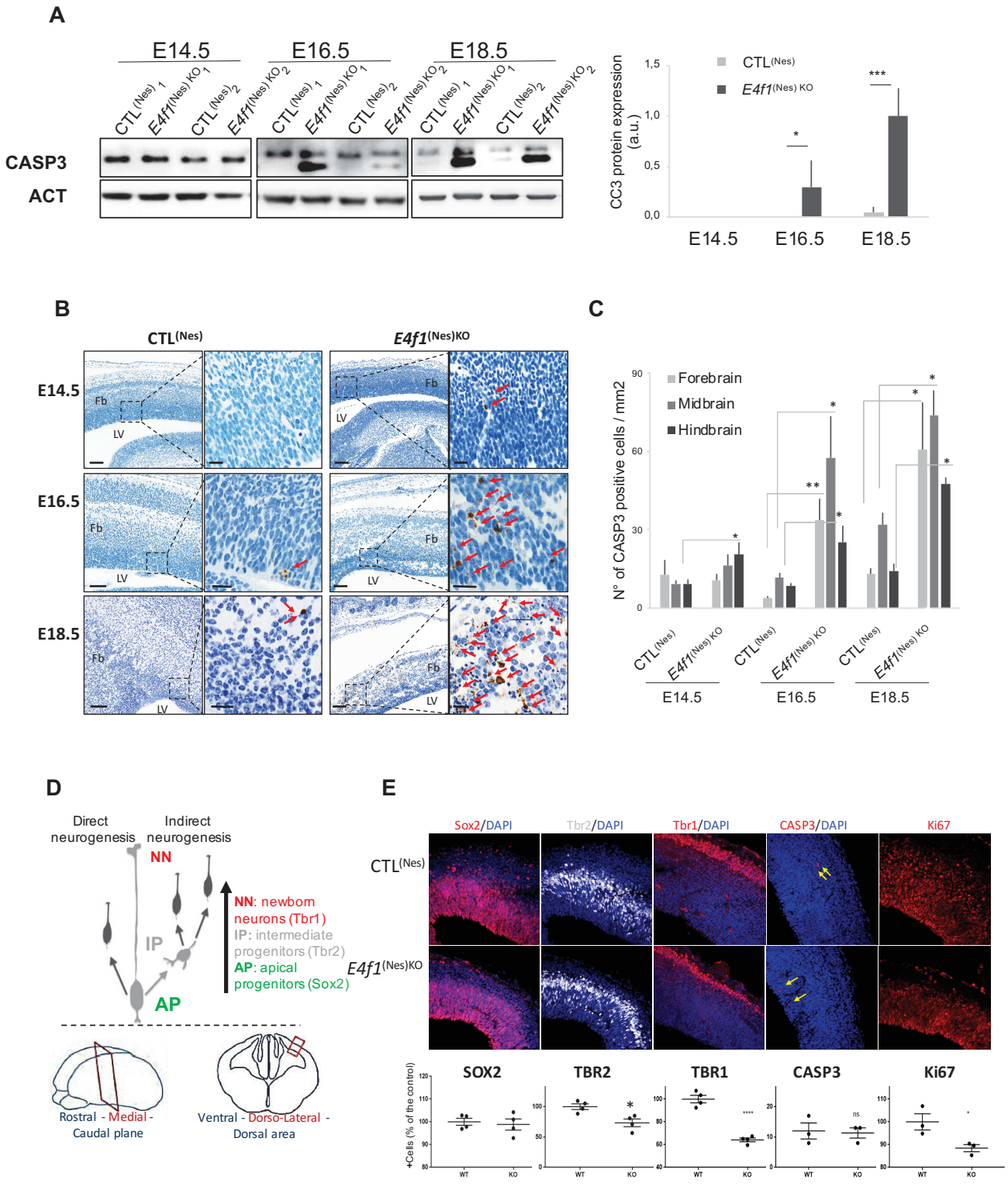

A
E14.5
E16.5
E18.5
CTL (Nes) 1
E4f1(Nes) KO 1
CTL (Nes)2
E4f1(Nes) KO 2
CASP3
ACT
CC3 protein expression (a.u.)
CTL(Nes)
E4f1(Nes) KO
B
CTL(Nes)
E4f1(Nes)KO
Fb
LV
C
N° of CASP3 positive cells / mm2
Forebrain
Midbrain
Hindbrain
D
Direct neurogenesis
Indirect neurogenesis
NN
IP
AP
NN: newborn neurons (Tbr1)
IP: intermediate progenitors (Tbr2)
AP: apical progenitors (Sox2)
Rostral - Medial - Caudal plane
Ventral - Dorso-Lateral - Dorsal area
E
Sox2/DAPI
Tbr2/DAPI
Tbr1/DAPI
CASP3/DAPI
Ki67
SOX2
TBR2
TBR1
CASP3
Ki67
+Cells (% of the control)
WT
KO

Figure 3

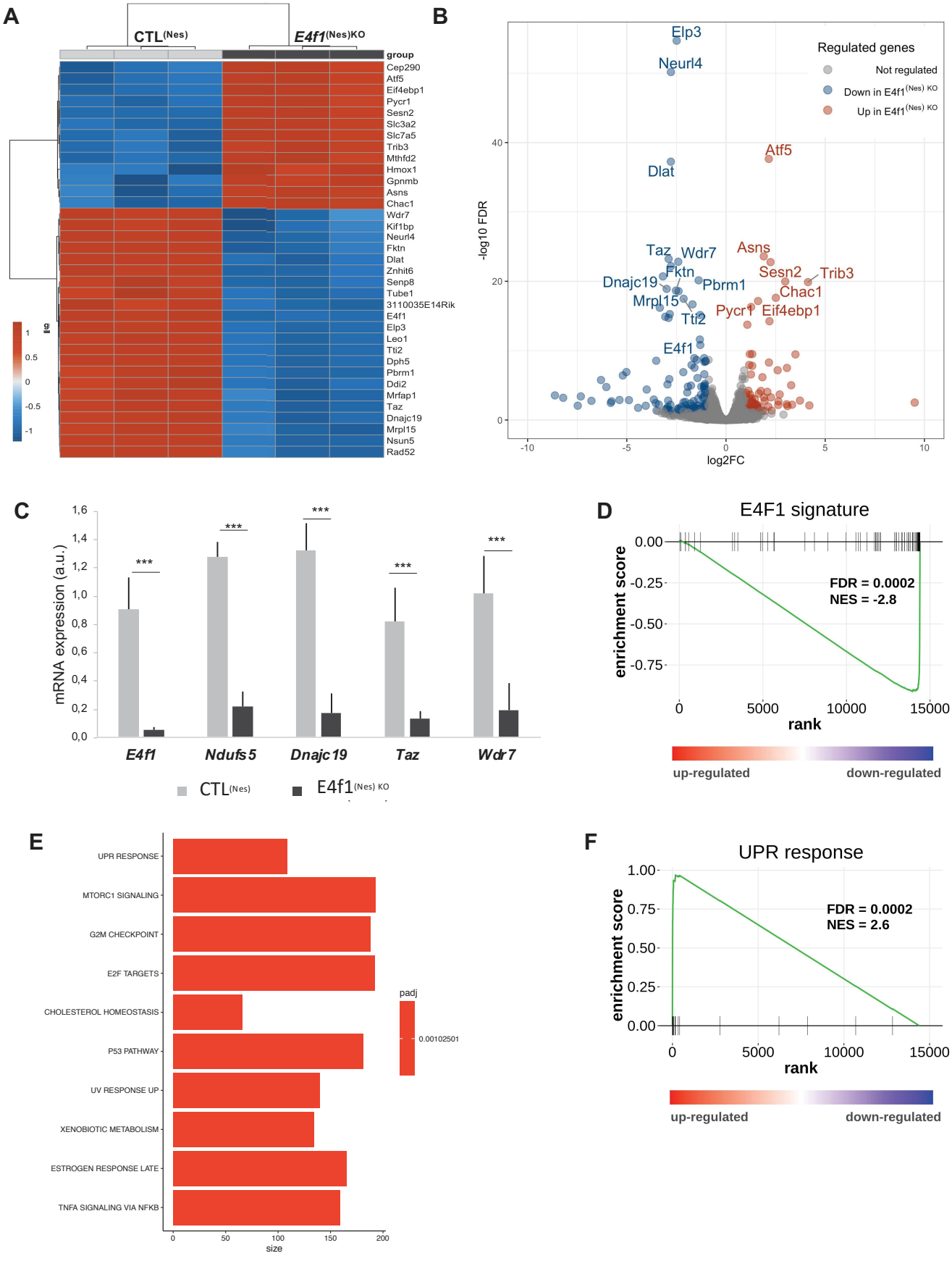

A
CTL(Nes)
E4f1(Nes)KO
group
Cep290
Atf5
Eif4ebp1
Pycr1
Sesn2
Slc3a2
Slc7a5
Trib3
Mthfd2
Hmox1
Gpnmb
Asns
Chac1
Wdr7
Kif1bp
Neurl4
Fktn
Dlat
Znhit6
Senp8
Tube1
3110035E14Rik
E4f1
Elp3
Leo1
Tti2
Dph5
Pbrm1
Ddi2
Mrfap1
Taz
Dnajc19
Mrpl15
Nsun5
Rad52
B
Regulated genes
Not regulated
Down in E4f1(Nes) KO
Up in E4f1(Nes) KO
-log10 FDR
log2FC
C
mRNA expression (a.u.)
E4f1
Ndufs5
Dnajc19
Taz
Wdr7
CTL(Nes)
E4f1(Nes) KO
D
E4F1 signature
enrichment score
FDR = 0.0002
NES = -2.8
rank
up-regulated
down-regulated
E
UPR RESPONSE
MTORC1 SIGNALING
G2M CHECKPOINT
E2F TARGETS
CHOLESTEROL HOMEOSTASIS
P53 PATHWAY
UV RESPONSE UP
XENOBIOTIC METABOLISM
ESTROGEN RESPONSE LATE
TNFA SIGNALING VIA NFKB
padj
0.00102501
size
F
UPR response
enrichment score
FDR = 0.0002
NES = 2.6
rank
up-regulated
down-regulated

Figure 4

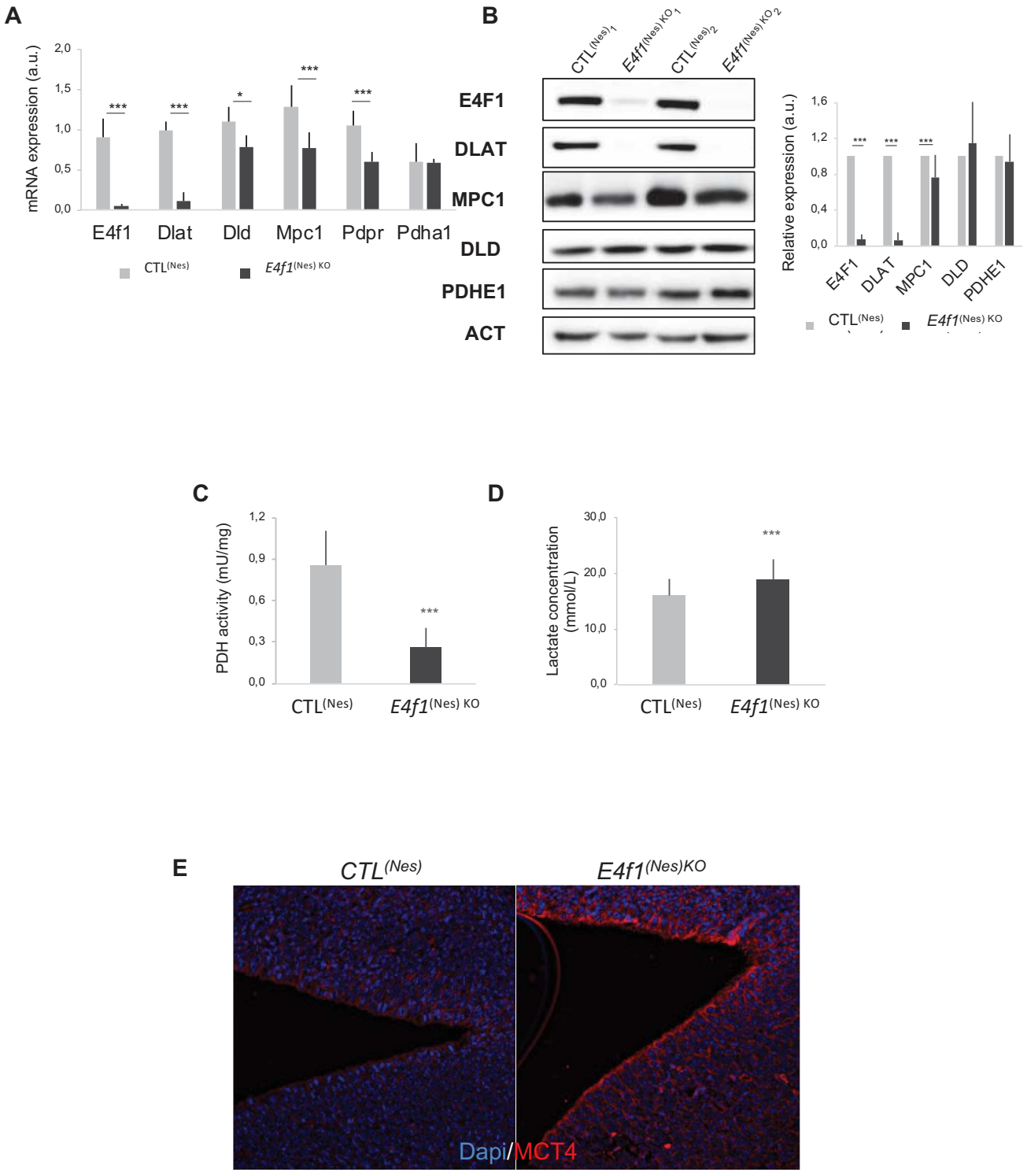

A
mRNA expression (a.u.)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
***
***
*
***
***
E4f1
Dlat
Dld
Mpc1
Pdpr
Pdha1
CTL(Nes)
E4f1(Nes) KO
B
CTL(Nes)1
E4f1(Nes) KO 1
CTL(Nes)2
E4f1(Nes) KO 2
E4F1
DLAT
MPC1
DLD
PDHE1
ACT
Relative expression (a.u.)
1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
E4F1
DLAT
MPC1
DLD
PDHE1
CTL(Nes)
E4f1(Nes) KO
C
PDH activity (mU/mg)
1,2
0,9
0,6
0,3
0,0
***
CTL(Nes)
E4f1(Nes) KO
D
Lactate concentration (mmol/L)
30,0
20,0
10,0
0,0
***
CTL(Nes)
E4f1(Nes) KO
E
CTL(Nes)
E4f1(Nes)KO
Dapi/MCT4

Figure 5

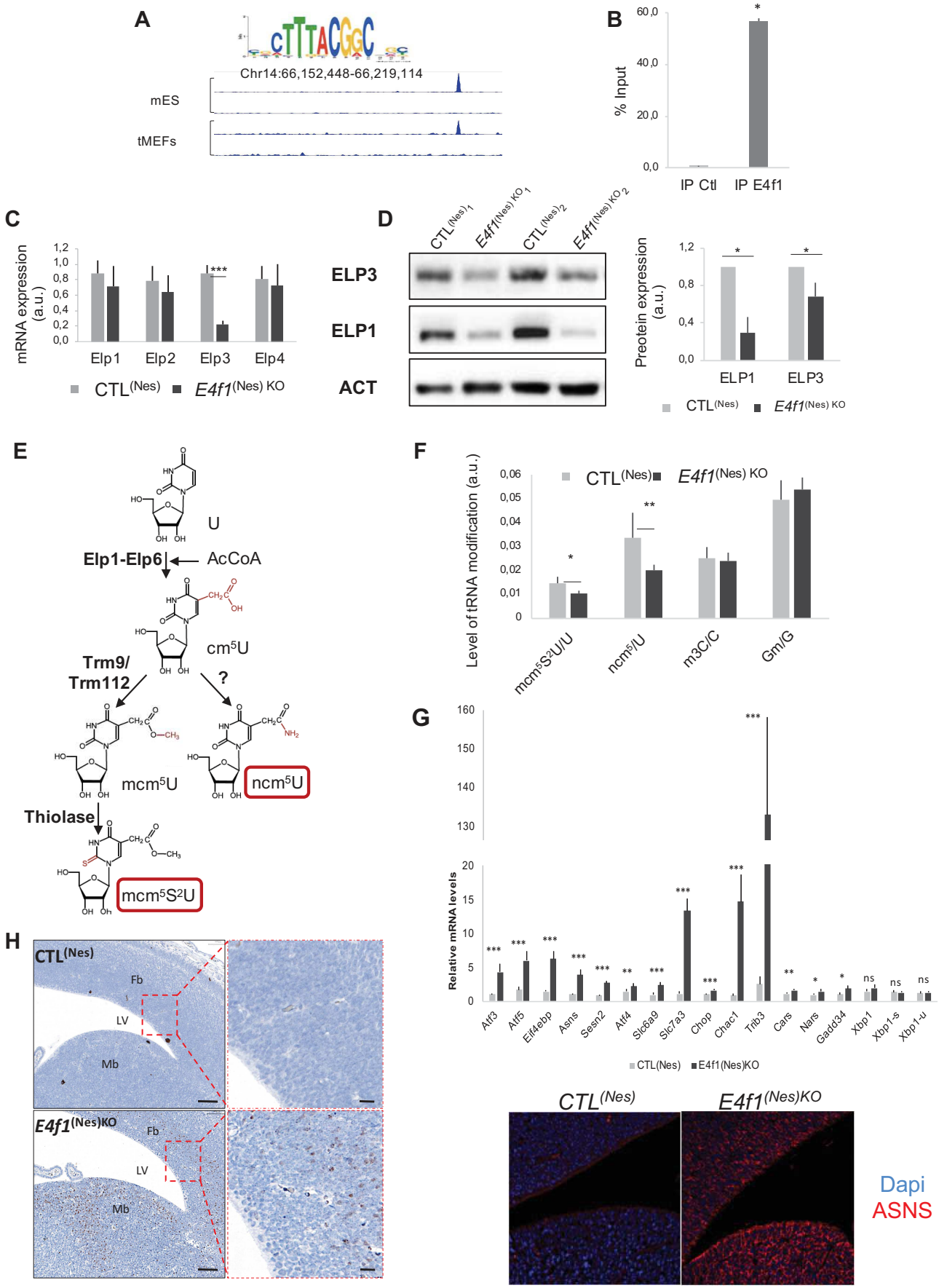
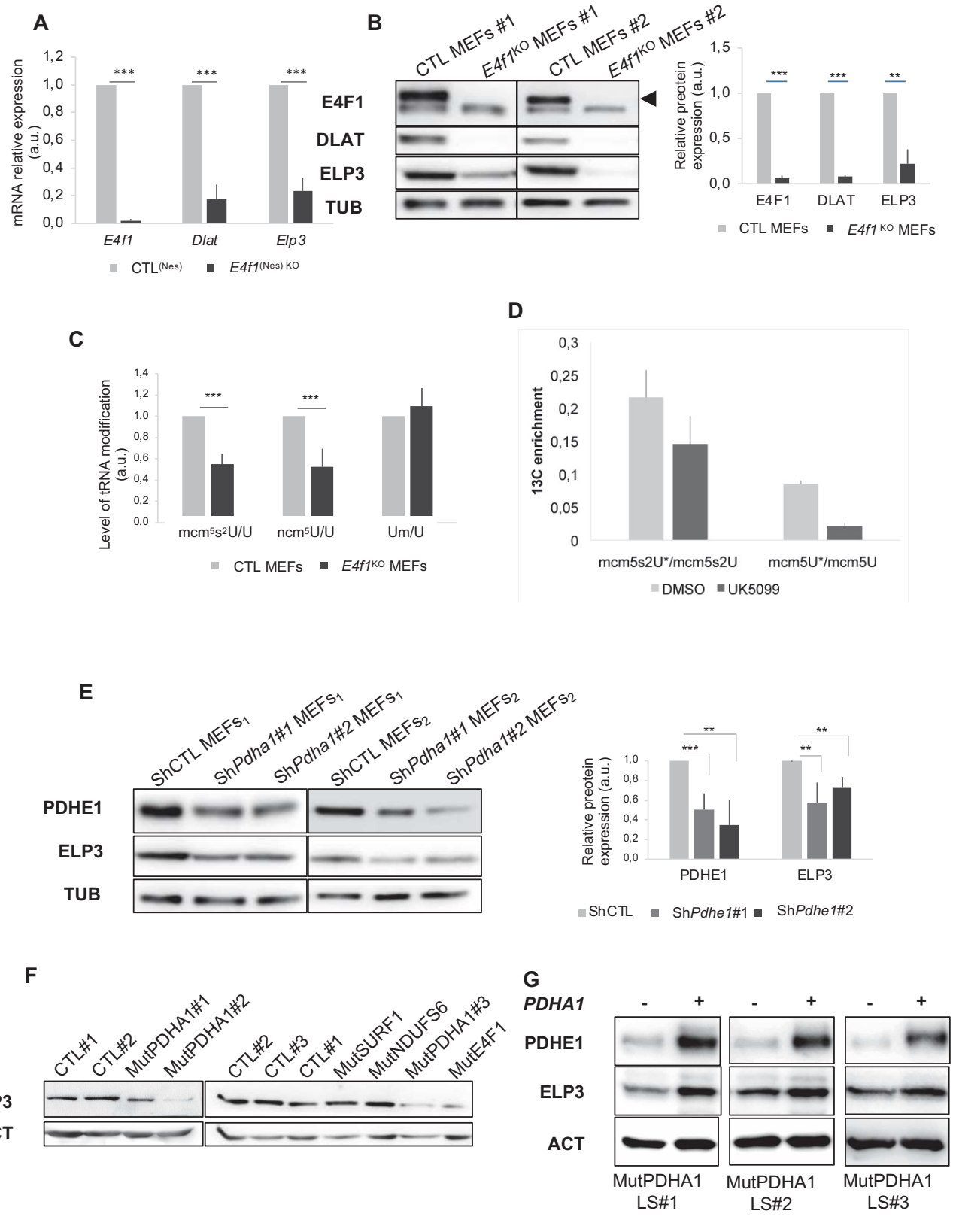
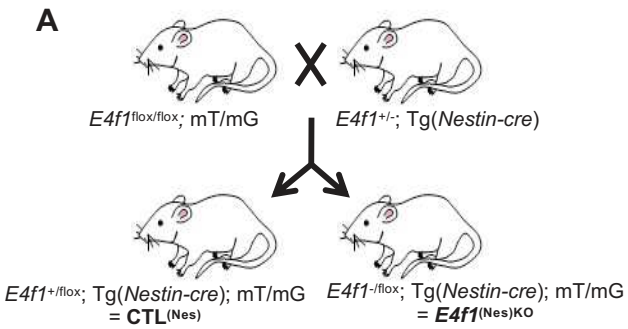
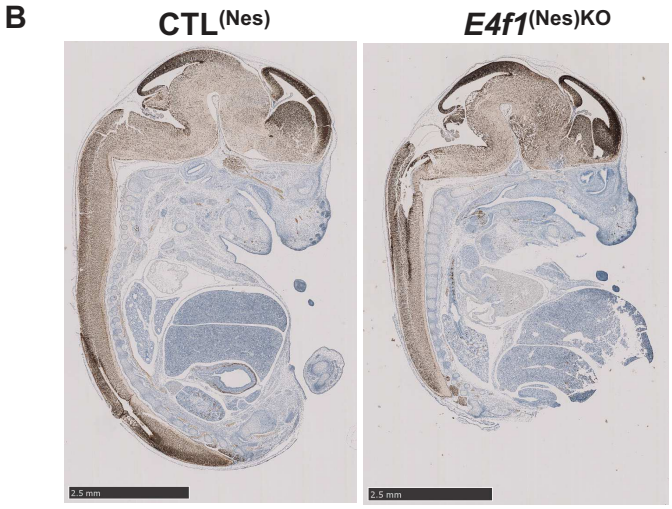

A
Chr14:66,152,448-66,219,114
mES
tMEFs
B
% Input
IP Ctl
IP E4f1
C
mRNA expression (a.u.)
Elp1
Elp2
Elp3
Elp4
CTL(Nes)
E4f1(Nes) KO
D
ELP3
ELP1
ACT
Preotein expression (a.u.)
ELP1
ELP3
E
U
Elp1-Elp6
AcCoA
cm5U
Trm9/ Trm112
?
mcm5U
ncm5U
Thiolase
mcm5S2U
F
Level of tRNA modification (a.u.)
mcm5S2U/U
ncm5U
m3C/C
Gm/G
G
Relative mRNA levels
Atf3
Atf5
Eif4ebp
Asns
Sesn2
Atf4
Slc6a9
Slc7a3
Chop
Chac1
Trib3
Cars
Nars
Gadd34
Xbp1
Xbp1-s
Xbp1-u
CTL(Nes)
E4f1(Nes)KO
H
CTL(Nes)
E4f1(Nes)KO
Fb
LV
Mb
Dapi
ASNS

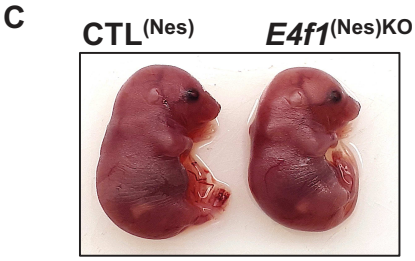
Figure 6


A
mRNA relative expression (a.u.)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
***
E4f1
Dlat
Elp3
CTL(Nes)
E4f1(Nes) KO
B
CTL MEFs #1
E4f1KO MEFs #1
CTL MEFs #2
E4f1KO MEFs #2
E4F1
DLAT
ELP3
TUB
Relative preotein expression (a.u.)
1,5
1,0
0,5
0,0
**
E4F1
DLAT
ELP3
CTL MEFs
E4f1 KO MEFs
C
Level of tRNA modification (a.u.)
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
mcm5s2U/U
ncm5U/U
Um/U
CTL MEFs
E4f1KO MEFs
D
13C enrichment
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
mcm5s2U*/mcm5s2U
mcm5U*/mcm5U
DMSO
UK5099
E
ShCTL MEFs1
ShPdha1#1 MEFs1
ShPdha1#2 MEFs1
ShCTL MEFs2
ShPdha1#1 MEFs2
ShPdha1#2 MEFs2
PDHE1
ELP3
TUB
Relative preotein expression (a.u.)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
PDHE1
ELP3
ShCTL
ShPdhe1#1
ShPdhe1#2
F
CTL#1
CTL#2
MutPDHA1#1
MutPDHA1#2
CTL#2
CTL#3
CTL#1
MutSURF1
MutNDUFS6
MutPDHA1#3
MutE4F1
ELP3
ACT
G
PDHA1
PDHE1
ELP3
ACT
MutPDHA1 LS#1
MutPDHA1 LS#2
MutPDHA1 LS#3

Supplemental Figure S1

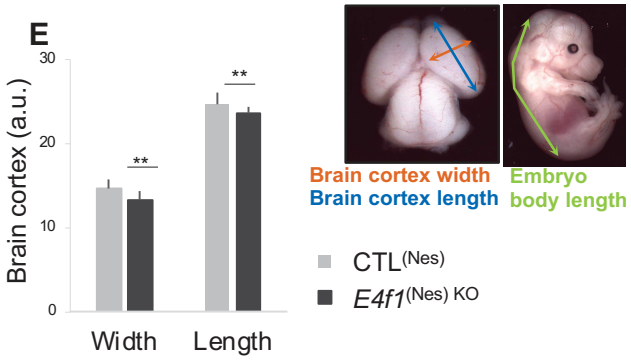




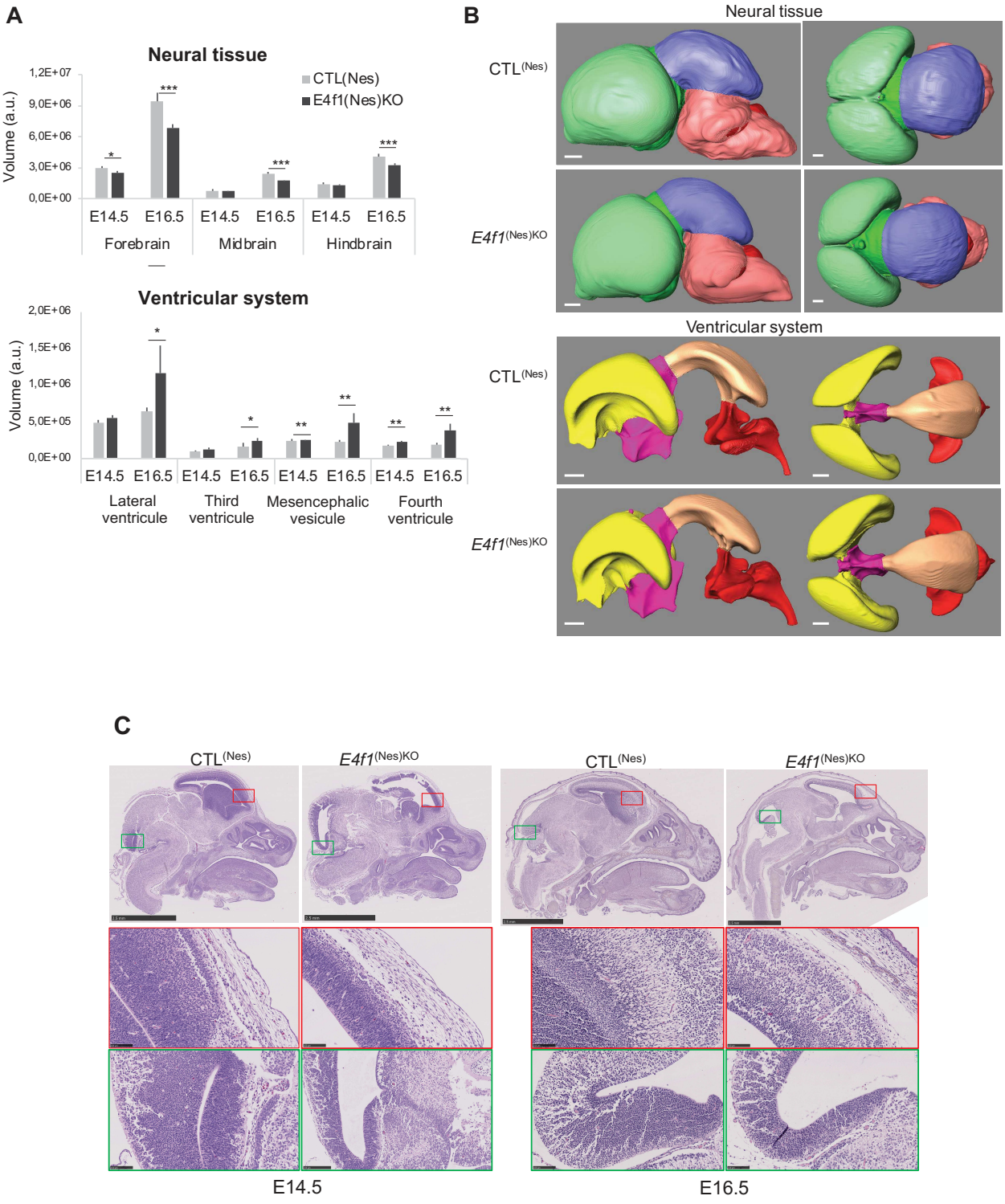


D

		Embryo weight (mg)	Embryo (n)
E14.5	CTL(Nes)	315.1 +/- 112.1	42
	E4f1 (Nes)KO	320.5 +/- 105.7	42
E16.5	CTL(Nes)	634.5 +/- 57.2	23
	E4f1 (Nes)KO	643.2 +/- 98.7	14
E18.5	CTL(Nes)	1230.9 +/- 126.2	32
	E4f1 (Nes)KO	1299.0 +/- 157.7	22



Supplemental Figure S2



Supplemental Figure S1

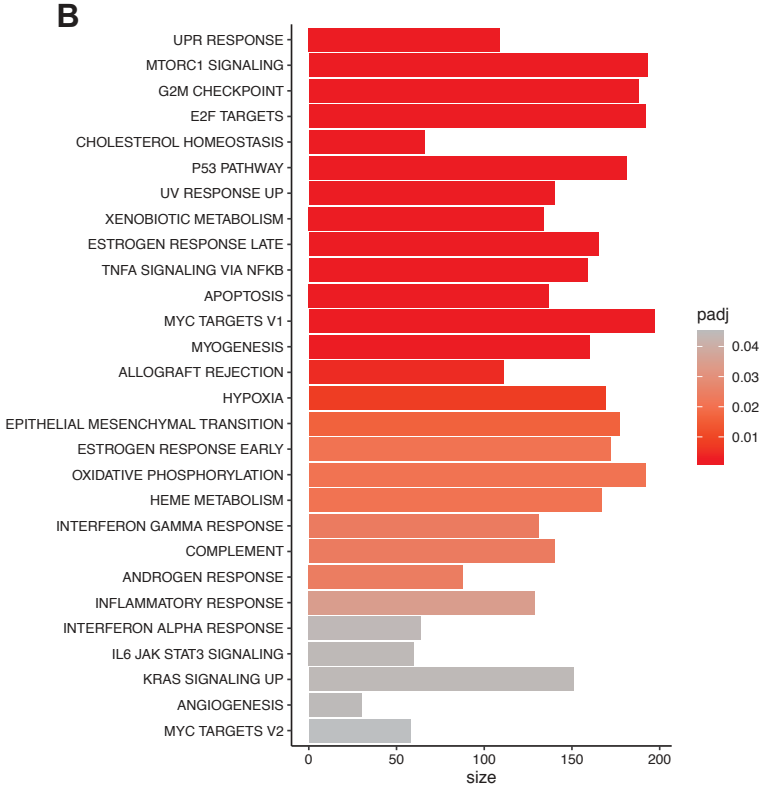
A

Gene	log(*E4f1* $^{(Nes)KO}$ /CTL $^{(Nes)}$) FC	FDR
Elp3	-2.5	2.1E-55
Neurl4	-2.8	6.9E-51
Atf5	2.2	2.3E-38
Dlat	-2.8	5.7E-38
Asns	1.9	2.6E-24
Taz	-2.9	6.0E-24
Wdr7	-2.4	1.5E-23
Sesn2	2.2	1.7E-23
Znhit6	-2.8	6.7E-23
Nsun5	-3.2	2.0E-21
Pbrm1	-1.4	7.3E-21
Chac1	3.0	1.1E-20
Trib3	4.1	1.3E-20
Dnajc19	-3.0	1.2E-19
Fktn	-2.5	2.2E-19
Mrpl15	-2.4	2.7E-19
Eif4ebp1	2.5	2.4E-18
Tti2	-2.1	3.3E-18
Pycr1	1.6	7.1E-18
Leo1	-1.7	2.1E-17

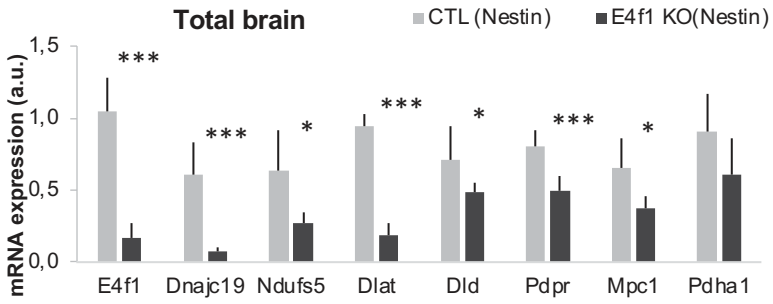
E4f1 direct gene targets

UPR response

B



C



<u>Article 2</u> : E4F1 regulates MITF and melanogenesis through the Elongator complex in melanocytes.

Les travaux de notre laboratoire ont mis en évidence un rôle essentiel d'E4F1 dans l'homéostasie peau. L'inactivation d'*E4f1* in vivo conduit à de sévères lésions cutanées, associées à une perte totale de cellularité de l'épiderme. En effet, E4F1, à travers ses fonctions de régulation de la voie p53 et de la pyruvate déshydrogénase, est nécessaire au maintien des cellules souches épidermiques et à la différenciation des kératinocytes. Toutefois, ses fonctions dans d'autres types cellulaires cutanés restent encore peu étudiées.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux fonctions d'E4F1 dans le lignage mélanocytaire. Pour cela, j'ai généré des modèles murins génétiquement modifiés permettant l'inactivation spécifique d'*E4f1* dans les mélanocytes. La caractérisation de ces modèles a révélé que la perte d'*E4f1* provoque de sévères défauts de pigmentation du pelage et de la peau, sans affecter la survie ni la différenciation des mélanocytes. Au niveau moléculaire, la déplétion d'*E4f1* dans une lignée cellulaire de mélanocytes immortalisés conduit à la diminution de l'expression de ses gènes cibles, et notamment d'Elp3, codant la sous-unité catalytique du complexe Elongator. La perturbation du complexe Elongator qui en résulte induit un stress du réticulum endoplasmique et une réponse aux protéines mal repliées. Cette réponse réprime alors l'expression de MITF et, par conséquent, des enzymes de la synthèse de mélanine. De manière cohérente, la déplétion d'*Elp3* récapitule les défauts d'expression de MITF observés dans les mélanocytes déficients en E4f1, confirmant un rôle clé du complexe Elongator dans la mélanogénèse. Ainsi, nos données ont permis d'identifier E4f1 et ses fonctions dans le contrôle de la fidélité de la traduction comme des acteurs clés de l'homéostasie des mélanocytes.

E4F1 REGULATES MITF AND MELANOGENESIS THROUGH THE ELONGATOR COMPLEX IN MELANOCYTES

Mélanie Rousseau[1,2*], Berfin Seyran[1,2*], Morane Houdeville[1,2], Pierre-François Roux[1,2], Michela Di Michele[1,2], Betty Encislai[1,2], Caroline Fau[1,2], Nelly Pirot[1,3], Alicia Seguin[1,3], Lucie Rubio[1,4], Sophie Leboucher[5,6], Adeline Torro[1,4], Armelle Choquet[7,8,9], Alexandre David[7,8,9], Lionel Larue[5,6], Laurent Le Cam[1,2,10], Matthieu Lacroix[1,2,10].

[1] IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, F-34298, France; INSERM, U1194, Montpellier, F-34298, France.

[2] Équipe labélisée Ligue Contre le Cancer.

[3] Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier, BioCampus, CNRS-UMS3426, F-34094, Montpellier, France.

[4] Réseau des Animaleries de Montpellier, BioCampus, CNRS-UMS3426, F-34094, Montpellier, France.

[5] Université Paris-Saclay, CNRS UMR3347, F-91400 Orsay, France.

[6] Institut Curie, Université PSL, CNRS UMR3347, F-91400 Orsay, France.

[7] CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, 34094 Montpellier, France.

[8] INSERM, U1191, 34094 Montpellier, France.

[9] Université de Montpellier, 34094 Montpellier, France.

[10]Co-senior authors.

** Equally contributed to this work.*

Keywords: E4F1, Melanocytes, MITF, Elongator complex, UPR

SUMMARY

The multifunctional protein E4 transcription factor 1 (E4F1) is an essential regulator of skin homeostasis through the regulation of epidermal stem cell and keratinocyte differentiation. However, the functions of E4F1 in other skin cell type remain poorly investigated. Here, we describe its role in the melanocytic lineage and in melanogenesis, a physiological process for synthesis of melanin pigments. Using genetically engineered mouse models enabling conditional inactivation of *E4f1* specifically in melanocytes, we demonstrated that *E4f1* loss induces severe pigmentation defects, without impacting melanocyte survival. At the molecular level, *E4f1* depletion reduces the expression of its direct transcriptional target genes, including *Elp3,* leading to a disruption of the Elongator complex and consequently the induction of an unfolded protein response. This response resulted in MITF and melanin synthesis enzymes down regulation. Consistently, *Elp3* depletion recapitulated MITF decrease, confirming a key role of the Elongator complex in melanogenesis process. All together, our data identified E4F1-associated functions in translation fidelity as key players in melanocyte homeostasis.

INTRODUCTION

Melanogenesis is a physiological process for synthesis of melanin pigments, which occurs in a specialized skin cell, the melanocyte. Melanin is transferred to the surrounding keratinocytes to protect the skin from UV-induced DNA damages [1–3]. The amount, type and distribution of melanin determine hair, skin, and eye color [4,5]. Melanogenesis involved pigment-producing enzymes: tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) and dopachrome tautomerase (DCT), also known as tyrosinase-related protein 2 (TYRP2) [6]. The transcriptional expression of these three enzymes is under the tight control of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) [7–9]. MITF is a member of the Myc supergene family of basic helix-loop-helix leucine zipper (b-HLH-Zip) transcription factors, known as the master regulator of the melanocytic lineage, and is essential for melanocyte development, survival, proliferation and melanogenesis [10]. The first mouse mutation of *Mitf* was discovered in individuals, among the offspring of irradiated mice, with severe pigmentation loss due to lack of neural crest-derived melanocytes, microphtalmia and deafness [11]. Since then, over 20 mutations in *Mitf* gene have been identified in mouse, all impacting melanocytes functions to a varying degree [12]. In humans, mutation of the *MITF* gene give rise to Waardenburg type 2 (WS2) and Tietz syndromes, characterized by pigmentation and deafness disorders [13–16]. MITF expression is regulated by several transcription factors including SOX10, CREB, PAX3 and LEF1 [17]. At the post-translational level, phosphorylation [18–20], ubiquitination [21]and sumoylation [22] have been shown to modulate MITF transcriptional activities and protein stability. Many signaling pathways have been shown to regulate MITF expression [23], and recent data demonstrated that a translation reprogramming upon nutrient starvation leads to MITF repression both at the translational and transcriptional level through inhibition of the translation initiation factor eIF2B and the induction of the key component of the integrated stress response, ATF4 [24].

E4F1 was originally identified as a cellular target of the viral oncoprotein E1A during type V adenoviral infection [25]. E4F1 is a multifunctional ubiquitously expressed protein that exhibits both transcriptional [25,26] and atypical ubiquitin E3 ligase activities [27]. E4F1 has been described as a key regulator of the p53 pathway. E4F1-mediated ubiquitylation of p53 modulates its transcriptional activities independently of its degradation [27]. In addition, E4F1 interacts directly with other components of the p53 pathway, such as p14ARF [28] and BMI1[29]. Recent studies have identified E4F1 as a central regulator of cellular metabolism, controlling pyruvate dehydrogenase activity [30] as well as lipid metabolism [31]. More recently, E4F1 has been implicated in the control of the protein translation fidelity through the regulation of *Elp3* gene, encoding the catalytic subunit of the Elongator complex [32]. In vivo E4F1 has been identified as a major actor in embryonic development and adult tissue homeostasis [31,33,34]. Especially, E4F1 plays an essential role in skin homeostasis and epidermal stem cell maintenance implicating the BMI1-ARF-p53 pathway and pyruvate metabolism [34–36]. Despite its roles in keratinocytes, E4F1 in other skin cell types remains poorly studied. Here, we report that E4f1 displays major functions in the melanocytic lineage. Using a mice model enabling specific inactivation of *E4f1* in melanocytes as well as in vitro immortalized cell lines, we identified a role of E4f1 in melanogenesis and melanocyte homeostasis, through the regulation of MITF expression by the Elongator complex.

RESULTS

Specific *E4f1* inactivation in melanocytes results in hair and skin pigmentation defects without impacting melanocytes survival nor differentiation.

Using *E4f1* whole-body conditional KO mouse model (*E4f1*^{flox}, RERT), we previously identified an essential role for E4f1 in adult skin homeostasis and epidermal stem cell maintenance [34–36]. Further characterization of this model revealed that topical application of tamoxifen on the tail of 8- to 12-weeks-old *E4f1*^{flox}, RERT mice led to depigmentation of the skin (Fig. S1B). Immunohistochemistry (IHC) analyses of tail skin sections demonstrated a decreased expression of GP100, a marker of melanosomes, organelles in which melanin synthesis takes place in melanocytes (Fig. S1C).

To further investigate the role of *E4f1* in the melanocytic lineage, we generated a mouse model allowing specific *E4f1* inactivation in melanocytes. We crossed *E4f1* conditional knock-out (KO) mice (*E4f1*^{flox}) with mice expressing the tamoxifen (tam) -inducible CreERT2 fusion protein under the control of the melanocyte specific-tyrosinase promoter to generate *E4f1*$^{+/flox}$, TyrCreER^{T2} and *E4f1*$^{-/flox}$, TyrCreER^{T2} experimental groups (hereafter referred to as *E4f1*(*Tyr*)CTL and *E4f1*(*Tyr*)KO respectively). A mTmG reporter allele was also used to validate *E4f1* inactivation and trace the recombined melanocytes (Fig. S2A). Topical applications of tamoxifen were performed on a shaved area of the back skin of 18 days *E4f1*(*Tyr*)CTL and *E4f1*(*Tyr*)KO mice to inactivate *E4f1* at the beginning of the first synchronous adult hair cycle (Fig. S2B). 30 days after tam treatment, *E4f1*(*Tyr*)KO mice showed severe defects in coat pigmentation and hair graying with absence of pigment in the hair shaft (Fig.1A and B). These results were consistent with a strong decrease of melanin content in hairs (Fig. 1C). To determine whether this phenotype results from the loss of melanocytes, we performed IHC analysis of the GFP reporter on back skin sections.

These analyses revealed the presence of melanocytes in the hair bulbs of *E4f1*(*Tyr*)KO mice (Fig. 1D), with no difference in number compared to control littermates (Fig. 1E). Of note, melanin pigment detected in *E4f1*(*Tyr*)CTL sections (in brown) was largely reduced in *E4f1*(*Tyr*)KO skin samples (Fig. 1D).

Similarly, tam application on tail skin resulted in hypopigmentation in *E4f1*(*Tyr*)KO mice (Fig. 1F), without impacting the number of interfollicular melanocytes (Fig. 1G). To evaluate the differentiation status of the *E4f1* KO melanocytes, the expression of the differentiation marker Sox10 was analyzed by immunostaining of back skin sections and tail epidermal whole mounts. No differences in Sox10 expression were detected in melanocytes upon *E4f1* inactivation (Fig 1H and I). Taken together, these data showed that *E4f1* inactivation does not affect melanocytes survival nor differentiation and suggested that E4F1-associated pigmentation defects could result from an impaired melanogenesis process.

Pigmentation defects in *E4f1*(*Tyr*)KO mice are not linked to melanocyte stem cells nor to p53 protein.

We previously demonstrated that *E4f1* is essential for epidermal stem cell maintenance [34–36]. Furthermore, the loss of melanocyte stem cells has also been associated with premature hair graying in mice [37–39]. Thus, we hypothesized that *E4f1* inactivation in our model could affect melanocyte stem cells. First, we characterized the evolution of the pigmentation defects over several months and several hair cycles, and observed that this phenotype was still maintained 12 months after *E4f1* inactivation, suggesting an alteration in melanocytes renewal during the hair cycles (Fig. S4A). To further test this hypothesis, we performed depilation onto *E4f1*(*Tyr*)KO back skin to induce melanocyte stem cell activation/differentiation.

We showed a pigmentation of the regenerated hairs in the depilated area of *E4f1*(*Tyr*)KO mice (Fig. S4B), indicating that melanocyte stem cells are still able to generate mature pigmented melanocytes and are not affected by *E4f1* inactivation.

The p53 tumor suppressor is a well-known actor of skin pigmentation in response to ultraviolet radiations [40]. Previous studies have established that E4F1 is a key regulator of the p53 pathway. Indeed, E4F1-mediated ubiquitylation modulates the p53 transcriptional activities [27]. Moreover, E4f1 has been shown to interact directly not only with p53 itself but also the regulators of this pathway, including p14ARF and BMI1 [28,29].

Therefore, to assess the contribution of the p53 pathway to the hair graying phenotype of *E4f1*(*Tyr*)KO mice, we crossed *E4f1*^{flox}*, TyrCreER*^{T2} mice with p53 KO strain to generate double compound KO animals (hereafter referred to as *E4f1*(*Tyr*)CTL; p53KO and *E4f1*(*Tyr*)KO; p53KO). Tam-induced *E4f1* inactivation in these double KO mice resulted in coat pigmentation defects (Fig. S3A) and in a decreased melanin content in hairs (Fig. S3B) similar to those observed in *E4f1*(*Tyr*)KO mice, indicating that the pigmentation defects caused by *E4f1* inactivation are not p53 dependent.

Specific *E4f1* inactivation in melanocytes also induces hair graying in *Braf*^{V600E} and *Nras*^{Q61K} hyperpigmented models

Constitutive oncogene activation, such as *Braf* or *Nras*, promotes melanocytes proliferation and leads to a hyperpigmented phenotype in mice [41,42]. We then wondered whether pigmentation defects due to *E4f1* inactivation could also occur in hyperpigmented mice models. To answer this question, we crossed E4f1^{flox}, TyrCreER^{T2} mice with strains allowing the conditional expression of *Braf*^{V600E} or the constitutive expression of *TyrNras*^{Q61K} (Fig. 2A and D). In both *Braf*^{V600E} and *Nras*^{Q61K} models, *E4f1* inactivation led to coat pigmentation defects (Fig. 1B and E). IHC analysis of the GFP reporter of back skin sections showed an important decrease in melanin (in brown) in *Braf*^{V600E}; *E4f1*(*Tyr*)KO and *Nras*^{Q61K}; *E4f1*(*Tyr*)KO even though melanocytes (in purple) were still detectable (Fig. 1C and F), suggesting that *E4f1* inactivation in melanocytes prevent hyperpigmentation induced by *Braf*^{V600E} and *Nras*^{Q61K} oncogenes without impacting melanocytes maintenance.

E4f1 regulates MITF and melanin synthesis enzymes expression

We next addressed the molecular mechanism by which E4f1 could regulate melanogenesis. For this purpose, murine pigmented and immortalized melanocytes, Melan-a, were transduced with lentiviral particles encoding an irrelevant ShRNA (ShCTL) or ShRNA targeting *E4f1* (Sh*E4f1*). Ten days later, we assessed whole genome profiling of ShCTL and Sh*E4f1* Melan-a using RNA sequencing (RNA-seq).

Upon *E4f1* depletion, a total of 2725 genes were differentially expressed with a false discovery rate (FDR) inferior to 0.05, among which 1468 were down-regulated and 1257 were up-regulated (Fig.3A and Supplemental Table S1). Among the 50 most down-regulated transcripts, we found *Neurl4*, *Fktn*, *Dlat*, *Bag5*, *Ipo8*, *Tube1*, *Pbrm1*, *Wdr7*, *Eef1g*, *Dnajc19* and *Taz*, that were all previously identified as E4f1 direct target genes in embryonic mouse fibroblasts and ES cells (Rodier, 2015). In addition, gene set enrichment analysis (GSEA) indicated that the E4F1 signature was significantly repressed in Sh*E4f1* Melan-a cells (Fig. 3C). Depletions of *E4f1* and its direct target gene *Dlat* were also validated at the protein level by western-blot analysis (Fig. 4D). Altogether, these data validated the efficient depletion of *E4f1* by ShRNA in Melan-a cells and showed that the core transcriptional program controlled by *E4f1* and previously described in various cell types, also occurred in melanocytes.

Looking for candidate genes related to pigmentation, we found the master regulator of melanogenesis, *Mitf*, among the significantly down-regulated transcripts upon *E4f1* depletion. We then confirmed the down expression of MITF by western-blot and RT-qPCR analysis. Moreover, we also observed a decreased expression of the different melanogenesis enzymes Tyrosinase, TYRP1 and DCT, directly regulated by MITF (Fig. 3D and E). In addition, the expression of the recently identified target gene of MITF, the Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) catalyzing the transformation of saturated fatty acids (SFA) into monounsaturated fatty acids (MUFA) [43]was decreased in Sh*E4f1* Melan-a cells compared to control cells. Interestingly, these recent data also suggested that impaired MUFA/SFA balance creates an amplification loop that also participates to the repression of MITF expression, which can be restored by the supply of MUFA. We challenged this notion in our and found that MITF protein expression was restored in absence of *E4f1* by oleate supplementation (Fig. 3G). Taken all together, these data demonstrated a key role of E4F1 in the regulation of MITF and melanin synthesis enzymes.

_E4f1_ depletion impairs Elongator complex function and induces an UPR response that regulate MITF expression

We then characterized the molecular mechanism regulating MITF expression. Several signaling pathways have been shown to regulate MITF expression [23], and recent data demonstrated that translation reprogramming leads to MITF repression through the induction of the integrated stress response (ISR) [24]. Previous ChIP-seq experiments performed in murine embryonic fibroblasts and ES cells identified *Elp3*, a gene encoding the catalytic subunit of the Elongator complex implicated in translation fidelity, as a potential direct target gene of E4F1 (Fig. 4A) [44].

Recently, we confirmed that E4F1 transcriptionally controls *Elp3* expression and Elongator complex activity in neurons and upon *E4f1* inactivation, *Elp3* down regulation leads to the induction of an ISR/UPR response mediated by ATF factors triggering neuronal cell death [32]. Based on these results, we analyzed *Elp3* expression levels in *E4f1*-depleted Melan-a cells and showed on significant decrease of the mRNA levels by RT-qPCR (Fig. 4B). We confirmed this decrease at the protein levels for ELP3 but also for ELP1 suggesting that impaired ELP3 expression leads to the disruption of the entire complex (Fig. 4C). As expected, this was correlated with an UPR response over-representation in our RNAseq data among the more significantly enriched pathways upon *E4f1* depletion in melanocytes (Fig. S5). More precisely, we identified *Atf3*, *Atf5*, *Slc6a9*, *Asns* and *Eif4ebp1* transcripts as up-regulated in *E4f1*-depleted Melan-a (Fig. 4D) and we confirmed the induction of these ATF-related genes by RT-qPCR (Fig. 4E). These data demonstrated that *Elp3* is also regulated by E4F1 in melanocytes and that *E4f1* depletion altered Elongator complex activity, leading to an UPR response.

To further strengthen the role of ELP3 in the E4F1-associated regulation of MITF expression, we evaluated the molecular consequences of Elp3 depletion on melanogenesis. We first demonstrated that shRNA-mediated knock-down of *Elp3* led to a decreased expression of MITF both at the mRNA and the protein levels (Fig. 5A-B).

In agreement, the mRNAs of the melanin synthesis enzymes *Tyrosinase*, *Tyrp1* and *Dct* were also found to be decreased upon *Elp3* depletion (Fig. 5B). In this context, RT-qPCR analysis also suggested the induction of UPR related-genes (Fig. 5C). Altogether, these data highlighted that *Elp3* depletion recapitulates the defects on *Mitf* and pigmentation enzymes expression observed in *E4f1*-depleted melanocytes, supporting the notion that E4F1 regulates MITF through Elongator complex.

DISCUSSION

We previous identified E4F1 as essential regulator of skin homeostasis. Inactivation of *E4f1* led to severe skin alterations due to impaired epidermal stem cell maintenance. However, a deeper characterization of *E4f1* whole body conditional KO mice revealed a potential role of E4F1 in another skin cell type, the melanocyte. Here, we describe a role of E4F1 in melanocyte homeostasis and melanogenesis through the regulation of MITF. We show that this regulation occurs through the control of translation fidelity since perturbation of *E4f1* expression impacts Elongator complex activity, leading to accumulation of unfolded proteins and ER stress that alter MITF expression and melanocyte functions.

Using genetically engineered mice lacking *E4f1* specifically in melanocytes, we showed that *E4f1* inactivation induced severe coat and skin pigmentation defect. Although E4F1 has been shown to be essential for the survival of neural progenitors [32], immortalized and transformed cells [44–46], our data demonstrated that deletion of *E4f1* does not induce the death of primary melanocytes. This was also confirmed in different mouse models of hyper-pigmentation driven by mutated BRAF and NRAS. Surprisingly, long-term study of *E4f1(Tyr)KO* mice revealed persistence of pigmentation defects over time. Since melanocytes are renewed at each new hair cycle by differentiation of melanocyte stem cells from the bulge, we hypothesized that *E4f1* inactivation could impact stem cell maintenance. Indeed, several studies have shown that melanocyte stem cell loss leads to premature hair graying [37–39] and *E4f1* inactivation has previously been shown to indirectly impact on epidermal stem cell maintenance through remodeling of their microenvironment [35]. However, depilation assays functionally demonstrated that melanocyte stem cells are still able to generate new mature melanocytes upon *E4f1* inactivation and that persistence of the hair graying phenotype could arise from the asynchronous character of hair renewal.

Moreover, since we found that the expression of the differentiation marker SOX10 was not altered in *E4f1*-deficient mice, taken all together our data suggested that E4F1 plays a major intrinsic role in melanocyte functions and melanogenesis father than impacting on cell survival or differentiation.

Using immortalized melanocytes, we demonstrated that the E4F1-mediated pigmentation defects are cell autonomous. Indeed, *E4f1* inactivation caused MITF decreased expression and consequently, of the melanogenesis enzymes Tyrosinase, Tyrp1 and Dct. Several studies have shown that MITF can be directly repressed by the transcription factor ATF4, a key component of the ER stress and unfolded protein responses [47] consequently to translation reprogramming [24]. Interestingly, we recently identified E4F1 as a direct transcriptional regulator of *Elp3*, encoding the catalytic subunit of the Elongator complex [32]. This atypical acetyl-transferase acetylates a subset of tRNAs at the wobble position U_{34} to promote a stepwise cascade of tRNAs modifications that ensure translation fidelity of some specific codons in ribosomes [48]. In neurons, *E4f1* inactivation induced alteration of the activity of the Elongator complex, translation defects and activation of an unfolded protein response (UPR) mediated by the PERK-eiF2α-ATF4 pathway [32]. Similarly, we demonstrated that *E4f1*-depleted melanocytes also displayed a disruption of the Elongator complex and the induction of an UPR response. Interestingly, we were able to recapitulate the key features associated to *E4f1* knock down by depleting ELP3 illustrating that E4F1 regulation of MITF and melanogenesis is mediated at least in part through Elongator complex.

ER stress and UPR have been frequently associated with pigmentary disorders and melanoma. Mutations responsible for albinism, in which melanocytes are unable to produce melanin, induced misfolding and accumulation in ER of the tyrosinase protein, leading to ER stress and UPR [49,50]. Unsolved UPR usually induces apoptosis [51].

However, albino melanocytes have been described as particularly resistant to UPR [52,53], which would explain their survival upon *E4f1* inactivation in our model. Similarly, dilated endoplasmic reticulum, suggesting the accumulation of misfolded proteins, has been observed in melanocytes of patients with vitiligo, a complex autoimmune disease characterized by absent or dysfunctional melanocytes [54] suggesting that translation defects might be a more common feature of pigmentary disorders. Although no *E4F1* mutation has been associated so far with pigmentary diseases in humans, studying the role of E4F1 in these pathologies could bring novel insights into the understanding of the mechanisms inducing melanocyte dysfunction. In melanoma, oncogenic BRAF has been shown to responsible for chronic ER stress [55]. Adaptation to this ER stress promotes melanoma progression and therapeutical resistance [56,57]. Moreover, a reduced expression of MITF is associated with an aggressive and invasive phenotype and resistance to therapy of melanoma cells [58]. Here, we identified E4F1 as a regulator of MITF and ER stress response, therefore our work should pave the way for future investigations in order to determine E4F1 functions in pigmentary disorders as well as in melanoma initiation, progression and drug resistance.

METHODS

Generation of mouse models, Animal housing, Experimental treatment, and genotyping

Generation of *E4f1* cKO mice was previously described (Lacroix, 2010). These mice were first intercrossed with Cre-ER^{T2} knock-in mice (*RERT, Polr2a$^{tm1(cre/ERT2)Bbd}$/J*) to generate *E4f1$^{+/flox}$*, *RERT$^{KI/KI}$*; *E4f1$^{-/flox}$*, *RERT$^{KI/KI}$* experimental groups (referred as to *E4f1*(*RERT*)CTL and *E4f1*(*RERT*)KO respectively). *E4f1* cKO mice were also intercrossed with TyrCreER^{T2} mice and mice carrying Rosa26^{mTmG} reporter (B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sor$^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}$/J) to generate *E4f1$^{+/flox}$*, TyrCreER^{T2}, mTmG$^{KI/+}$ and *E4f1$^{-/flox}$*, TyrCreER^{T2}, mTmG$^{KI/+}$ experimental groups (referred as to *E4f1*(*Tyr*)CTL and *E4f1*(*Tyr*)KO respectively).

These mice were then intercrossed with p53KO strain (B6.129S2-*Trp53^{tm1Tyj}*/J) to generate double KO E4f1/p53 compound mice (referred as to *E4f1*(*Tyr*)CTL; p53KO and *E4f1*(*Tyr*)KO; p53KO).

E4f1 cKO mice were also intercrossed either with mice allowing the conditional expression of *Braf^{V600E}* (Braf^{tm1Cpri}, MGI: 3612533) or the constitutive expression of *TyrNras^{Q61K}* (Tg(Tyr-NRAS*Q61K)1Bee, MGI: 3768645) to generate hyperpigmented mouse models.

Mice, generated in a mix 129Sv/J; C57Bl/6 background, were housed in a pathogen free barrier facility (temperature 22°C; 55% humidity; 12h cycle light/dark) in accordance with the ethic committee (Comité d'éthique pour l'Expérimentation Animale CEEA) for animal welfare (agreement number #17079-2018100514023945 v2). Mice were maintained under chow diet (A03, Safe) containing 22kcal% protein, 65kcal% carbohydrate and 13kcal% fat. Cre-mediated recombination of the *E4f1^{flox}* allele was induced by topical application of taxoxifen (Sigma; 2mg/day/mouse diluted in ethanol for 4 consecutive days) on shaved back or tail skin of 8- to 12-weeks-old or 18-days-old animals for RERT and TyrCreER^{T2} models respectively.

Depilation experiments were performed using cold wax strips under isoflurane (2%) anesthesia.

Mice were genotyped by PCR on tail genomic DNA using GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase kit (Promega). Primers used for genotyping are listed in supplemental table S2.

Melanin Extraction and quantification

Melanin was extracted from 1.5 mg of dorsal hairs by alkali treatment (1.5 ml of 1M NaOH, 4 hrs at 85°C). Relative melanin content of each sample was measured in triplicate at 475 nm. Hairs from C57Bl/6 and Balb/C mice were used as positive and negative control, respectively.

Immunohistochemistry, Immunofluorescence and Whole Mounts analysis

Tissue biopsies were fixed in 4% neutral-buffered formalin (24h) and paraffin embedded. Paraffin-embedded tissues were sectioned and processed for immunohistochemistry (IHC) or hematoxylin and eosin (H/E) staining. IHC was performed on 4µm sections using the following primary antibodies: anti-GFP (Thermofisher, A11122), anti-GP100 (Abcam, ab137078). Revelation was performed according to the manufacturer's recommendations with secondary biotinylated anti-rabbit antibodies, streptavidin-peroxidase complex (ABC Vectastain kit, Vector Laboratories) and peroxidase substrate DAB (Vector Laboratories).

Immunofluorescence staining with anti-Sox10 (Abcam, ab155279) and anti-GFP (Abcam, ab13970) were performed on 4µm paraffin sections. Revelation was performed using Alexa594-conjugated anti-rabbit and Alexa594-conjugated anti-chicken secondary antibodies (Invitrogen).

For Whole Mounts, mice tail skins were peeled and cut into small pieces. Skin samples were incubated in 5 mM EDTA- PBS during 4 hours at 37°C. Tail epidermis was separated from dermis and fixed in 4% Formaldehyde (Sigma) for 2 hours at room temperature.

For immunostaining, samples were blocked and permeabilized in PB buffer containing 0,5% milk, 0,25% gelatin, 0,5% Triton X-100 in TBS (0,9% NaCl, 20 mM Hepes) for 30 minutes at room temperature, and then incubated with Sox10 antibody (Santa Cruz) in PB buffer overnight at 4°C. Samples were washed with 0,2% Tween20 in PBS and incubated with Alexa 488 anti-goat (Thermofisher) and dapi in PB buffer overnight at 4°C and mounted on coverglass with Mowiol (Biovalley).

For GFP^+ melanocytes quantification, a total of 100 GFP stained cells, following IHC previously described, were counted using ImageJ Software and normalized by the size of the sample to determine the number of GFP^+ melanocytes per millimeter of skin.

Cell Culture

Melan-a cells were provided by Pr. Dorothy Bennett's laboratory (SGUL) and cultured in RPMI medium complemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Eurobio), 1% penicillin/streptomycin, 1% D-glutamine, 1µM tetradecanoyl phorbol acetate (TPA, Sigma) at 37°C in 5% CO2.

Lentiviral Particle Production and Infections

Lentiviral particles were produced in 293T packaging cells by transient transfection, using Jet-PEI reagent (Ozyme), of pLKO vectors encoding either a control ShRNA (Sigma, SHC002), ShRNAs targeting mouse *E4f1* (Sigma-Mission, TRCN0000321451 and TRCN0000321377) or ShRNAs targeting mouse *Elp3* (Sigma-Mission, TRCN0000039309, TRCN0000039312 and TRCN0000326972). Seventy-two hours after transfection, viral supernatants were harvested, filtered on 0,4um and added on Melan-a cells for 8 hours in presence of polybrene (5 µg/mL, Sigma). Antibiotic selection of transduced Melan-a was performed 48h after transduction with puromycin (1 µg/mL; Invotrogen).

RNA extraction and quantitative PCR

Melan-a cells were lysed in TriReagent (Sigma) and total RNAs were isolated according to the manufacturer's recommendations. cDNAs were synthesized from 500ng of total RNA using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was performed on a LightCycler 480 apparatus (Roche). The relative mRNA copy number was calculated using Ct values and was normalized to *Rpl13a* mRNA levels. Primers sequences used are listed in supplemental table S3.

RNA sequencing and Transcriptome analyses

Libraries were sequenced using an Illumina NovaSeq 6000 at the iGenSeq facility (Institut du Cerveau, Paris), generating 766 million 101bp x 2 paired-end reads (42.6 million per sample in average). Raw sequencing reads were de-multiplexed with Illumina CASAVA v.1.8.2. After quality check using FastQC v0.11.5, reads were cleaned using cutadapt v2.9 to remove Illumina TruSeq adapters, low quality bases and reads, and discard reads shorter than 25 bp after filtering. Fragments were then aligned to the mouse genome (mm10) using STAR v2.7.3a following ENCODE best practice.

The raw gene-centric count matrix was built using *Rsubread* v2.4.3 R package using default parameters and considering the inbuild NCBI mm10 annotation. The count matrix was further normalized to account for sequencing depth differences and to remove unwanted variation applying a nonlinear full-quantile normalization (*EDAseq 2.24.0*) and a RUVs debatching strategy (*RUVSeq v1.24.0*). Only genes with more than one count per million in at least one sample were kept. The obtained normalized count matrix was used as an input for the differential expression analyses performed with *edgeR v3.32.1*, considering the treatment (control or shRNA against E4f1) and the surrogates in the design matrix and applying a Benjamini-Hocheberg correction for multiple-testing. Statistical significance was reached when the corrected *p*-value was smaller than 0.01, and the absolute fold-change greater than $\log_2(1.5)$. The list of differentially expressed genes was used to perform a gene set over-representation analysis considering the Molecular Signature Database (*MSigDB v7.2*) Reactome gene sets using a right-tail modified Fisher's exact test and the hypergeometric distribution to provide *p*-value. Gene Set Enrichment Analyses were conducted using the R package *fgsea v1.16.0* with 1000 permutations to obtain *p*-values.

Protein extraction and western blotting

For total protein extracts, Melan-a cells were lysed in Laemmli buffer (80mM Tris pH=6,8, 2% SDS, 12% sucrose, 2% β-mercaptoethanol, bromophenol blue) supplemented with phosphatase (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, Sigma) and protease (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) inhibitors according to the manufacturer's recommendations. Immunoblotting was performed using the following antibodies: anti-E4F1 (Santa Cruz Biotechnology, sc514718), anti-DLAT (Santa Cruz Biotechnology, sc-271534), anti-MITF (Sigma, HPA003259), anti-DCT (Abcam, ab74073), anti-ELP1 (AnaSpec, AS-54494), anti-ELP3 (Abcam, ab190907) and ACTIN (Sigma, A3854).

Statistical analysis

Data are expressed as mean +/- SD. Unless stated otherwise in the figure legends, unpaired two-sided Wilcoxon-Mann-Whitney non-parametric rank sum test was used to compute p-values. P-values inferior to 0.05 were considered as statistically significant.

REFERENCES

1. Kobayashi T, Imokawa G, Bennett DC, Hearing VJ. Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). J Biol Chem. 1998;273: 31801–31805. doi:10.1074/jbc.273.48.31801
2. Meredith P, Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin. Pigment Cell Res. 2006;19: 572–594. doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00345.x
3. Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui MS, Yarosh DB, et al. Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. J Invest Dermatol. 2012;132: 1222–1229. doi:10.1038/jid.2011.413
4. Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The Regulation of Skin Pigmentation *. J Biol Chem. 2007;282: 27557–27561. doi:10.1074/jbc.R700026200
5. Kondo T, Hearing VJ. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. Expert Rev Dermatol. 2011;6: 97–108. doi:10.1586/edm.10.70
6. del Marmol V, Beermann F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. FEBS Lett. 1996;381: 165–168. doi:10.1016/0014-5793(96)00109-3
7. Bentley NJ, Eisen T, Goding CR. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. Mol Cell Biol. 1994;14: 7996–8006. doi:10.1128/mcb.14.12.7996-8006.1994
8. Yasumoto K, Yokoyama K, Shibata K, Tomita Y, Shibahara S. Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. Mol Cell Biol. 1994;14: 8058–8070. doi:10.1128/mcb.14.12.8058-8070.1994
9. Yasumoto K, Yokoyama K, Takahashi K, Tomita Y, Shibahara S. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. J Biol Chem. 1997;272: 503–509. doi:10.1074/jbc.272.1.503
10. Goding CR, Arnheiter H. MITF—the first 25 years. Genes Dev. 2019;33: 983–1007. doi:10.1101/gad.324657.119
11. Hertwig P. Neue Mutationen und Koppelungsgruppen bei der Hausmaus. Z Für Indukt Abstamm-Vererbungslehre. 1942;80: 220–246. doi:10.1007/BF01741984
12. Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. Annu Rev Genet. 2004;38: 365–411. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.092717
13. Léger S, Balguerie X, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, Cabot A, Amstutz-Montadert I, et al. Novel and recurrent non-truncating mutations of the MITF basic domain: genotypic and phenotypic variations in Waardenburg and Tietz syndromes. Eur J Hum Genet EJHG. 2012;20: 584–587. doi:10.1038/ejhg.2011.234
14. Pingault V, Ente D, Dastot-Le Moal F, Goossens M, Marlin S, Bondurand N. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. Hum Mutat. 2010;31: 391–406. doi:10.1002/humu.21211
15. Amiel J, Watkin PM, Tassabehji M, Read AP, Winter RM. Mutation of the MITF gene in albinism-deafness syndrome (Tietz syndrome). Clin Dysmorphol. 1998;7: 17–20.
16. Smith SD, Kelley PM, Kenyon JB, Hoover D. Tietz syndrome (hypopigmentation/deafness) caused by mutation of MITF. J Med Genet. 2000;37: 446–448. doi:10.1136/jmg.37.6.446
17. Seberg HE, Van Otterloo E, Cornell RA. Beyond MITF: Multiple transcription factors directly regulate the cellular phenotype in melanocytes and melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2017;30: 454–466. doi:10.1111/pcmr.12611
18. Hemesath TJ, Price ER, Takemoto C, Badalian T, Fisher DE. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. Nature. 1998;391: 298–301. doi:10.1038/34681
19. Wang C, Zhao L, Su Q, Fan X, Wang Y, Gao S, et al. Phosphorylation of MITF by AKT affects its downstream targets and causes TP53-dependent cell senescence. Int J Biochem Cell Biol. 2016;80: 132–142. doi:10.1016/j.biocel.2016.09.029
20. Takeda K, Takemoto C, Kobayashi I, Watanabe A, Nobukuni Y, Fisher DE, et al. Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. Hum Mol Genet. 2000;9: 125–132. doi:10.1093/hmg/9.1.125
21. Xu W, Gong L, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Yeh ETH, et al. Regulation of Microphthalmia-Associated Transcription Factor MITF Protein Levels by Association with the Ubiquitin-Conjugating Enzyme hUBC9. Exp Cell Res. 2000;255: 135–143. doi:10.1006/excr.2000.4803
22. Murakami H, Arnheiter H. Sumoylation modulates transcriptional activity of MITF in a promoter-specific manner. Pigment Cell Res. 2005;18: 265–277. doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00234.x

23. Goding CR. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. Genes Dev. 2000;14: 1712–1728. doi:10.1101/gad.14.14.1712
24. Falletta P, Sanchez-del-Campo L, Chauhan J, Effern M, Kenyon A, Kershaw CJ, et al. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. Genes Dev. 2017;31: 18–33. doi:10.1101/gad.290940.116
25. Raychaudhuri P, Rooney R, Nevins JR. Identification of an E1A-inducible cellular factor that interacts with regulatory sequences within the adenovirus E4 promoter. EMBO J. 1987;6: 4073–4081.
26. Lee KA, Green MR. A cellular transcription factor E4F1 interacts with an E1a-inducible enhancer and mediates constitutive enhancer function in vitro. EMBO J. 1987;6: 1345–1353.
27. Cam LL, Linares LK, Paul C, Julien E, Lacroix M, Hatchi E, et al. E4F1 Is an Atypical Ubiquitin Ligase that Modulates p53 Effector Functions Independently of Degradation. Cell. 2006;127: 775–788. doi:10.1016/j.cell.2006.09.031
28. Rizos H, Diefenbach E, Badhwar P, Woodruff S, Becker TM, Rooney RJ, et al. Association of p14ARF with the p120E4F transcriptional repressor enhances cell cycle inhibition. J Biol Chem. 2003;278: 4981–4989. doi:10.1074/jbc.M210978200
29. Chagraoui J, Niessen SL, Lessard J, Girard S, Coulombe P, Sauvageau M, et al. E4F1: a novel candidate factor for mediating BMI1 function in primitive hematopoietic cells. Genes Dev. 2006;20: 2110–2120. doi:10.1101/gad.1453406
30. Lacroix M, Rodier G, Kirsh O, Houles T, Delpech H, Seyran B, et al. E4F1 controls a transcriptional program essential for pyruvate dehydrogenase activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113: 10998–11003. doi:10.1073/pnas.1602754113
31. Lacroix M, Linares LK, Rueda-Rincon N, Bloch K, Di Michele M, De Blasio C, et al. The multifunctional protein E4F1 links p53 to lipid metabolism in adipocytes. Press.
32. Di Michele M, Laguesse S, Attina A, Mathieu H, Rousseau M, Jahanault-Tagliani C, et al. E4f1 coordinates pyruvate metabolism and the activity of the Elongator complex to ensure protein translation fidelity during neuronal development. Prep.
33. Le Cam L, Lacroix M, Ciemerych MA, Sardet C, Sicinski P. The E4F Protein Is Required for Mitotic Progression during Embryonic Cell Cycles. Mol Cell Biol. 2004;24: 6467–6475. doi:10.1128/MCB.24.14.6467-6475.2004
34. Lacroix M, Caramel J, Goguet-Rubio P, Linares LK, Estrach S, Hatchi E, et al. Transcription factor E4F1 is essential for epidermal stem cell maintenance and skin homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107: 21076–21081. doi:10.1073/pnas.1010167107
35. Goguet-Rubio P, Seyran B, Gayte L, Bernex F, Sutter A, Delpech H, et al. E4F1-mediated control of pyruvate dehydrogenase activity is essential for skin homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113: 11004–11009. doi:10.1073/pnas.1602751113
36. Caramel J, Lacroix M. E4F1 connects the Bmi1-ARF-p53 pathway to epidermal stem cell-dependent skin homeostasis. Cell Cycle. : 3.
37. Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. Science. 2005;307: 720–724. doi:10.1126/science.1099593
38. Moriyama M, Osawa M, Mak S-S, Ohtsuka T, Yamamoto N, Han H, et al. Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. J Cell Biol. 2006;173: 333–339. doi:10.1083/jcb.200509084
39. Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Binh NT, Nishie W, Yamazaki S, et al. Hair Follicle Stem Cells Provide a Functional Niche for Melanocyte Stem Cells. Cell Stem Cell. 2011;8: 177–187. doi:10.1016/j.stem.2010.11.029
40. Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, et al. Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation. Cell. 2007;128: 853–864. doi:10.1016/j.cell.2006.12.045
41. Ackermann J, Frutschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. Cancer Res. 2005;65: 4005–4011. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2970
42. Dhomen N, Reis-Filho JS, Dias S da R, Hayward R, Savage K, Delmas V, et al. Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. Cancer Cell. 2009;15: 294–303. doi:10.1016/j.ccr.2009.02.022
43. Vivas-García Y, Falletta P, Liebing J, Louphrasitthiphol P, Feng Y, Chauhan J, et al. Lineage-Restricted Regulation of SCD and Fatty Acid Saturation by MITF Controls Melanoma Phenotypic Plasticity. Mol Cell. 2020;77: 120-137.e9. doi:10.1016/j.molcel.2019.10.014

44. Rodier G, Kirsh O, Baraibar M, Houlès T, Lacroix M, Delpech H, et al. The Transcription Factor E4F1 Coordinates CHK1-Dependent Checkpoint and Mitochondrial Functions. Cell Rep. 2015;11: 220–233. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.024
45. Hatchi E, Rodier G, Lacroix M, Caramel J, Kirsh O, Jacquet C, et al. E4F1 deficiency results in oxidative stress–mediated cell death of leukemic cells. J Exp Med. 2011;208: 1403–1417. doi:10.1084/jem.20101995
46. Hatchi E, Rodier G, Sardet C, Le Cam L. E4F1 dysfunction results in autophagic cell death in myeloid leukemic cells. Autophagy. 2011;7: 1566–1567. doi:10.4161/auto.7.12.17991
47. Ferguson J, Smith M, Zudaire I, Wellbrock C, Arozarena I. Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. Oncotarget. 2017;8: 32946–32959. doi:10.18632/oncotarget.16514
48. Lin T-Y, Abbassi NEH, Zakrzewski K, Chramiec-Głąbik A, Jemioła-Rzemińska M, Różycki J, et al. The Elongator subunit Elp3 is a non-canonical tRNA acetyltransferase. Nat Commun. 2019;10: 625. doi:10.1038/s41467-019-08579-2
49. Chen K, Manga P, Orlow SJ. Pink-eyed dilution protein controls the processing of tyrosinase. Mol Biol Cell. 2002;13: 1953–1964. doi:10.1091/mbc.02-02-0022
50. Toyofuku K, Wada I, Valencia JC, Kushimoto T, Ferrans VJ, Hearing VJ. Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Tyrp1 can affect the processing of both mutant and wild-type proteins. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2001;15: 2149–2161. doi:10.1096/fj.01-0216com
51. Fribley A, Zhang K, Kaufman RJ. Regulation of Apoptosis by the Unfolded Protein Response. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2009;559: 191–204. doi:10.1007/978-1-60327-017-5_14
52. Manga P, Bis S, Knoll K, Perez B, Orlow SJ. The unfolded protein response in melanocytes: activation in response to chemical stressors of the endoplasmic reticulum and tyrosinase misfolding. Pigment Cell Melanoma Res. 2010;23: 627–634. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00718.x
53. Cheng T, Orlow SJ, Manga P. Loss of Oca2 disrupts the unfolded protein response and increases resistance to endoplasmic reticulum stress in melanocytes. Pigment Cell Melanoma Res. 2013;26: 826–834. doi:10.1111/pcmr.12158
54. Boissy RE, Liu YY, Medrano EE, Nordlund JJ. Structural aberration of the rough endoplasmic reticulum and melanosome compartmentalization in long-term cultures of melanocytes from vitiligo patients. J Invest Dermatol. 1991;97: 395–404. doi:10.1111/1523-1747.ep12480976
55. Corazzari M, Rapino F, Ciccosanti 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: 946–958. doi:10.1038/cdd.2014.183
56. 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: 358–367. doi:10.1111/j.1755-148X.2008.00467.x
57. Eigner K, Filik Y, Mark F, Schütz 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: 17498. doi:10.1038/s41598-017-17888-9
58. Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Döbbeling U, Kobert N, Schaerer L, et al. In vivo Switching of Human Melanoma Cells between Proliferative and Invasive States. Cancer Res. 2008;68: 650–656. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2491

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Specific *E4f1* inactivation in melanocytes results in hair and skin pigmentation defects. (A) Macroscopic observation of *E4f1*(*Tyr*)CTL et *E4f1*(*Tyr*)KO mice. *E4f1*(*Tyr*)KO animals exhibit hair graying compared to control littermates. **(B)** Microscopic observation of hairs from *E4f1*(*Tyr*)CTL et *E4f1*(*Tyr*)KO animals. *E4f1*(*Tyr*)KO mice exhibit hair graying compared to control littermates **(C)** Melanin quantification in hairs from *E4f1*(*Tyr*)CTL et *E4f1*(*Tyr*)KO (mean ± SEM, n=8). Hairs from C57Bl/6 and Balb/C mice were used as positive and negative control, respectively. ***p<0.001 **(D)** Immunohistochemistry analysis of the GFP reporter on back skin sections prepared from *E4f1*(*Tyr*)CTL et *E4f1*(*Tyr*)KO mice and showing follicular melanocytes in the hair bulb (arrow). Insets show images at higher magnification. Scale bar, 100 µm **(E)** Quantification of GFP^+ melanocytes per millimeter of back skin from *E4f1*(*Tyr*)CTL et *E4f1*(*Tyr*)KO mice (mean ± SEM, n=3 with 100 cells analyzed in each condition). ns, not significant. **(F)** Macroscopic observation of *E4f1*(*Tyr*)CTL et *E4f1*(*Tyr*)KO tail. *E4f1*(*Tyr*)KO animals exhibits skin pigmentation defects compared to control littermates. **(G)** Quantification of GFP^+ melanocytes per millimeter of tail skin from *E4f1*(*Tyr*)CTL et *E4f1*(*Tyr*)KO mice (mean ± SEM, n=3 with 100 cells analyzed in each condition). ns, not significant. **(H)** Immunofluorescence analysis of GFP (green) and Sox10 (red) on back skin section showing follicular melanocytes in the hair bulb (arrow) of *E4f1*(*Tyr*)CTL et *E4f1*(*Tyr*)KO mice. Sections were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 100µm. **(I)** Microscopic three-dimensional image of whole mounts of tail epidermis prepared from *E4f1*(*Tyr*)CTL et *E4f1*(*Tyr*)KO mice. Sample were stained with Sox10 (green) and DAPI (blue). Scale bar, 100 µm.

Figure 2. Specific *E4f1* inactivation in melanocytes induces hair graying in *Braf*^{V600E} and *Nras*^{Q61K} hyperpigmented models. (A) Schematic representation of genetic constructs allowing *Braf*^{V600E} conditional expression and *E4f1* inactivation in melanocytes upon tamoxifen-induced TyrCreER^{T2} recombination, and mTmG reporter expression. **(B)** Macroscopic observation of *Braf*^{V600E}*; E4f1*(*Tyr*)CTL et *Braf*^{V600E}*; E4f1*(*Tyr*)KO mice. *Braf*^{V600E}*; E4f1*(*Tyr*)KO animals exhibit hair graying compared to control littermates. **(C)** Immunohistochemistry analysis of the GFP reporter on back skin sections prepared from *Braf*^{V600E}*; E4f1*(*Tyr*)CTL et *Braf*^{V600E}*; E4f1*(*Tyr*)KO mice. Insets show images at higher magnification. Scale bar, 100 µm **(D)** Schematic representation of genetic constructs allowing *Nras*^{Q61K} constitutive expression in melanocytes, *E4f1* inactivation in melanocytes upon tamoxifen-induced TyrCreER^{T2} recombination, and mTmG reporter expression. **(E)** Macroscopic observation of *Nras*^{Q61K}*; E4f1*(*Tyr*)CTL et *Nras*^{Q61K}*; E4f1*(*Tyr*)KO mice. *Nras*^{Q61K}*; E4f1*(*Tyr*)KO animals exhibit hair graying compared to control littermates. **(F)** Immunohistochemistry analysis of the GFP reporter on back skin sections prepared from *Nras*^{Q61K}*; E4f1*(*Tyr*)CTL et *Nras*^{Q61K}*; E4f1*(*Tyr*)KO mice. Insets show images at higher magnification. Scale bar, 100 µm

Figure 3. E4f1 regulates MITF and melanin synthesis enzymes expression. (A) Heatmap depicting expression levels across conditions for genes differentially expressed upon *E4f1* depletion (FDR corrected p-value >.1 and leading $\log_2$ fold-change > $\log_2(1.5)$). Data are expressed as row Z-scores collected from five biologically independent experiments per condition. **(B)** Volcano plots depicting the −log10 p-value as a function of the $\log_2$ fold-change in gene expression defined by a differential analysis conducted with *EdgeRto* highlight the effect of *E4f1* depletion. Green and red dots highlight up and down regulated genes, respectively. Blue dots highlight genes annotated as E4F1 targets. **(C)** Evolution of score (ES) along ranking as defined with a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) comparing gene expression fold-change between *E4f1*-depleted and control cells and known E4F1 target genes. 1,000 permutations were performed and the associated Benjamini-Hochberg adjusted

p-value and NES (Normalized Enrichment Score) is provided. **(D)** Immunoblot analysis of E4F1, DLAT, MITF, DCT and ACTIN (loading control) protein levels in Melan-a cells, 10 days after transduction with lentiviral particles encoding an irrelevant ShRNA (ShCTL) or ShRNA targeting *E4f1* (Sh*E4f1*) **(E)** RT-qPCR analysis of *Mitf* and melanin synthesis enzymes mRNA levels in ShCTL and Sh*E4f1* Melan-a cells (mean ± SEM, n=6). **p<0.01. **(F)** RT-qPCR analysis of *Scd1* mRNA level in ShCTL and Sh*E4f1* Melan-a cells (mean ± SEM, n=6). **p<0.01. **(G)** Immunoblot analysis of E4F1, MITF and ACTIN (loading control) protein levels in ShCTL and Sh*E4f1* Melan-a cells, with or without oleate complementation (100 µM, 96h).

Figure 4. *E4f1* depletion impairs Elongator complex function and induces an UPR response. (A) Representative genome browser screenshots of normalized E4f1 ChIP-seq profiles at Elp3 locus. **(B)** Boxplots depicting distribution of absolute normalized gene expression (log_{10} scale) across conditions. Thick horizontal lines depict medians. Lower and upper hinges correspond to first and third quartiles. Upper whisker extends from hinge to largest value no further than 1.5 * IQR from hinge (where IQR is inter-quartile range, or distance between first and third quartiles). Lower whisker extends from hinge to smallest value at most 1.5 * IQR of hinge. Each box depicts average expression distribution across replicates from 2 biologically independent experiments per time-point. **(C)** Immunoblot analysis of E4F1, ELP1, ELP3 and ACTIN (loading control) protein levels in ShCTL and Sh*E4f1* Melan-a cells, 10 days after transduction **(D)** Heatmap depicting expression levels across conditions for a selection of genes encoding for proteins involved in the unfolded protein response and differentially expressed upon *E4f1* depletion (FDR corrected p-value >.1 and leading log_2 fold-change > $log_2(1.5)$). Data are expressed as row Z-scores collected from five biologically independent experiments per condition. **(E)** Relative mRNA levels of genes involved in ER stress/UPR in ShCTL and Sh*E4f1* Melan-a cells (mean ± SEM, n=6). ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05; ns, not significant.

Figure 5. *Elp3* depletion recapitulates the defects on *Mitf* and pigmentation enzymes expression observed in *E4f1*-depleted melanocytes. (A) Immunoblot analysis of ELP3, MITF and ACTIN (loading control) protein levels in Melan-a cells, 7 days after transduction with lentiviral particles encoding an irrelevant ShRNA (ShCTL) or ShRNA targeting *Elp3* (Sh*Elp3*). **(B)** RT-qPCR analysis of *Mitf* mRNA level in ShCTL and Sh*Elp3* Melan-a cells (mean ± SEM, n=3). *p<0.05. **(C)** RT-qPCR analysis of *Tyrosinase* and *Tyrp1* mRNA level in ShCTL and Sh*Elp3* Melan-a cells (mean, n=1). **(D)** Relative mRNA levels of genes involved in ER stress/UPR in ShCTL and Sh*Elp3* Melan-a cells (mean ± SEM, n=3). *p<0.05; ns, not significant. **(E)** Schematic illustration of the mechanism of MITF and melanogenesis regulation by E4F1 in melanocytes.

Figure S1. E4f1 whole-body conditional knock-out induces skin pigmentation defects. (A) Schematic representation of the E4f1^{flox} allele before/after (RERT)CreER^{T2} recombination. **(B)** Macroscopic observation of the tail of *E4f1*(*RERT*)CTL and *E4f1*(*RERT*)KO mice. *E4f1*(*RERT*)KO animals display skin pigmentation defects. **(C)** Immunohistochemistry analysis of the GP100 melanosome marker on tail skin sections prepared from *E4f1*(*RERT*)CTL and *E4f1*(*RERT*)KO mice. Scale bar, 20 µm.

Figure S2. Conditional E4f1 inactivation in melanocytes. (A) Schematic representation of the E4f1^{flox} and mTmG alleles before/after (Tyr)CreER^{T2} recombination. **(B)** Experimental procedure of tamoxifen administration to *E4f1*(*Tyr*)CTL and *E4f1*(*Tyr*)KO mice. 18 days-old mice are shaved and treated with topical application of 2 mg of tamoxifen on back and tail skin (1 application per day for 4 days). Tissues are analyzed one month after treatment (day 50).

Figure S3. E4f1-mediated pigmentation defects are not p53-dependent. (A) Macroscopic observation of *E4f1*(*Tyr*)CTL; p53KO and *E4f1*(*Tyr*)KO; p53KO mice, compared to their *E4f1*(*Tyr*)CTL and *E4f1*(*Tyr*)KO littermates **(B)** Melanin quantification in hairs from *E4f1*(*Tyr*)CTL; p53KO and *E4f1*(*Tyr*)KO; p53KO mice, compared to their *E4f1*(*Tyr*)CTL and *E4f1*(*Tyr*)KO littermates (mean ± SEM, n=8). Hairs from C57Bl/6 and Balb/C mice were used as positive and negative control, respectively. ***p<0.001; ns, not significant.

Figure S4. E4f1-mediated pigmentation defects are not linked to melanocyte stem cells. (A) Long-term macroscopic observation of *E4f1*(*Tyr*)CTL and *E4f1*(*Tyr*)KO, 12 months after *E4f1* inactivation. **(B)** Depilation experiments were performed on *E4f1*(*Tyr*)CTL and *E4f1*(*Tyr*)KO animals. 50 days after *E4f1* inactivation, mice were depilated. Hair regeneration was evaluated 1 month after depilation.

Figure S5. Functional over-representation map depicting Reactome gene sets associated up- and down- regulated genes upon *E4f1* depletion.

Figure 1

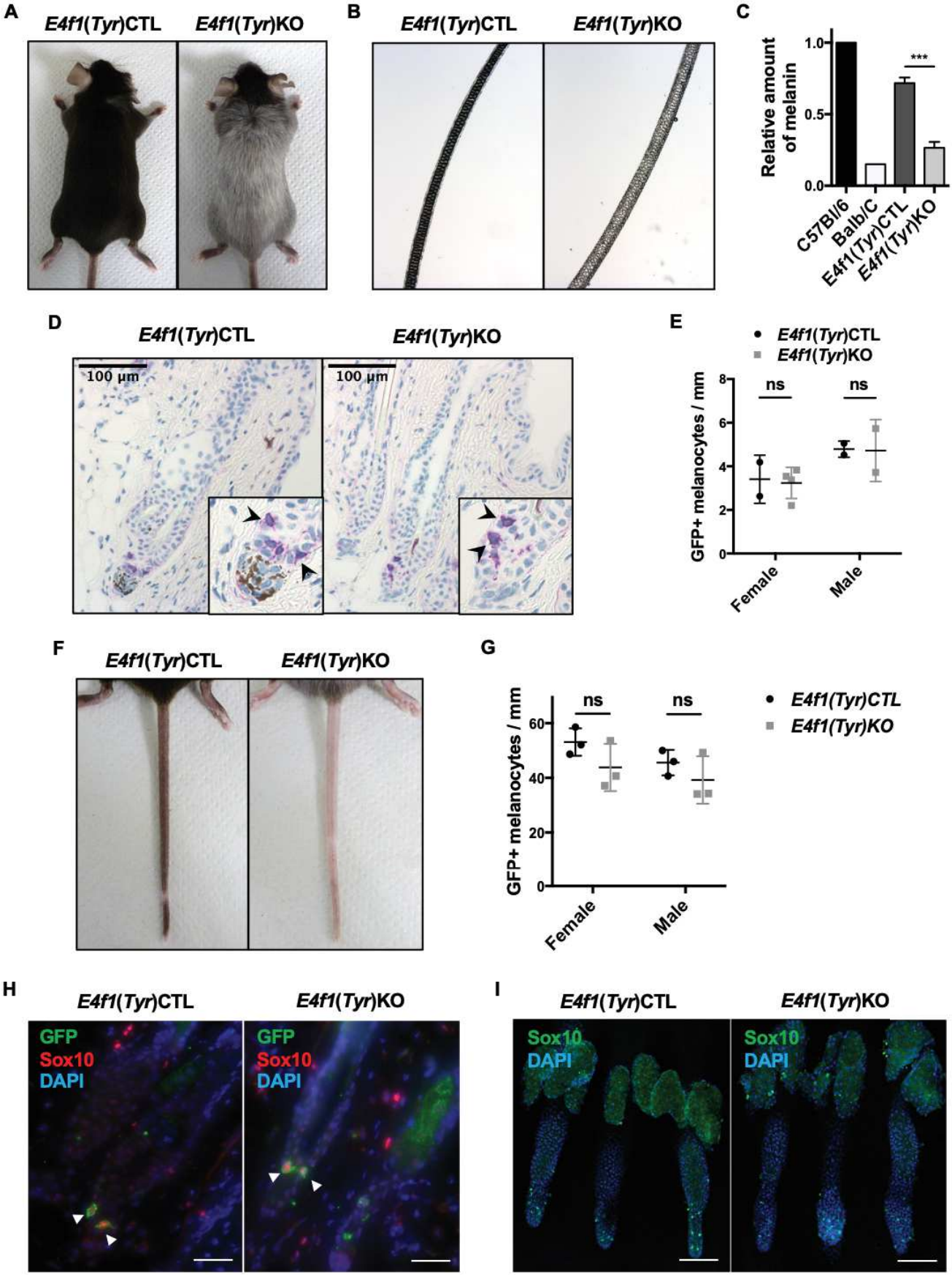

A
E4f1(Tyr)CTL
E4f1(Tyr)KO
B
E4f1(Tyr)CTL
E4f1(Tyr)KO
C
Relative amount of melanin
1.0
0.5
0.0
***
C57Bl/6
Balb/C
E4f1(Tyr)CTL
E4f1(Tyr)KO
D
E4f1(Tyr)CTL
E4f1(Tyr)KO
100 µm
100 µm
E
E4f1(Tyr)CTL
E4f1(Tyr)KO
GFP+ melanocytes / mm
ns
ns
Female
Male
F
E4f1(Tyr)CTL
E4f1(Tyr)KO
G
GFP+ melanocytes / mm
ns
ns
E4f1(Tyr)CTL
E4f1(Tyr)KO
Female
Male
H
E4f1(Tyr)CTL
E4f1(Tyr)KO
GFP
Sox10
DAPI
GFP
Sox10
DAPI
I
E4f1(Tyr)CTL
E4f1(Tyr)KO
Sox10
DAPI
Sox10
DAPI

Figure 2

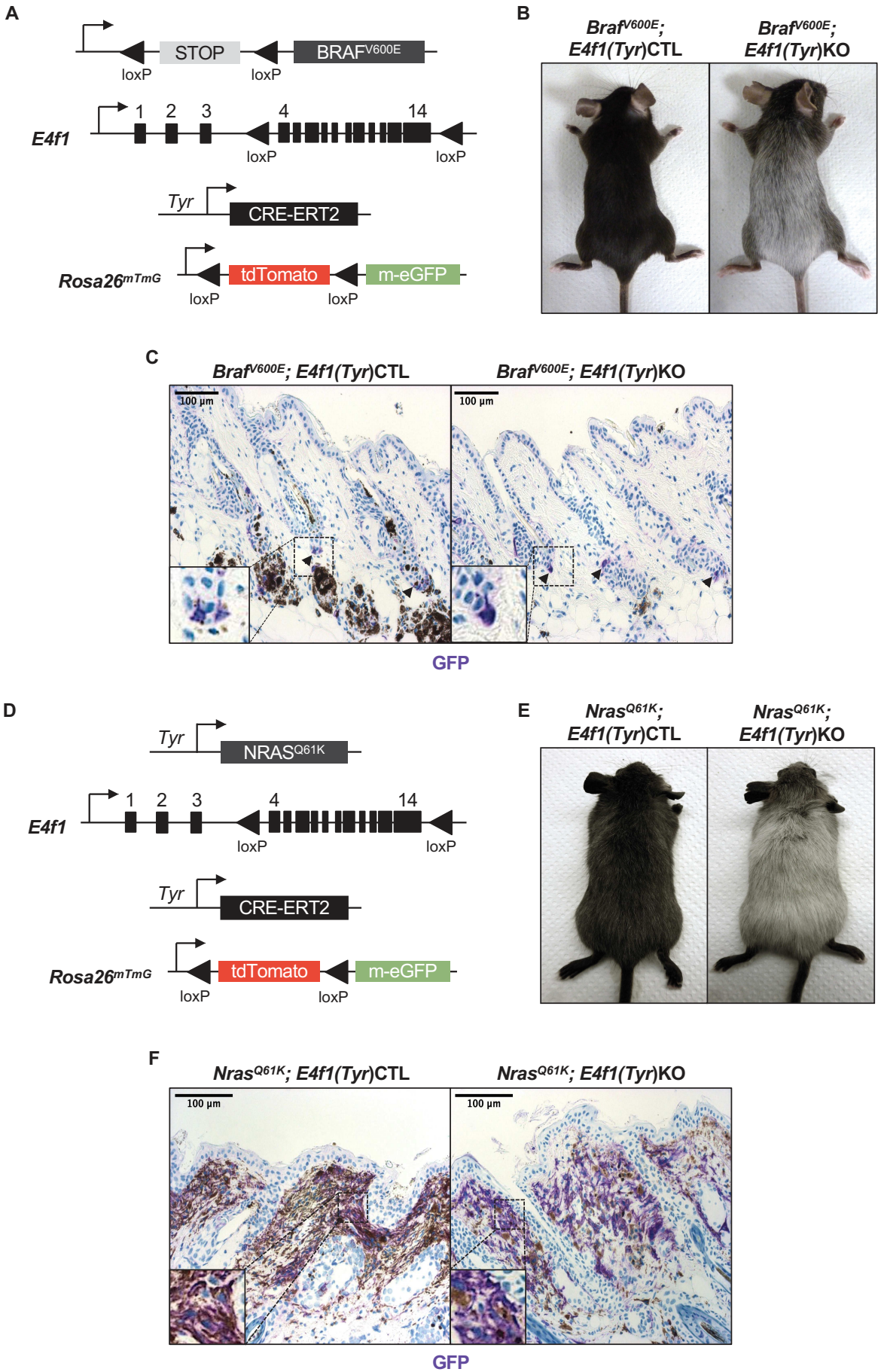

A
STOP
BRAF V600E
loxP
loxP
E4f1
1 2 3 4 14
loxP
loxP
Tyr
CRE-ERT2
Rosa26 mTmG
tdTomato
m-eGFP
loxP
loxP
B
Braf V600E; E4f1(Tyr)CTL
Braf V600E; E4f1(Tyr)KO
C
Braf V600E; E4f1(Tyr)CTL
Braf V600E; E4f1(Tyr)KO
100 µm
100 µm
GFP
D
Tyr
NRAS Q61K
E4f1
1 2 3 4 14
loxP
loxP
Tyr
CRE-ERT2
Rosa26 mTmG
tdTomato
m-eGFP
loxP
loxP
E
Nras Q61K; E4f1(Tyr)CTL
Nras Q61K; E4f1(Tyr)KO
F
Nras Q61K; E4f1(Tyr)CTL
Nras Q61K; E4f1(Tyr)KO
100 µm
100 µm
GFP

Figure 3

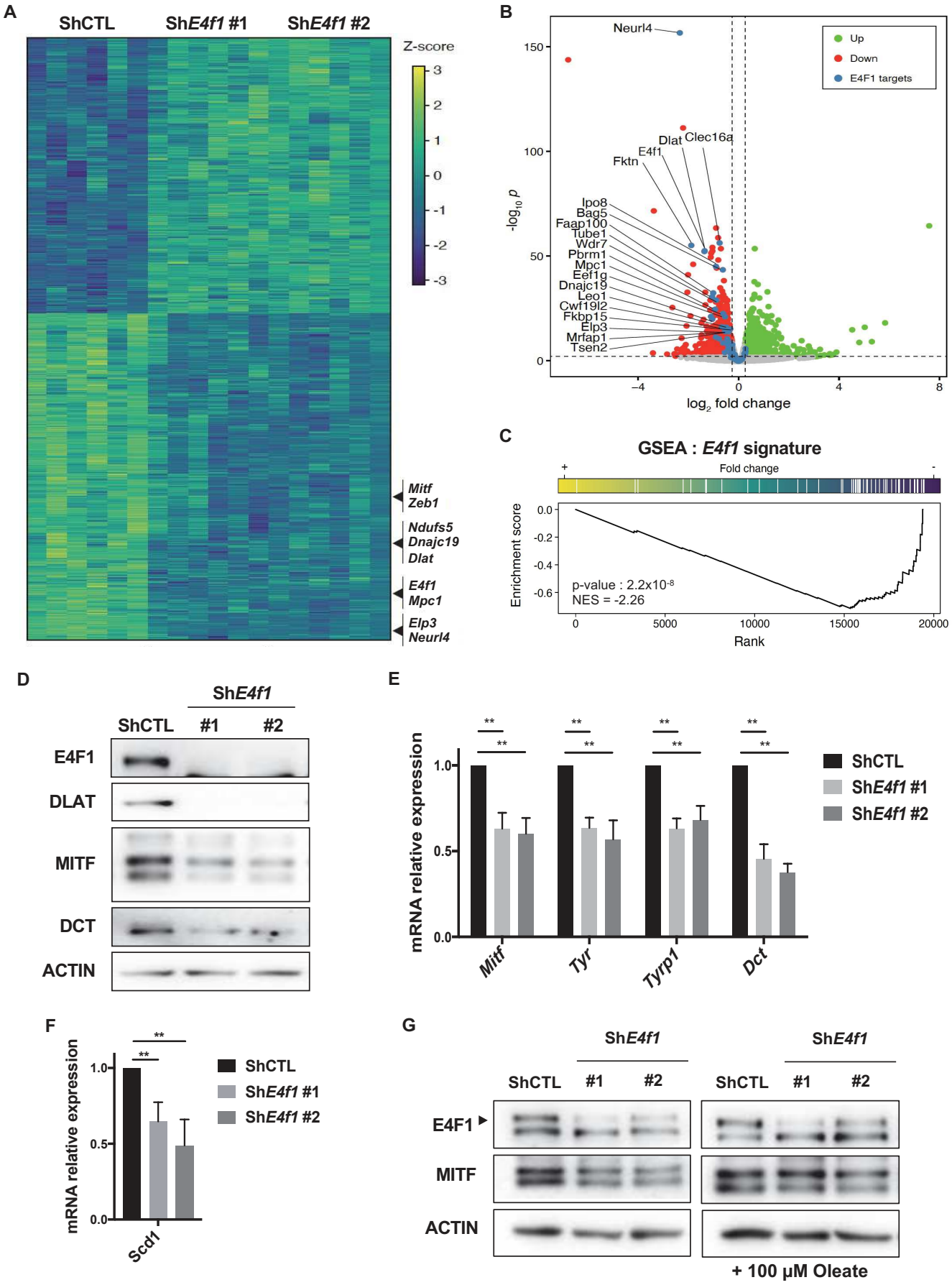

A
ShCTL
ShE4f1 #1
ShE4f1 #2
Z-score
3
2
1
0
-1
-2
-3
Mitf
Zeb1
Ndufs5
Dnajc19
Dlat
E4f1
Mpc1
Elp3
Neurl4
B
Neurl4
Up
Down
E4F1 targets
Dlat
Clec16a
E4f1
Fktn
Ipo8
Bag5
Faap100
Tube1
Wdr7
Pbrm1
Mpc1
Eef1g
Dnajc19
Leo1
Cwf19l2
Fkbp15
Elp3
Mrfap1
Tsen2
-log10 p
log2 fold change
C
GSEA : E4f1 signature
Fold change
Enrichment score
p-value : 2.2x10-8
NES = -2.26
Rank
D
ShE4f1
ShCTL
#1
#2
E4F1
DLAT
MITF
DCT
ACTIN
E
mRNA relative expression
ShCTL
ShE4f1 #1
ShE4f1 #2
Mitf
Tyr
Tyrp1
Dct
F
mRNA relative expression
Scd1
G
ShE4f1
ShCTL
#1
#2
E4F1
MITF
ACTIN
+ 100 µM Oleate

Figure 4

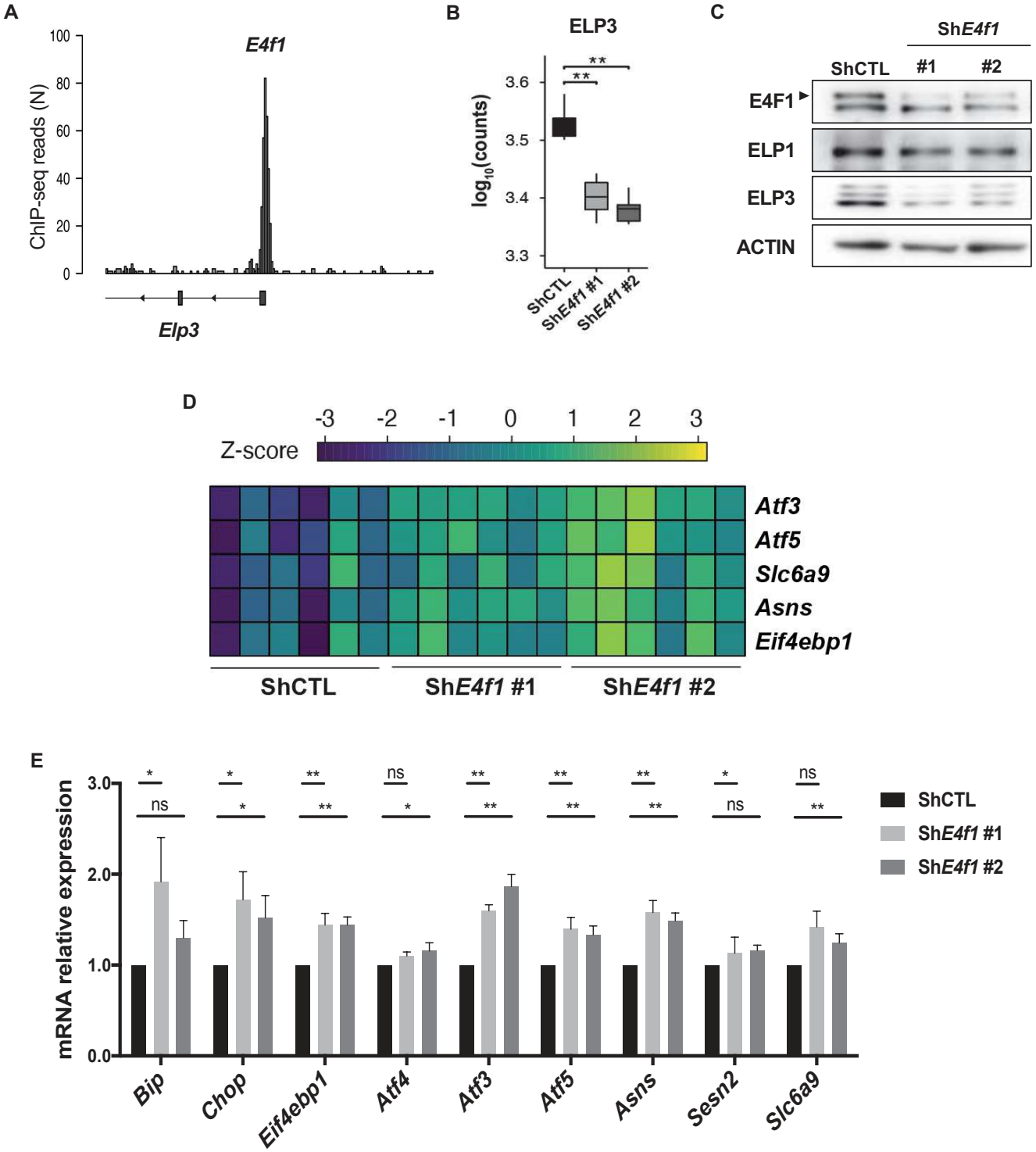
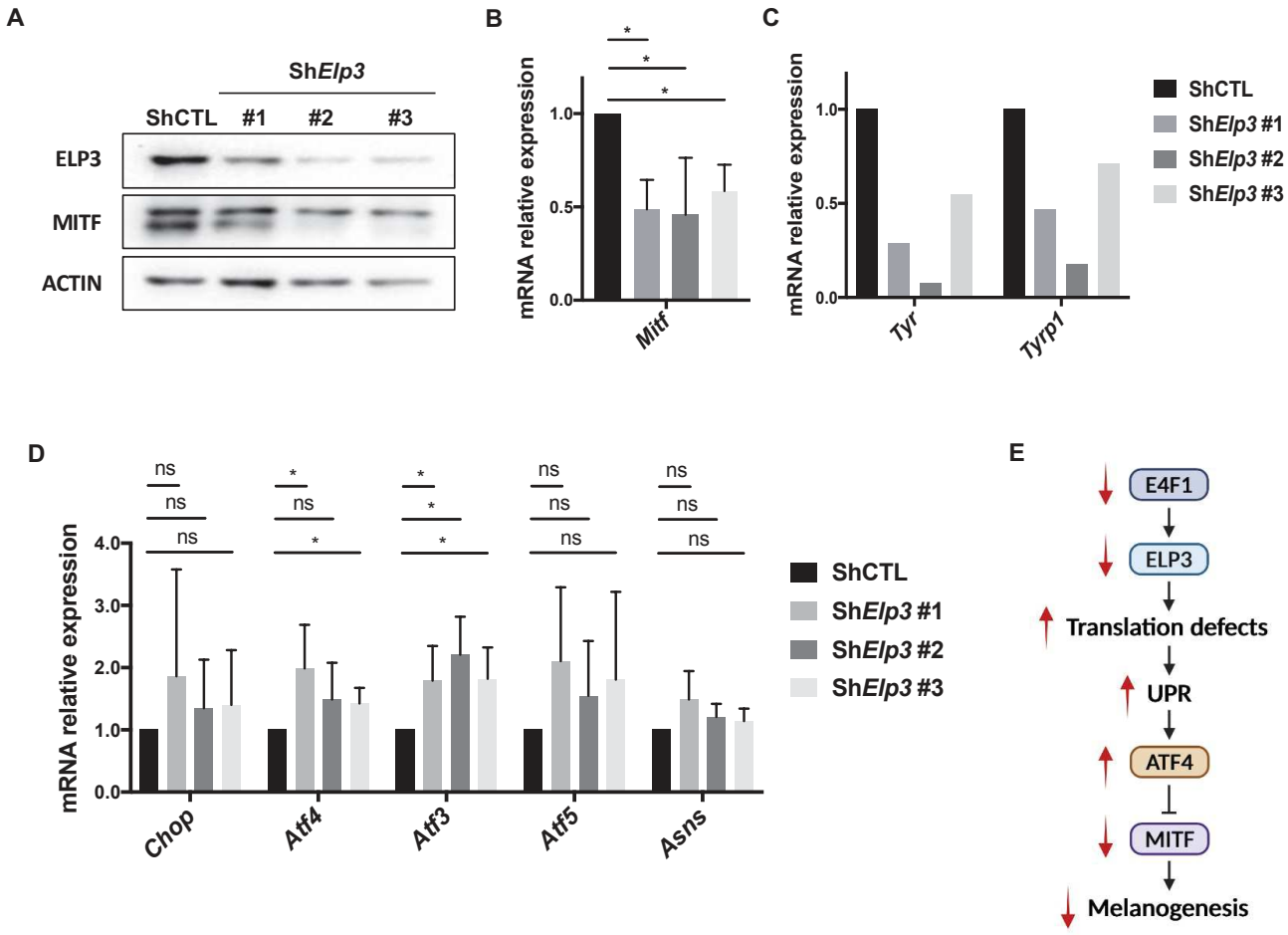
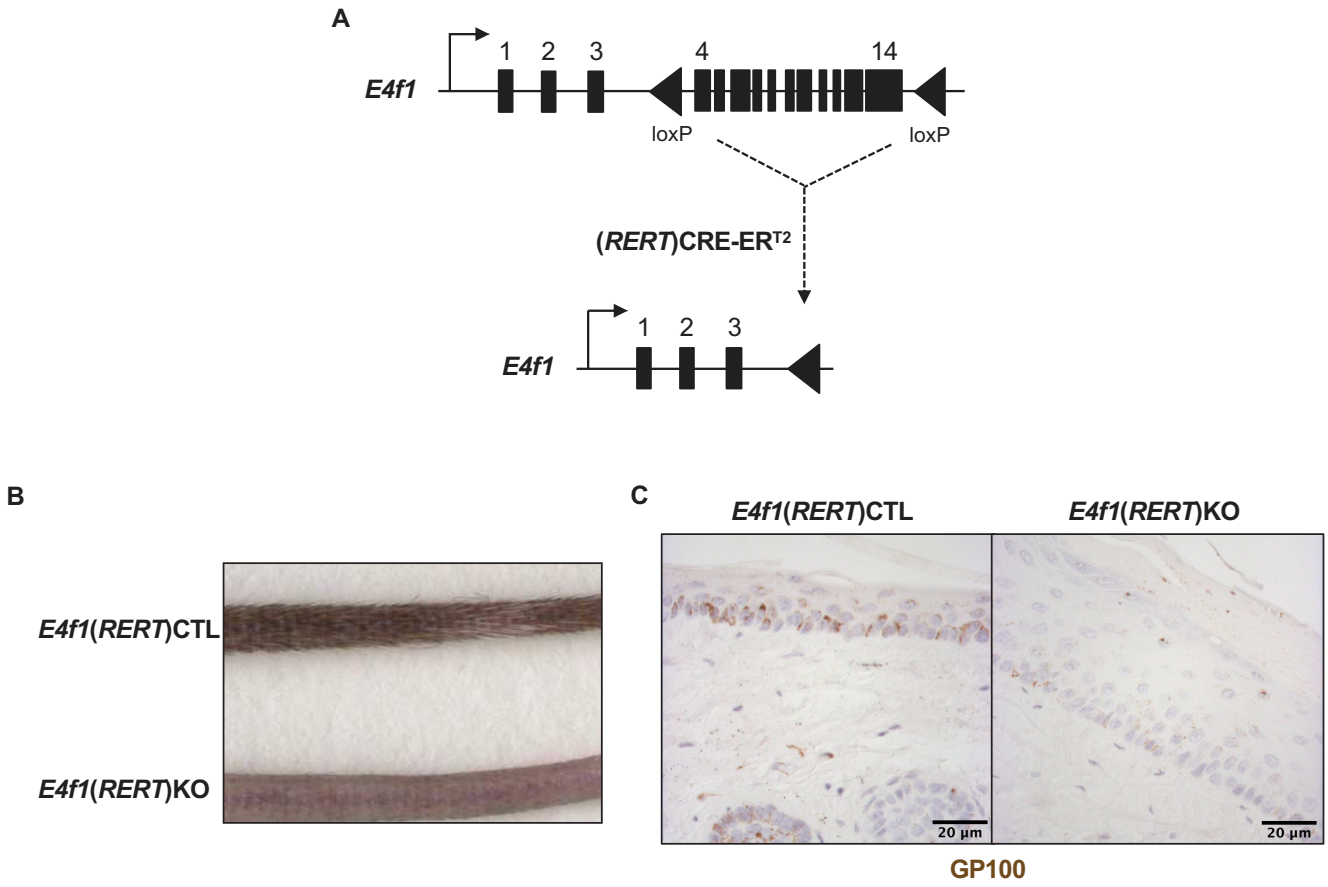

A
E4f1
ChIP-seq reads (N)
100
80
60
40
20
0
Elp3
B
ELP3
log10(counts)
3.6
3.5
3.4
3.3
**
**
ShCTL
ShE4f1 #1
ShE4f1 #2
C
ShE4f1
ShCTL
#1
#2
E4F1
ELP1
ELP3
ACTIN
D
-3
-2
-1
0
1
2
3
Z-score
Atf3
Atf5
Slc6a9
Asns
Eif4ebp1
ShCTL
ShE4f1 #1
ShE4f1 #2
E
mRNA relative expression
3.0
2.0
1.0
0.0
Bip
Chop
Eif4ebp1
Atf4
Atf3
Atf5
Asns
Sesn2
Slc6a9
ShCTL
ShE4f1 #1
ShE4f1 #2

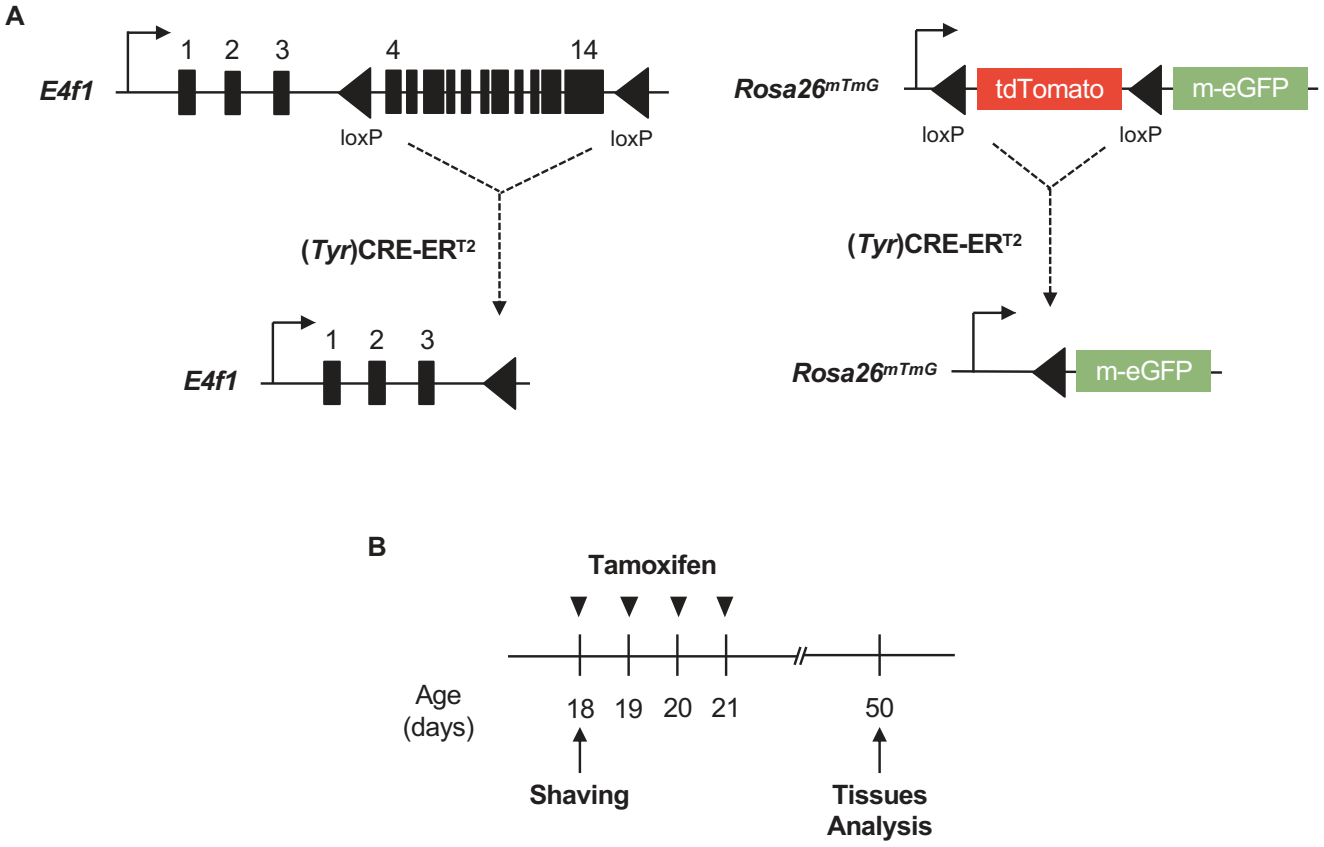
Figure 5


A
ShElp3
ShCTL
#1
#2
#3
ELP3
MITF
ACTIN
B
mRNA relative expression
1.0
0.5
0.0
Mitf
C
mRNA relative expression
1.0
0.5
0.0
Tyr
Tyrp1
ShCTL
ShElp3 #1
ShElp3 #2
ShElp3 #3
D
mRNA relative expression
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
ns
*
Chop
Atf4
Atf3
Atf5
Asns
ShCTL
ShElp3 #1
ShElp3 #2
ShElp3 #3
E
E4F1
ELP3
Translation defects
UPR
ATF4
MITF
Melanogenesis

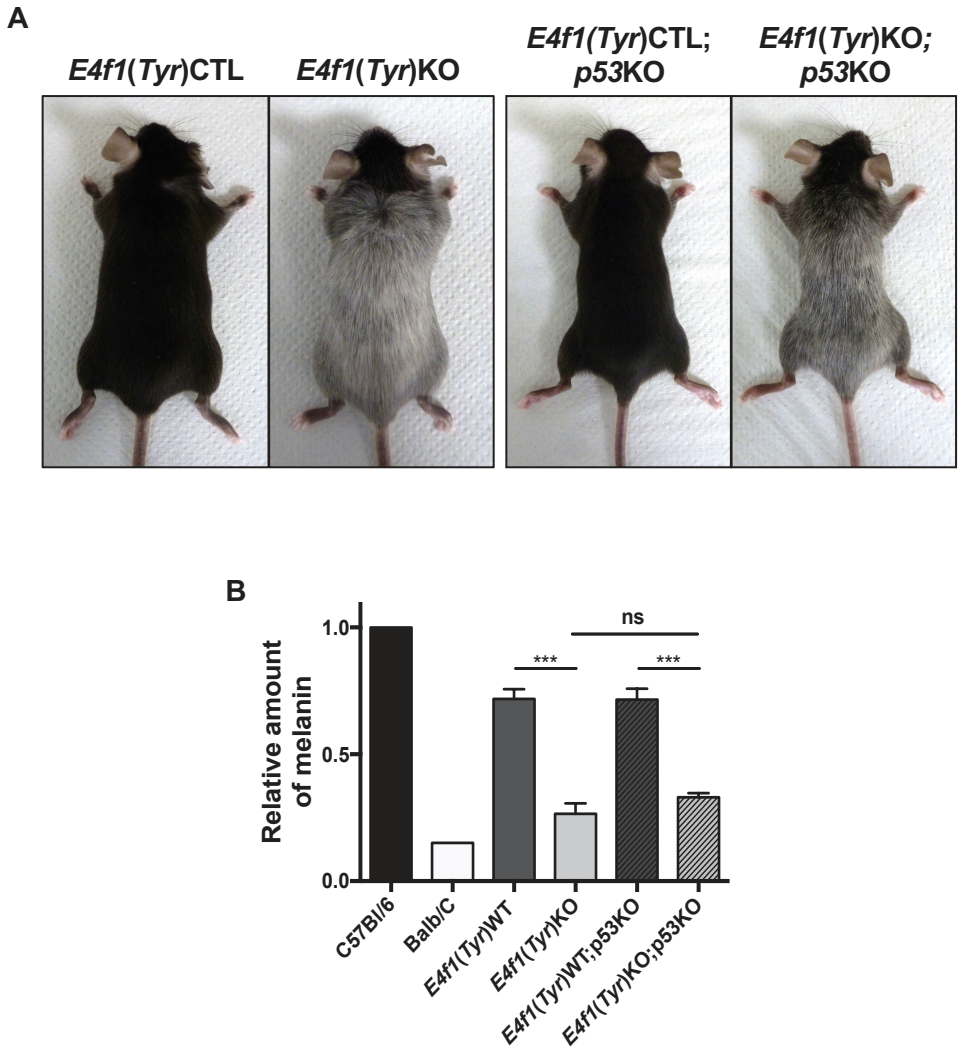
Supplemental Figure S1



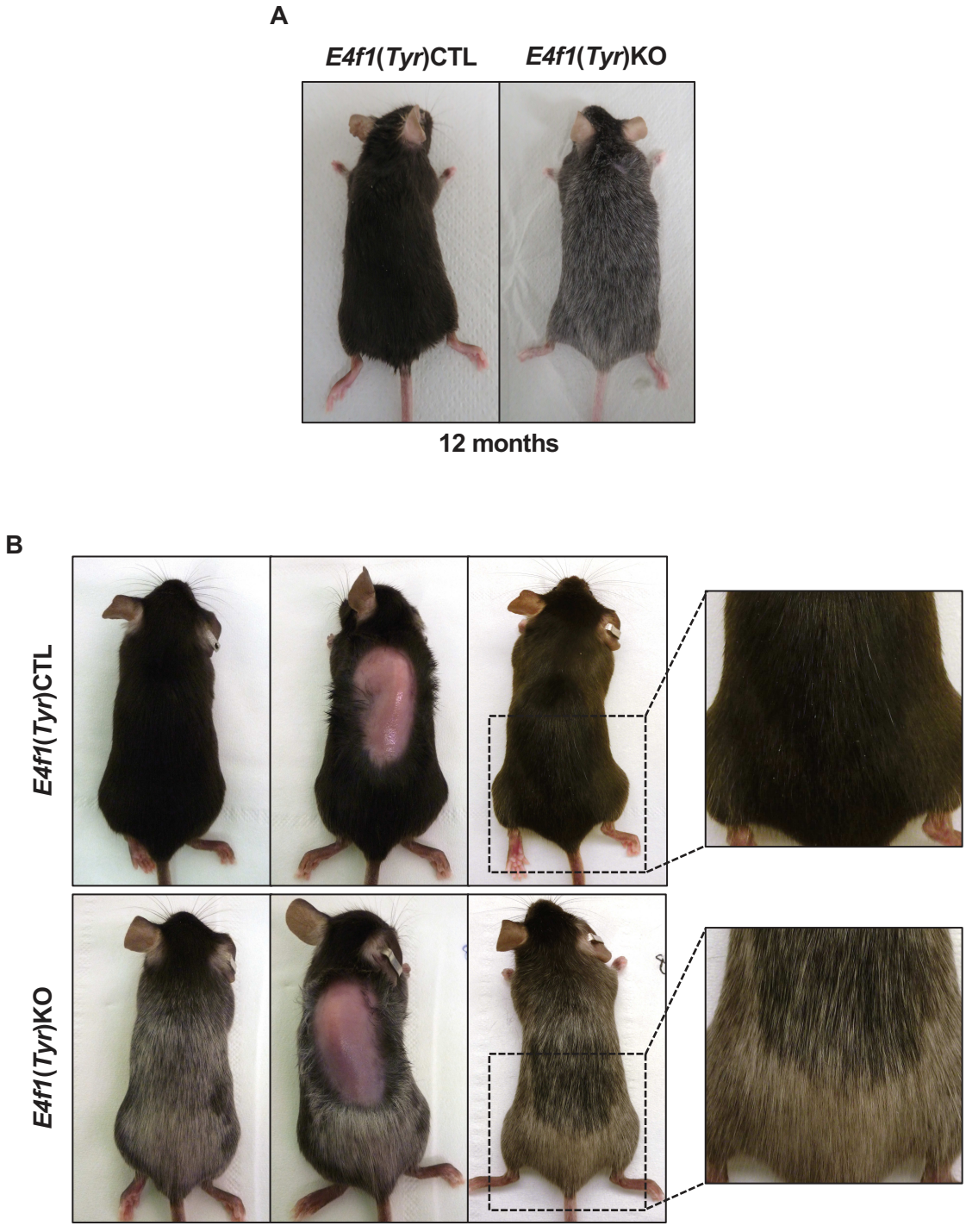
Supplemental Figure S2



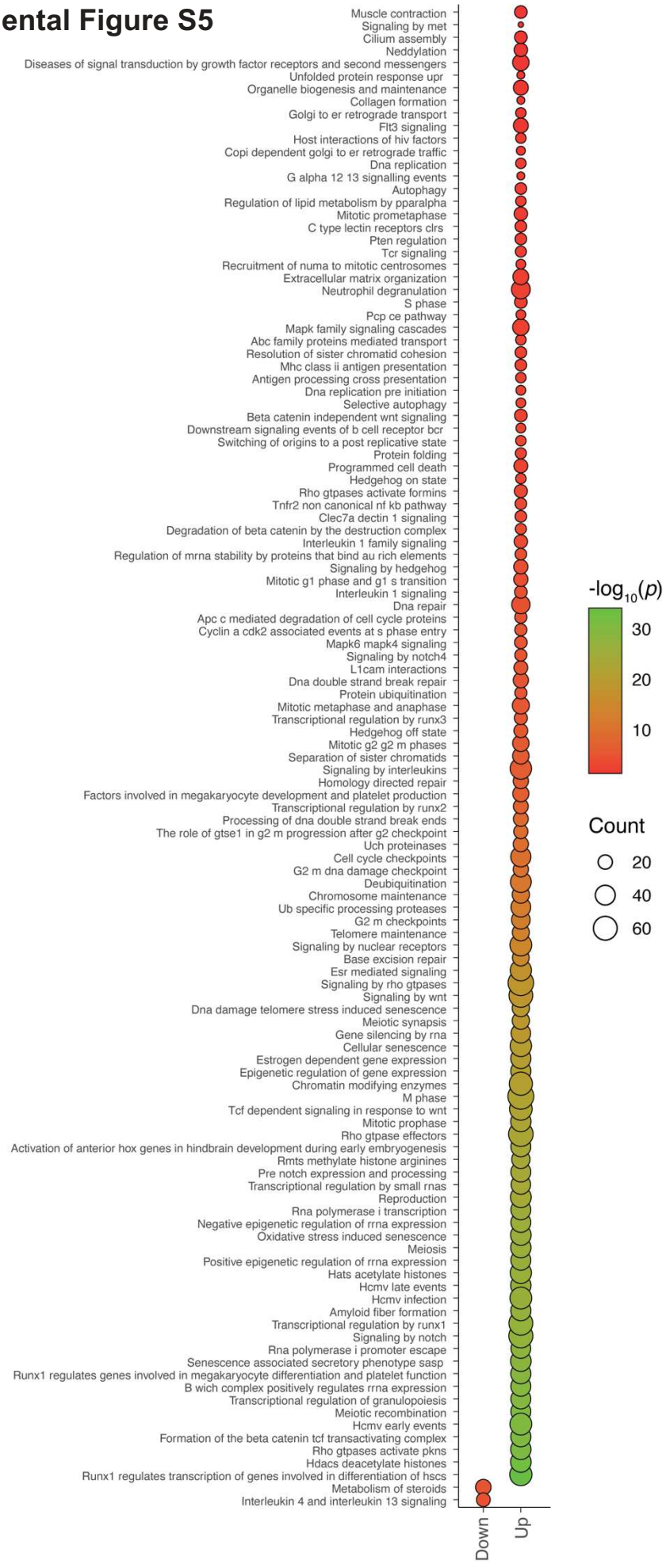
Supplemental Figure S3



Supplemental Figure S4



Supplemental Figure S5



Supplemental Table S1: Top 500 more significantly deregulated genes upon *E4f1* inactivation in Melan-a cells

SYMBOL	logFC	PValue	FDR	Change	SYMBOL	logFC	PValue	FDR	Change
Scn2b	-6,567578	3,69E-139	7,18E-135	DOWN	Isoc2a	-0,686871	4,60E-27	1,28E-24	DOWN
Neurl4	-2,395802	5,88E-129	5,72E-125	DOWN	Atad1	-0,626399	5,13E-27	1,38E-24	DOWN
Fam229b	-2,243919	3,23E-109	2,09E-105	DOWN	Fbxl19	-0,447547	5,07E-27	1,38E-24	DOWN
Hsf2bp	-3,323141	1,06E-76	5,17E-73	DOWN	Pgap2	-0,580674	6,63E-27	1,74E-24	DOWN
E4f1	-1,268806	1,84E-73	7,16E-70	DOWN	Ccnd1	0,586239	6,59E-27	1,74E-24	UP
Mb21d2	-0,890395	9,04E-69	2,93E-65	DOWN	Eogt	-0,785283	1,31E-26	3,35E-24	DOWN
Foxi1	8,030769	7,54E-68	2,09E-64	UP	Socs6	-0,546962	1,30E-26	3,35E-24	DOWN
Fktn	-1,899916	3,80E-64	9,23E-61	DOWN	Camk1g	-1,443256	1,53E-26	3,86E-24	DOWN
Clec16a	-0,805862	1,26E-58	2,72E-55	DOWN	Asb2	0,854399	2,01E-26	5,01E-24	UP
Dlat	-1,369668	7,43E-57	1,44E-53	DOWN	Prpmp5	-2,455256	2,12E-26	5,16E-24	DOWN
Col14a1	-1,090854	2,12E-55	3,75E-52	DOWN	Larp4b	-0,536454	2,10E-26	5,16E-24	DOWN
H1f2	0,755243	6,40E-54	1,04E-50	UP	Rasgrp3	-0,808171	2,87E-26	6,90E-24	DOWN
Foxo4	-0,71139	2,75E-53	4,11E-50	DOWN	Zfp862-ps	-0,666142	3,45E-26	8,18E-24	DOWN
Fgfr2	-1,00631	4,50E-50	6,26E-47	DOWN	Mylip	-0,647978	4,62E-26	1,08E-23	DOWN
Mgat4b	0,628346	7,94E-49	1,03E-45	UP	Ccdc13	-0,750587	4,99E-26	1,15E-23	DOWN
Bag5	-0,622836	4,42E-48	5,38E-45	DOWN	Mmgt1	-0,679719	5,15E-26	1,18E-23	DOWN
Ipo8	-0,862551	1,01E-46	1,16E-43	DOWN	Tubb2a	0,622149	6,86E-26	1,55E-23	UP
Slc27a4	-0,630487	1,30E-45	1,41E-42	DOWN	Imp3	-0,487539	1,00E-25	2,24E-23	DOWN
Tnks2	-0,841727	3,09E-45	3,16E-42	DOWN	Zfp704	-0,886133	1,85E-25	4,10E-23	DOWN
Tnfrsf19	-0,932006	7,28E-43	7,08E-40	DOWN	Smim14	-0,597542	2,95E-25	6,38E-23	DOWN
Rabl6	0,679115	3,51E-41	3,25E-38	UP	Dnlz	-0,400333	2,93E-25	6,38E-23	DOWN
Lamtor3	0,612522	1,88E-40	1,66E-37	UP	Rnf166	0,586746	4,65E-25	9,93E-23	UP
Tube1	-1,091546	1,23E-39	1,04E-36	DOWN	Slbp	-0,472155	6,01E-25	1,27E-22	DOWN
H1f4	1,168773	2,50E-39	2,02E-36	UP	Atf3	0,646659	6,11E-25	1,28E-22	UP
Vrk3	-0,677068	8,23E-39	6,40E-36	DOWN	Cd68	-0,98599	6,69E-25	1,38E-22	DOWN
Kcnj13	-2,015569	1,97E-38	1,47E-35	DOWN	Zbed4	-0,424674	8,15E-25	1,67E-22	DOWN
Armc10	-0,539343	2,66E-38	1,92E-35	DOWN	Cnnm3	-0,58699	3,26E-24	6,60E-22	DOWN
Hipk3	-1,068646	1,12E-37	7,75E-35	DOWN	Meis3	0,533096	3,79E-24	7,60E-22	UP
Aqp6	-2,004674	1,33E-37	8,93E-35	DOWN	Stk25	-0,586655	3,91E-24	7,75E-22	DOWN
H2bc4	0,906206	1,92E-37	1,24E-34	UP	Mesd	-0,380537	4,91E-24	9,65E-22	DOWN
Glb1	-0,631405	5,50E-37	3,45E-34	DOWN	Serpinb9b	0,986872	6,02E-24	1,17E-21	UP
Doc2g	-0,998705	1,85E-36	1,12E-33	DOWN	Eps8	-0,501961	7,88E-24	1,52E-21	DOWN
Phkb	-0,753589	6,50E-36	3,83E-33	DOWN	Wdr82	-0,509878	8,01E-24	1,53E-21	DOWN
Kmt5a	0,672243	3,69E-35	2,11E-32	UP	Kif1bp	-0,621309	8,74E-24	1,65E-21	DOWN
Pbrm1	-0,941045	7,86E-35	4,37E-32	DOWN	Cmtm6	-0,456563	1,99E-23	3,72E-21	DOWN
Csf2rb	-1,992894	2,59E-34	1,40E-31	DOWN	Ttbk1	-1,310541	2,25E-23	4,18E-21	DOWN
Wdr7	-0,984641	4,66E-34	2,45E-31	DOWN	Flrt2	-1,219169	2,77E-23	5,07E-21	DOWN
Eef1g	-0,556677	9,26E-34	4,74E-31	DOWN	Tmem71	0,856049	2,79E-23	5,07E-21	UP
Gpr158	-1,170061	3,86E-33	1,92E-30	DOWN	Crls1	-0,690194	2,86E-23	5,14E-21	DOWN
Tnfrsf21	-0,882606	6,29E-33	3,06E-30	DOWN	Parp11	-0,484805	2,98E-23	5,32E-21	DOWN
Dnajc19	-1,073908	6,76E-33	3,21E-30	DOWN	Sema6d	-0,717034	4,22E-23	7,40E-21	DOWN
Rap2a	-0,578296	1,90E-32	8,81E-30	DOWN	Parvb	0,449903	4,23E-23	7,40E-21	UP
Dnajc18	-0,562826	2,14E-32	9,67E-30	DOWN	A930005H10Rik	-1,105291	5,77E-23	1,00E-20	DOWN
Atp2b1	-0,685847	4,48E-32	1,98E-29	DOWN	Ankrd13b	0,43579	5,93E-23	1,02E-20	UP
H4c8	1,168257	1,06E-31	4,60E-29	UP	St3gal4	-0,495869	6,99E-23	1,19E-20	DOWN
Gpam	-0,512372	1,37E-31	5,80E-29	DOWN	Hist1h4m	1,139709	7,75E-23	1,31E-20	UP
Lrrn4cl	-0,806162	1,74E-31	7,22E-29	DOWN	Slc31a1	-0,543774	8,16E-23	1,37E-20	DOWN
Gas7	-0,898247	2,78E-31	1,13E-28	DOWN	Atf1	-0,608275	8,66E-23	1,44E-20	DOWN
Ttc23	-0,864736	3,31E-31	1,31E-28	DOWN	Pik3cb	-0,447689	1,56E-22	2,57E-20	DOWN
Tulp3	0,558861	3,79E-31	1,48E-28	UP	Ndfip2	0,529071	1,81E-22	2,97E-20	UP
Sparcl1	-1,345991	4,92E-31	1,88E-28	DOWN	Trib1	-0,676842	2,03E-22	3,28E-20	DOWN
Tbc1d13	-0,466778	3,13E-30	1,17E-27	DOWN	Tnfrsf12a	0,655752	2,14E-22	3,44E-20	UP
1110004F10Rik	0,484478	1,75E-29	6,43E-27	UP	Rad52	-0,773036	2,17E-22	3,46E-20	DOWN
Dstyk	-0,609974	1,97E-29	7,09E-27	DOWN	Lrrc8b	-0,722385	3,16E-22	5,00E-20	DOWN
Ssh2	0,597559	4,09E-29	1,45E-26	UP	Cyp39a1	-0,602063	3,75E-22	5,88E-20	DOWN
Faap100	-1,0266	7,12E-29	2,47E-26	DOWN	Sfrp1	-1,068501	5,46E-22	8,50E-20	DOWN
4931406P16Rik	-0,51067	1,40E-28	4,79E-26	DOWN	Adh7	1,255808	7,91E-22	1,22E-19	UP
H2ac6	0,853882	1,95E-28	6,54E-26	UP	Cst6	1,424585	9,72E-22	1,49E-19	UP
Gpsm1	0,584773	2,10E-28	6,93E-26	UP	Aar2	-0,369718	9,96E-22	1,51E-19	DOWN
Cyp4f39	-2,630598	2,20E-28	7,13E-26	DOWN	Wfdc3	-0,883181	1,08E-21	1,63E-19	DOWN
H4c11	1,248152	2,90E-28	9,26E-26	UP	Mpc1	-0,546356	1,12E-21	1,68E-19	DOWN
Prkar2a	-0,774044	3,74E-28	1,17E-25	DOWN	Prb1	-1,88265	1,33E-21	1,97E-19	DOWN
Mapkapk5	0,515643	4,64E-28	1,43E-25	UP	Tmem62	0,578628	1,39E-21	2,04E-19	UP
Zbtb5	-0,521267	8,27E-28	2,51E-25	DOWN	Tsnax	-0,348783	1,46E-21	2,14E-19	DOWN
Sulf2	-0,753338	1,35E-27	4,04E-25	DOWN	Gfap	-1,059186	1,56E-21	2,26E-19	DOWN
Hist1h4n	1,132644	1,75E-27	5,15E-25	UP	Prss12	-0,418609	1,59E-21	2,29E-19	DOWN
Syap1	0,561706	3,03E-27	8,80E-25	UP	D7Ertd443e	-0,81771	1,72E-21	2,46E-19	DOWN
Taz	-0,94069	3,15E-27	9,01E-25	DOWN	Sh3d19	0,412883	1,80E-21	2,55E-19	UP
4833439L19Rik	-0,759198	3,23E-27	9,11E-25	DOWN	Chmp1b	-0,552474	2,33E-21	3,29E-19	DOWN

SYMBOL	logFC	PValue	FDR	Change
Senp8	-1,006719	2,45E-21	3,42E-19	DOWN
Atp11a	-0,573584	3,32E-21	4,61E-19	DOWN
H2bc8	0,853014	4,21E-21	5,81E-19	UP
Gm15583	-0,41067	4,41E-21	6,04E-19	DOWN
Ormdl3	0,422643	8,22E-21	1,12E-18	UP
Rapgef5	-0,922257	9,71E-21	1,31E-18	DOWN
Leo1	-0,505859	9,84E-21	1,32E-18	DOWN
Lsm12	0,478976	1,12E-20	1,49E-18	UP
Rassf1	0,373851	1,70E-20	2,25E-18	UP
Uhmk1	-0,776128	1,80E-20	2,37E-18	DOWN
D630039A03Rik	-1,591332	2,14E-20	2,80E-18	DOWN
Rab12	-0,548194	2,31E-20	2,99E-18	DOWN
Tango2	-0,678387	2,85E-20	3,67E-18	DOWN
Zbtb7c	-0,587894	3,11E-20	3,95E-18	DOWN
Galnt2	-0,354896	3,11E-20	3,95E-18	DOWN
Epb41l5	-0,53795	3,81E-20	4,82E-18	DOWN
Ankrd40	0,393603	4,19E-20	5,25E-18	UP
Dusp3	0,376151	4,35E-20	5,42E-18	UP
Dcc	-1,305996	5,11E-20	6,33E-18	DOWN
Cd99l2	-0,426405	5,18E-20	6,37E-18	DOWN
BC031181	-0,433692	5,96E-20	7,30E-18	DOWN
Sigmar1	-0,59514	6,18E-20	7,51E-18	DOWN
Mtch1	-0,558581	7,74E-20	9,35E-18	DOWN
Ehd4	0,492116	8,85E-20	1,06E-17	UP
Nup50	-0,432681	9,05E-20	1,08E-17	DOWN
Prkcd	0,445789	9,23E-20	1,09E-17	UP
Atl3	-0,606119	9,60E-20	1,13E-17	DOWN
Zyg11b	-0,476391	1,02E-19	1,19E-17	DOWN
5033406O09Rik	0,915046	1,44E-19	1,67E-17	UP
H4c3	1,010443	1,64E-19	1,90E-17	UP
Stx12	-0,39392	1,65E-19	1,90E-17	DOWN
Col4a3	-0,878045	2,05E-19	2,35E-17	DOWN
Efcab6	-0,877019	2,10E-19	2,39E-17	DOWN
Id1	1,009036	2,47E-19	2,79E-17	UP
Hmga2	0,803845	2,63E-19	2,96E-17	UP
Clu	-0,899138	2,91E-19	3,26E-17	DOWN
Cldnd1	-0,657282	3,45E-19	3,83E-17	DOWN
Slc12a2	-0,73346	3,57E-19	3,94E-17	DOWN
Tctn2	-0,451667	3,74E-19	4,11E-17	DOWN
Tln2	-0,383225	4,30E-19	4,70E-17	DOWN
Rab27a	-0,435149	4,96E-19	5,39E-17	DOWN
Ttc39b	0,43917	5,45E-19	5,89E-17	UP
Mmp2	1,106107	5,55E-19	5,97E-17	UP
Il6st	-0,473597	6,06E-19	6,47E-17	DOWN
Cma2	-1,336547	6,79E-19	7,21E-17	DOWN
Mrfap1	-0,667986	7,39E-19	7,81E-17	DOWN
Fam45a	0,482812	8,62E-19	9,07E-17	UP
Slc22a4	0,655721	8,95E-19	9,36E-17	UP
Hmgn3	0,497939	1,16E-18	1,21E-16	UP
H4c12	0,911097	1,34E-18	1,39E-16	UP
Mpc1-ps	-0,630917	1,42E-18	1,46E-16	DOWN
Agpat5	-0,415954	1,44E-18	1,47E-16	DOWN
Sp8	-1,88355	1,58E-18	1,61E-16	DOWN
Ndrg1	-0,511245	1,72E-18	1,75E-16	DOWN
Apopt1	-0,430698	2,20E-18	2,22E-16	DOWN
Rap1a	0,504239	2,25E-18	2,26E-16	UP
Tsn	-0,524638	2,50E-18	2,49E-16	DOWN
Elp3	-0,460731	2,58E-18	2,56E-16	DOWN
Car14	-0,522245	2,82E-18	2,79E-16	DOWN
H2bc6	0,584734	2,85E-18	2,80E-16	UP
Eppk1	-0,788673	2,93E-18	2,86E-16	DOWN
Gab1	-0,644042	3,33E-18	3,22E-16	DOWN
Smad9	0,786643	3,33E-18	3,22E-16	UP
Plekho2	0,434664	3,43E-18	3,30E-16	UP
Olfr90	5,89329	3,54E-18	3,39E-16	UP
Agps	-0,48466	3,84E-18	3,66E-16	DOWN
Tmem117	0,526203	4,12E-18	3,91E-16	UP
Mitf	-0,793571	4,72E-18	4,46E-16	DOWN
Lama4	0,436704	5,46E-18	5,13E-16	UP

SYMBOL	logFC	PValue	FDR	Change
Slc35a5	-0,359785	6,92E-18	6,47E-16	DOWN
Tbc1d1	0,369686	8,05E-18	7,49E-16	UP
Sgpp2	-0,830899	8,33E-18	7,72E-16	DOWN
H2bc15	0,917651	9,19E-18	8,47E-16	UP
Aldh6a1	-0,429768	9,25E-18	8,49E-16	DOWN
Sgms1	-0,471593	9,65E-18	8,81E-16	DOWN
Sfxn3	0,46218	1,35E-17	1,23E-15	UP
9330159M07Rik	1,05904	1,38E-17	1,25E-15	UP
Vmn2r108	5,936003	1,40E-17	1,26E-15	UP
Fkbp15	-0,338835	1,65E-17	1,48E-15	DOWN
Tbc1d16	-0,478168	1,71E-17	1,52E-15	DOWN
Fkbp7	0,527109	1,75E-17	1,56E-15	UP
Zcrb1	0,588229	2,23E-17	1,97E-15	UP
Cdc23	-0,380508	2,26E-17	1,99E-15	DOWN
Tsen2	-0,53892	2,43E-17	2,13E-15	DOWN
Sox6	-0,429624	2,44E-17	2,13E-15	DOWN
H3c14	0,811747	2,49E-17	2,16E-15	UP
Pik3r3	-0,538953	2,51E-17	2,17E-15	DOWN
Rogdi	-0,393558	2,82E-17	2,42E-15	DOWN
Arhgef7	0,392508	2,84E-17	2,44E-15	UP
Tpm4	0,551866	3,24E-17	2,77E-15	UP
Zzef1	-0,451987	4,43E-17	3,76E-15	DOWN
Inpp5a	-0,388128	4,51E-17	3,81E-15	DOWN
Rexo2	0,404509	4,63E-17	3,90E-15	UP
Asph	0,505913	5,80E-17	4,87E-15	UP
Brca1	-0,707261	6,02E-17	5,02E-15	DOWN
H4c2	0,98098	6,10E-17	5,07E-15	UP
Bcl2l11	-0,577568	6,29E-17	5,21E-15	DOWN
Actr2	0,415058	6,73E-17	5,55E-15	UP
Aldh16a1	-0,604987	6,88E-17	5,64E-15	DOWN
Mier2	0,402744	7,53E-17	6,15E-15	UP
Myrip	-0,663033	7,89E-17	6,42E-15	DOWN
Tcta	0,457739	8,34E-17	6,76E-15	UP
Grm1	1,784761	8,76E-17	7,07E-15	UP
Slc8a3	-0,865214	8,90E-17	7,15E-15	DOWN
Dpp8	-0,439421	9,13E-17	7,31E-15	DOWN
Tmem151a	0,934384	9,29E-17	7,41E-15	UP
Zmat2	-0,400864	1,14E-16	9,06E-15	DOWN
Dok5	0,511632	1,31E-16	1,04E-14	UP
Pdlim7	0,498659	1,50E-16	1,18E-14	UP
Igf2bp2	0,324228	1,65E-16	1,29E-14	UP
Plp2	1,032728	1,81E-16	1,41E-14	UP
Copg2	-0,44073	1,88E-16	1,46E-14	DOWN
Ptges3	-0,36042	1,90E-16	1,47E-14	DOWN
Inafm2	0,434005	1,95E-16	1,51E-14	UP
Cavin1	0,863655	1,96E-16	1,51E-14	UP
Trappc12	-0,368717	2,25E-16	1,72E-14	DOWN
H4c1	0,984597	2,35E-16	1,79E-14	UP
Ptgds	-0,491052	2,81E-16	2,13E-14	DOWN
Eif4e3	0,577282	2,91E-16	2,21E-14	UP
Etv4	0,823725	3,14E-16	2,37E-14	UP
Stimate	0,521681	3,44E-16	2,58E-14	UP
Uspl1	-0,412827	3,73E-16	2,79E-14	DOWN
Nrp1	-0,464073	3,85E-16	2,87E-14	DOWN
Rad50	-0,599972	3,94E-16	2,92E-14	DOWN
S100b	-0,589055	4,30E-16	3,18E-14	DOWN
Hsd17b11	-0,358158	4,51E-16	3,33E-14	DOWN
D830031N03Rik	-0,717012	5,03E-16	3,69E-14	DOWN
Prkcq	-0,612059	5,22E-16	3,82E-14	DOWN
Pxdn	0,514871	5,56E-16	4,05E-14	UP
Tug1	-0,588304	5,65E-16	4,10E-14	DOWN
Tagln2	0,595441	5,88E-16	4,25E-14	UP
Anxa11	0,335061	6,33E-16	4,56E-14	UP
Dgki	-0,689051	6,42E-16	4,60E-14	DOWN
Srxn1	0,688712	6,77E-16	4,84E-14	UP
Cdyl2	-0,543548	7,01E-16	4,99E-14	DOWN
Dusp22	0,365862	7,03E-16	4,99E-14	UP
Nars2	0,464614	7,18E-16	5,08E-14	UP
4933434E20Rik	0,44038	7,63E-16	5,38E-14	UP

SYMBOL	logFC	PValue	FDR	Change
Cs	-0,381852	7,93E-16	5,57E-14	DOWN
Pdk1	-0,656485	8,46E-16	5,92E-14	DOWN
Arl6ip1	-0,425244	8,70E-16	6,06E-14	DOWN
Cdh1	-1,116618	9,45E-16	6,54E-14	DOWN
Wnk2	-0,649847	9,45E-16	6,54E-14	DOWN
Alpl	-0,97292	9,50E-16	6,55E-14	DOWN
Gm8882	-2,115265	9,59E-16	6,59E-14	DOWN
LOC100502592	-1,841553	1,09E-15	7,47E-14	DOWN
Esrra	0,342438	1,13E-15	7,70E-14	UP
H3c4	1,017497	1,17E-15	7,96E-14	UP
C3	-1,39706	1,20E-15	8,14E-14	DOWN
Tmem183a	0,463564	1,22E-15	8,22E-14	UP
Mgat5	-0,534495	1,44E-15	9,71E-14	DOWN
Tspan7	0,357059	1,51E-15	1,02E-13	UP
Ppp2r3a	-0,490927	1,53E-15	1,02E-13	DOWN
Msantd4	-0,637587	1,76E-15	1,17E-13	DOWN
Pdcd4	-0,469411	1,95E-15	1,30E-13	DOWN
Mrps6	0,441435	2,15E-15	1,42E-13	UP
Cept1	-0,479832	2,21E-15	1,45E-13	DOWN
Slc25a25	0,372801	2,43E-15	1,59E-13	UP
Fmnl2	-0,449771	2,45E-15	1,60E-13	DOWN
Pdpr	-0,713669	2,58E-15	1,68E-13	DOWN
Mrs2	-0,39196	2,73E-15	1,77E-13	DOWN
Abcd1	-0,431082	2,80E-15	1,82E-13	DOWN
Bbs7	0,596344	2,86E-15	1,85E-13	UP
Purb	-0,499892	2,89E-15	1,86E-13	DOWN
Bnc2	-0,486317	2,89E-15	1,86E-13	DOWN
Gng7	-0,354625	3,19E-15	2,04E-13	DOWN
Cyb5r4	0,458717	3,46E-15	2,21E-13	UP
Fsip2	5,244589	3,83E-15	2,43E-13	UP
Mtmr9	-0,353458	4,05E-15	2,57E-13	DOWN
Inip	-0,397761	4,33E-15	2,73E-13	DOWN
Pnpla3	0,628235	4,33E-15	2,73E-13	UP
Hsd11b1	0,557619	4,65E-15	2,92E-13	UP
Itga8	0,473022	4,95E-15	3,10E-13	UP
Arc	0,913885	5,26E-15	3,28E-13	UP
Cebpd	-0,808237	6,13E-15	3,81E-13	DOWN
Gpld1	-0,390486	6,15E-15	3,81E-13	DOWN
Ccn1	0,744573	7,38E-15	4,56E-13	UP
Bin1	0,35618	7,47E-15	4,60E-13	UP
Wipi1	0,474082	7,65E-15	4,70E-13	UP
Rcsd1	-0,645299	7,84E-15	4,80E-13	DOWN
Crat	0,332832	8,02E-15	4,89E-13	UP
Slc25a40	0,393867	9,23E-15	5,61E-13	UP
Scube1	-0,981195	9,59E-15	5,81E-13	DOWN
Pdk2	-0,401095	9,72E-15	5,87E-13	DOWN
Akap11	-0,503983	9,95E-15	5,99E-13	DOWN
Lasp1	0,427536	1,03E-14	6,17E-13	UP
Abi2	-0,400402	1,04E-14	6,24E-13	DOWN
Gm13539	-1,034106	1,09E-14	6,53E-13	DOWN
Coq8a	-0,575324	1,11E-14	6,59E-13	DOWN
Camsap1	0,34359	1,14E-14	6,74E-13	UP
Cat	0,400597	1,19E-14	7,03E-13	UP
Scamp5	-0,329196	1,20E-14	7,06E-13	DOWN
Smtnl2	-0,505312	1,22E-14	7,17E-13	DOWN
Tspan10	-0,360022	1,23E-14	7,21E-13	DOWN
Maf1	-0,312439	1,27E-14	7,41E-13	DOWN
Agpat3	0,317089	1,37E-14	7,98E-13	UP
Rab11fip2	-0,526035	1,62E-14	9,42E-13	DOWN
Prl2c2	0,984794	2,06E-14	1,19E-12	UP
Esd	0,529375	2,15E-14	1,24E-12	UP
Rasl10b	-0,793833	2,16E-14	1,25E-12	DOWN
Npnt	-0,455102	2,18E-14	1,25E-12	DOWN
Cp	-0,888475	2,31E-14	1,32E-12	DOWN
Nol4l	0,508052	2,36E-14	1,34E-12	UP
Gucy2f	-0,842078	2,41E-14	1,37E-12	DOWN
Tiparp	-0,510278	2,46E-14	1,39E-12	DOWN
Csnk1g3	-0,314876	2,55E-14	1,44E-12	DOWN
Rhoc	0,353697	2,54E-14	1,44E-12	UP
Rgs16	0,490129	2,75E-14	1,55E-12	UP
Map1lc3b	0,353074	2,78E-14	1,56E-12	UP
Spryd3	0,346927	3,01E-14	1,68E-12	UP
Tspan5	-0,457326	3,37E-14	1,88E-12	DOWN
Ptpn4	-0,57423	3,61E-14	2,00E-12	DOWN
Npr1	-0,550679	3,90E-14	2,16E-12	DOWN
Cdr2	0,518962	4,00E-14	2,21E-12	UP
4930402H24Rik	0,463691	4,28E-14	2,36E-12	UP
Csf2rb2	-1,053201	4,36E-14	2,40E-12	DOWN
C4b	-1,011331	4,44E-14	2,44E-12	DOWN
Smyd5	0,961211	4,53E-14	2,47E-12	UP
Arhgap18	-0,577671	4,79E-14	2,60E-12	DOWN
Avl9	-0,536573	4,80E-14	2,60E-12	DOWN
Lysmd1	-0,388251	4,79E-14	2,60E-12	DOWN
Cwf19l2	-0,635274	4,94E-14	2,67E-12	DOWN
Sptlc2	-0,425107	5,25E-14	2,83E-12	DOWN
Inava	-0,968225	5,34E-14	2,87E-12	DOWN
9330154J02Rik	-2,050235	5,38E-14	2,88E-12	DOWN
Ap1m1	-0,394048	5,47E-14	2,92E-12	DOWN
Ncbp3	-0,303363	5,70E-14	3,04E-12	DOWN
Sdk1	-0,607162	5,87E-14	3,12E-12	DOWN
Dipk1a	-0,38518	6,15E-14	3,26E-12	DOWN
Hspb8	0,337739	6,33E-14	3,35E-12	UP
Gm5526	0,461351	6,55E-14	3,45E-12	UP
Abat	-0,448221	6,80E-14	3,57E-12	DOWN
Hist1h2bq	0,897411	7,15E-14	3,75E-12	UP
Usp38	-0,379627	7,59E-14	3,97E-12	DOWN
Lrrc61	-0,515449	7,71E-14	4,02E-12	DOWN
Ergic3	-0,31714	8,13E-14	4,23E-12	DOWN
S1pr2	0,344323	8,39E-14	4,35E-12	UP
Gbp2	0,496015	8,46E-14	4,38E-12	UP
Rhob	0,505036	8,56E-14	4,41E-12	UP
Spaar	0,556841	8,71E-14	4,48E-12	UP
9130008F23Rik	0,590031	8,76E-14	4,50E-12	UP
Ubl7	-0,544799	9,01E-14	4,61E-12	DOWN
Sh3bp4	-0,423624	9,45E-14	4,82E-12	DOWN
Ift122	-0,312932	9,68E-14	4,93E-12	DOWN
H2ac8	0,800202	9,70E-14	4,93E-12	UP
Pip5k1c	0,270794	9,81E-14	4,96E-12	UP
Itprip	0,442514	9,82E-14	4,96E-12	UP
Mtmr6	-0,339495	9,97E-14	5,02E-12	DOWN
Gm3147	1,406289	1,02E-13	5,11E-12	UP
Mindy3	-0,293914	1,10E-13	5,51E-12	DOWN
Get4	0,422236	1,15E-13	5,75E-12	UP
Vcpkmt	0,466418	1,18E-13	5,86E-12	UP
Ccpg1	-0,345997	1,22E-13	6,04E-12	DOWN
Znrf1	0,486751	1,28E-13	6,36E-12	UP
Mrvi1	-0,925406	1,31E-13	6,50E-12	DOWN
Gpr143	-0,395814	1,34E-13	6,63E-12	DOWN
Icam1	-0,709751	1,36E-13	6,68E-12	DOWN
Atp1b2	-0,597641	1,40E-13	6,88E-12	DOWN
March5	-0,351355	1,47E-13	7,20E-12	DOWN
Ly6g6f	-1,071372	1,49E-13	7,28E-12	DOWN
Lclat1	-0,375826	1,58E-13	7,69E-12	DOWN
Secisbp2l	-0,361671	1,58E-13	7,69E-12	DOWN
Trim16	0,532074	1,78E-13	8,65E-12	UP
Hist1h2br	0,900449	1,89E-13	9,15E-12	UP
Taf12	0,319285	2,08E-13	1,00E-11	UP
Fam20b	-0,459856	2,18E-13	1,05E-11	DOWN
Slc24a4	-0,855122	2,26E-13	1,08E-11	DOWN
Bbc3	0,559156	2,33E-13	1,11E-11	UP
Prdm4	0,336278	2,33E-13	1,12E-11	UP
Sp4	-0,588912	2,45E-13	1,17E-11	DOWN
Slc30a4	-0,496561	2,54E-13	1,21E-11	DOWN
Prkd3	-0,442079	2,62E-13	1,24E-11	DOWN
Hfe	-0,384217	2,67E-13	1,27E-11	DOWN
Aqp8	-0,95488	2,77E-13	1,31E-11	DOWN
Alg10b	-0,573293	2,84E-13	1,34E-11	DOWN
Sox12	0,359424	2,93E-13	1,38E-11	UP

SYMBOL	logFC	PValue	FDR	Change
C4a	-0,879851	3,04E-13	1,42E-11	DOWN
Smad3	-0,515658	3,07E-13	1,44E-11	DOWN
Nmnat2	-0,823447	3,11E-13	1,45E-11	DOWN
Nr4a3	-0,994345	3,18E-13	1,48E-11	DOWN
Cdr2l	0,357727	3,39E-13	1,57E-11	UP
Ttc21a	-0,613494	3,41E-13	1,58E-11	DOWN
Mfsd8	-0,488076	3,58E-13	1,65E-11	DOWN
Dpp7	-0,321338	3,83E-13	1,77E-11	DOWN
Flna	0,455162	4,09E-13	1,88E-11	UP
Ephx1	-0,52449	4,16E-13	1,91E-11	DOWN
Hmox1	0,64872	4,30E-13	1,97E-11	UP
Ccng2	-0,399619	4,32E-13	1,97E-11	DOWN
Ctsb	0,432397	4,46E-13	2,03E-11	UP
Itpkb	-0,47077	4,54E-13	2,06E-11	DOWN
Cdc123	-0,365784	4,67E-13	2,12E-11	DOWN
Atp13a5	-1,037179	4,92E-13	2,22E-11	DOWN
Col5a1	0,560485	4,94E-13	2,23E-11	UP
Oas1g	1,13763	5,12E-13	2,31E-11	UP
Heca	-0,512519	5,30E-13	2,38E-11	DOWN
Ly6a	0,94254	5,45E-13	2,44E-11	UP
Sgsh	-0,38095	5,56E-13	2,48E-11	DOWN
Usp37	-0,426837	5,64E-13	2,51E-11	DOWN
Alg2	0,281245	5,62E-13	2,51E-11	UP
Slc35g1	0,392688	5,65E-13	2,51E-11	UP
Elf2	0,324554	5,89E-13	2,61E-11	UP
Rnf152	-0,918935	5,97E-13	2,64E-11	DOWN
H2-K1	0,66987	6,36E-13	2,80E-11	UP
Dpy30	-0,390662	7,00E-13	3,08E-11	DOWN
Chd3	-0,319857	7,22E-13	3,17E-11	DOWN
Pcdhga1	-0,482444	7,85E-13	3,44E-11	DOWN
Fntb	-0,325476	8,22E-13	3,59E-11	DOWN
Tmem8	0,547282	8,37E-13	3,65E-11	UP
Myl6	0,379793	8,58E-13	3,73E-11	UP
Fndc3a	-0,407862	8,97E-13	3,89E-11	DOWN
Plekhj1	-0,295155	9,09E-13	3,94E-11	DOWN
Neto2	0,712384	9,13E-13	3,95E-11	UP
Ndst1	-0,386234	9,21E-13	3,97E-11	DOWN
Josd1	0,300431	9,24E-13	3,98E-11	UP
Kcns1	2,635986	9,43E-13	4,05E-11	UP
Impdh1	0,322018	1,01E-12	4,33E-11	UP
Card19	0,373957	1,02E-12	4,38E-11	UP
Kiz	-0,439936	1,04E-12	4,45E-11	DOWN
Hif1a	-0,610967	1,05E-12	4,46E-11	DOWN
Zfp770	-0,587547	1,07E-12	4,52E-11	DOWN
Snx7	0,452567	1,07E-12	4,52E-11	UP
Farp2	-0,492568	1,08E-12	4,55E-11	DOWN
Zhx2	-0,478516	1,11E-12	4,70E-11	DOWN
Gpr157	-0,565888	1,12E-12	4,73E-11	DOWN
Mtap	0,400169	1,15E-12	4,81E-11	UP
Vgll3	0,735445	1,15E-12	4,81E-11	UP
Ssr1	-0,326684	1,18E-12	4,93E-11	DOWN
Ptges3-ps	-0,370614	1,21E-12	5,04E-11	DOWN
BC029722	-0,3853	1,27E-12	5,30E-11	DOWN
Jmjd8	-0,368517	1,28E-12	5,34E-11	DOWN
Camsap3	-0,785348	1,29E-12	5,37E-11	DOWN
Plin2	0,325907	1,30E-12	5,37E-11	UP
H4c9	0,683967	1,30E-12	5,38E-11	UP
Elovl7	-0,539405	1,31E-12	5,39E-11	DOWN
Calcoco1	-0,408492	1,34E-12	5,52E-11	DOWN
Asns	0,437992	1,36E-12	5,58E-11	UP
Vdr	0,48318	1,37E-12	5,63E-11	UP
Pabpn1l	-0,694177	1,40E-12	5,70E-11	DOWN
C1rl	-0,4035	1,42E-12	5,80E-11	DOWN
Trmt2b	-0,338516	1,48E-12	6,04E-11	DOWN
Fam107b	-0,319158	1,50E-12	6,11E-11	DOWN
Ttc7b	-0,312655	1,54E-12	6,26E-11	DOWN
Zhx3	-0,366945	1,76E-12	7,13E-11	DOWN
Anxa1	0,820102	1,82E-12	7,33E-11	UP
Scpep1	0,36411	1,84E-12	7,39E-11	UP
Plxnd1	0,492243	1,87E-12	7,50E-11	UP
Gclm	0,74444	1,89E-12	7,59E-11	UP
Inka1	0,523168	1,92E-12	7,67E-11	UP
Lipa	0,445569	1,94E-12	7,73E-11	UP
Tmem191c	-0,438337	1,98E-12	7,90E-11	DOWN
Zfat	-0,373744	2,00E-12	7,97E-11	DOWN
Cdc25a	0,279788	2,13E-12	8,46E-11	UP
Gm6348	1,551469	2,18E-12	8,62E-11	UP
2510039O18Rik	-0,417025	2,19E-12	8,65E-11	DOWN
Sec24d	0,495194	2,19E-12	8,65E-11	UP
Sec23a	0,43625	2,31E-12	9,11E-11	UP
9530082P21Rik	0,31933	2,37E-12	9,33E-11	UP
Tpp1	-0,362344	2,40E-12	9,40E-11	DOWN
Gm1821	0,370229	2,41E-12	9,43E-11	UP
Tmx3	-0,546871	2,44E-12	9,52E-11	DOWN
H3c15	0,77116	2,51E-12	9,79E-11	UP

Supplemental Table S2: Primers used for mouse genotyping

E4f1^{flox} allele:	5'- CCTTGAGCACGGAGGAGAGC -3'
	5'- GCCCTAGCCTGCTCTGCCATC -3'
E4f1^{KO} allele:	5'- CACTGCCTTGGAGGACTTTGTCCA -3'
	5'- CCTCTGTTCCACATACACTTCATTC -3'
RERT allele:	5'- GTCAGTACACATACAGACTT -3'
	5'- TGAGCGAACAGGGCGAA -3'
RERT allele:	5'- GTCAGTACACATACAGACTT -3'
	5'- TCCATGGAGCACCCAGTGAA -3'
TyrCreER^{T2} allele:	5'- GAAGCAACTCATCGATTG -3'
	5'- TGAAGGGTCTGGTAGGATCA -3'
Braf^{WT} allele:	5'- GCCCAGGCTCTTTATGAGAA -3'
	5'- AGTCAATCATCCACAGAGACCT -3'
Braf^{V600E} allele:	5'- GCCCAGGCTCTTTATGAGAA -3'
	5'- GCTTGGCTGGACGTAAACTC -3'
TyrNras^{Q61K} allele:	5'- GGCGAAGGCTTCCTCTGTGT -3'
	5'- GGCCAGTTCGTGGGCTTGT -3'
Rosa26mTmG^{WT} allele:	5'- CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT -3'
	5'- CGAGGCGGATCACAAGCAATA -3'
Rosa26mTmG^{KI} allele:	5'- CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT -3'
	5'- TCAATGGGCGGGGGTCGTT -3'

Supplemental Table S3: Primers used for RT-qPCR

Mitf	5'- CCAACAGCCCTATGGCTATGC -3'
	5'- CTCGGCACTCACTCTCTGC -3'
Tyrosinase	5'- CTCTGGGCTTAGCAGTAGGC -3'
	5'- GCAAGCTGTGGTAGTCGTCT -3'
Tyrp1	5'- CCCCTAGCCTATATCTCCCTTTT -3'
	5'- TACCATCGTGGGGATAATGGC -3'
Dct	5'- ATGAGTCCTTTGCGTTGCCC -3'
	5'- TGAAGCTGAAGGTAGAGT -3'
Scd1	5'- AAAGAGAAGGGCGGAAAACT -3'
	5'- GCGTTGAGCACCAGAGTGTA -3'
Bip	5'- GTCTTCTCAGCATCAAGCAAGG -3'
	5'- TGAAGCTGAAGGTAGAGT -3'
Chop	5'- CCAACACTTCCTGGACAGGCTT -3'
	5'- TGACCTCTGTTGGCCCTG -3'
Eif4ebp1	5'- GGGGACTACAGCACCACTCC -3'
	5'- GTTTTGGCCACAGGTGAGTT -3'
Atf4	5'- AATGGCCGGCTATGGATGAT -3'
	5'- CAATCTGTCCCGGAAAAGGC -3'
Atf3	5'- CATCTCCAGGGGTCTGTTGT -3'
	5'- CCAGGTCTCTGCCTCAGAAG -3'
Atf5	5'- CAATCTGTCCCGGAAAAGGC -3'
	5'- CGCTCAGTCATCCAATCAGA -3'
Asns	5'- AAGGGCCTGACTCCATAGGT -3'
	5'- TACAACCACAAGGGGCTACA -3'
Sesn2	5'- GCATTACCTGCTGCTGCATA -3'
	5'- GCAGGAACTCAGTCATGTGG -3'
Slc6a9	5'- TCTCCTGGGTGGTTGTCTTC -3'
	5'- ACAGAATGGTCAGCACCACA -3'
Rpl13a	5'- GAGGTCGGGTGGAAGTACCA -3'
	5'- TGCATCTTGGCCTTTTCCTT -3'

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

1. Rôle d'E4F1 dans le contrôle de la traduction

Mes travaux ont permis de confirmer l'implication d'E4F1 dans le contrôle de la traduction au travers de la régulation du complexe Elongator et notamment médiée par la régulation transcriptionnelle de sa sous-unité catalytique ELP3. Néanmoins, les analyses à l'échelle du génome entier visant à identifier les cibles directes d'E4F1 ont mis en évidence qu'E4F1 se lie au promoteur d'autres gènes impliqués dans la régulation de la traduction, incluant eIF3d, eIF4b et eEF1g (Rodier et al., 2015) (Figure 26A). eIF3 est un facteur d'initiation de la traduction, composé de 13 sous-unités, responsable de la traduction spécifique d'ARNm impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire à partir de leur région 5' non traduite. La liaison d'eIF3d, une des sous-unités du complexe eIF3, à la coiffe des ARNm est nécessaire à la formation efficace du complexe (Lee et al., 2016). eIF4b, quant à lui, favorise la traduction et le recrutement des ribosomes sur les ARNm, en stimulant les activités ATPase et hélicase du facteur eIF4A (Shahbazian et al., 2010). Enfin, eEF1G est une sous-unité du complexe d'élongation eEF1, responsable de l'apport en ARNt aminoacylés aux ribosomes (Cristiano, 2020). Ainsi, l'ensemble de ces données suggère qu'E4F1 pourrait impacter la traduction de façon plus globale au travers de la régulation des complexes d'initiation et d'élongation.

Afin d'évaluer les effets globaux de la perte d'*E4f1* sur la traduction, j'ai analysé le recrutement des ribosomes sur les ARNm, dans les mélanocytes Melan-a en condition ShCTL ou Sh*E4f1*, par profilage polysomique. Pour cela, les lysats cellulaires sont séparés sur gradient de sucrose avant d'être collectés sous forme de fractions dont la densité optique est déterminée à 254nm. Différents pics sont alors obtenus, correspondant successivement aux ARNm libres, puis aux ARNm chargés des ribosomes 40S, 60S, 80S et enfin aux ARNm chargés de polysomes (Figure 26B).

L'analyse des profils polysomiques n'a pas révélé de différence majeure entre les cellules contrôle et les cellules déplétées en *E4f1* (Figure 26C). Toutefois, les ARNm contenus dans les fractions 10 à 15 (1 à 3 ribosomes) d'une part, et ceux contenus dans les fractions 16 à 22 (> 3 ribosomes) d'autre part, ont été extraits pour chaque condition et sont en cours d'analyse par RNA-seq afin de d'identifier les messagers différentiellement traduits à la suite de la déplétion d'*E4f1*.

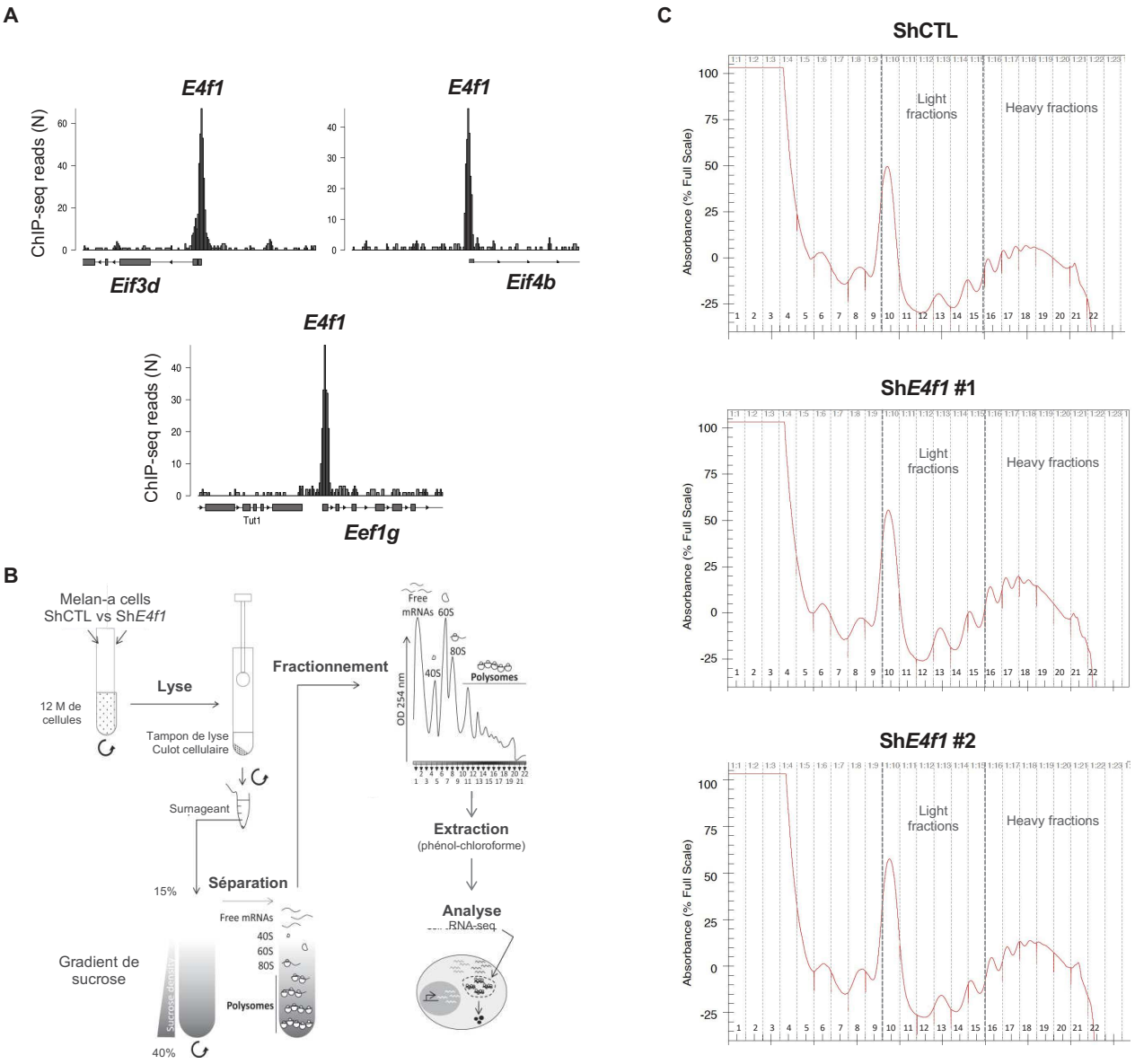


Figure 26 : Rôle d'E4F1 dans le contrôle de la traduction

***(A)** Profils ChIP-seq E4f1 normalisés sur les locus Eif3d, Eif4b et Eef1g. **(B)** Représentation schématique du protocole de profilage polysomique (d'après Chassé et al., 2016) **(C)** Profil polysomique des cellules Melan-a, 10 jours après transduction avec des particules lentivirales codant pour un ShARN contrôle (ShCTL) ou un ShARN ciblant E4f1 (ShE4f1).*

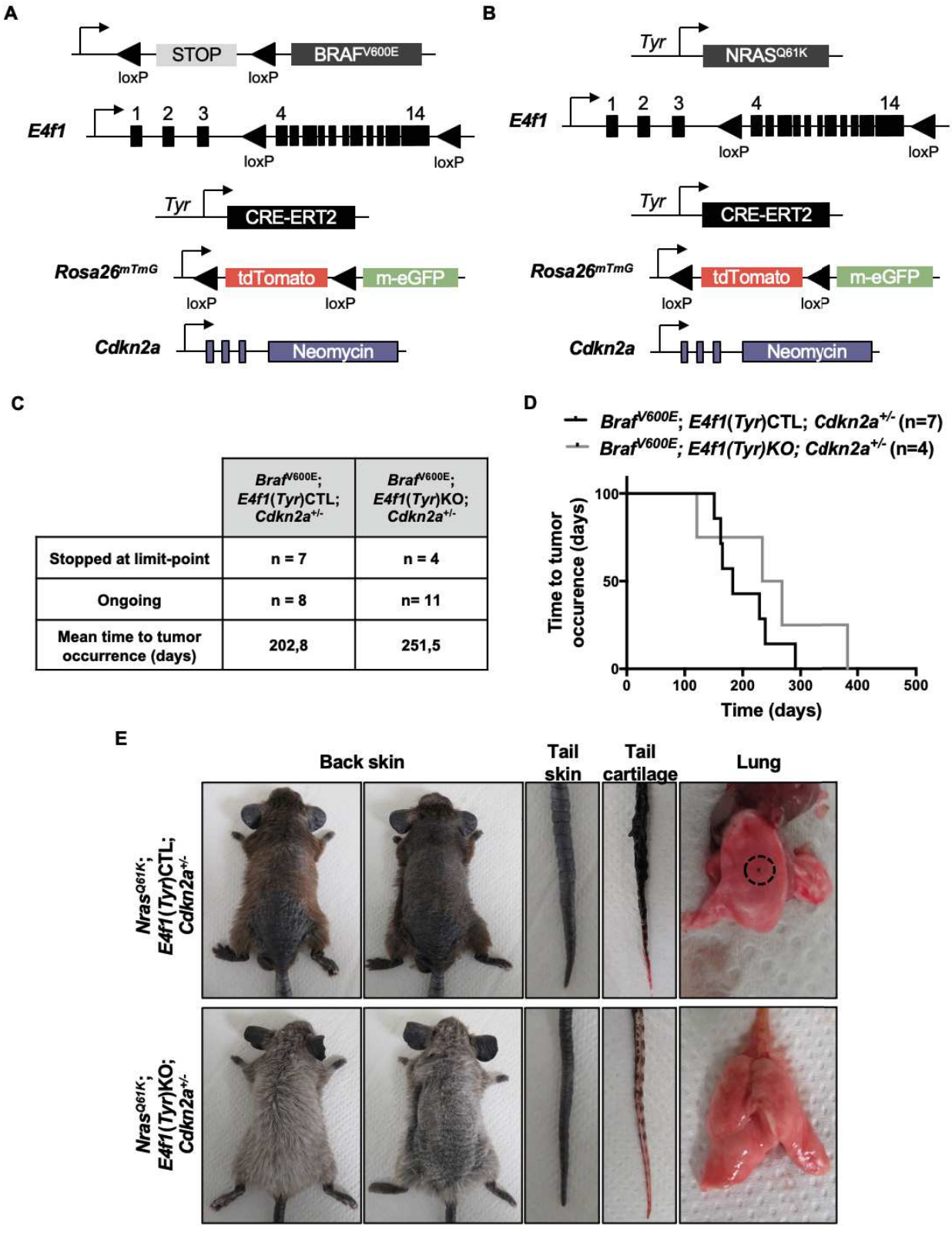
2. Effets de l'inactivation d'*E4f1* sur le développement des mélanomes

Dans le but de caractériser les fonctions d'E4F1 dans le développement des mélanomes, nous avons croisé les souris portant les mutations $Braf^{V600E}$ et $Nras^{Q61K}$ décrites dans l'article #2 avec des souris *Cdkn2a* KO (B6.129X1-$Cdkn2a^{tm1Cjs}$/KaiJ) afin de générer des individus $Braf^{V600E}$; *E4f1*(*Tyr*)CTL; $Cdkn2a^{+/-}$, $Braf^{V600E}$; *E4f1*(*Tyr*)KO; $Cdkn2a^{+/-}$, $Nras^{Q61K}$; *E4f1*(*Tyr*)CTL; $Cdkn2a^{+/-}$ et $Nras^{Q61K}$; *E4f1*(*Tyr*)CTL; $Cdkn2a^{+/-}$ capables de développer des tumeurs (Figure 27A-B). L'inactivation d'*E4f1* dans les mélanocytes est réalisée par application cutanée de tamoxifène chez des souris à l'âge de 18 jours comme mentionné dans l'article #2.

Bien que la constitution des groupes expérimentaux et leur caractérisation soit toujours en cours, mes résultats préliminaires suggèrent que l'inactivation d'*E4f1* dans le modèle $Braf^{V600E}$, $Cdkn2a^{+/-}$ retarde l'apparition des tumeurs, avec un délai de 202,8 jours chez les individus CTL contre 251 jours chez les individus KO (Figure 27C-D).

Dans le modèle $Nras^{Q61K}$, $Cdkn2a^{+/-}$, les individus *E4f1*(*Tyr*)CTL présentent une hyperpigmentation et un épaississement généralisé de la peau. Un envahissement du cartilage de la queue par des cellules pigmentées ainsi que des métastases pulmonaires sont également observés 10 mois après traitement au tamoxifène. Au contraire, au même âge, les individus *E4f1*(*Tyr*)KO se caractérisent par un blanchiment du poil et de la peau du dos, un épaississement de la peau modéré, une diminution de l'envahissement du cartilage de la queue et une absence de métastase pulmonaire (Figure 27E).

L'ensemble de ces observations suggère que l'inactivation d'*E4f1* dans les mélanocytes pourrait retarder le développement tumoral, laissant ainsi supposer un rôle essentiel d'E4F1 dans les phases d'initiation des mélanomes.



	Braf V600E; E4f1(Tyr)CTL; Cdkn2a +/-	Braf V600E; E4f1(Tyr)KO; Cdkn2a +/-
Stopped at limit-point	n = 7	n = 4
Ongoing	n = 8	n= 11
Mean time to tumor occurrence (days)	202,8	251,5

Figure 27 : Effets de l'inactivations d'E4f1 sur le développement des mélanomes

*Représentation schématique des différentes constructions génétiques permettant l'inactivation d'E4f1 par la TyrCreER^{T2}, l'inactivation du locus Cdnk2a, l'expression du rapporteur mTmG et l'expression conditionnelle de Braf^{V600E} **(A)** ou constitutive de Nras^{Q61K} **(B)** dans les mélanocytes. **(C-D)** Délai (en jours) d'apparition des tumeurs chez les souris Braf^{V600E}; E4f1(Tyr)CTL; Cdkn2a$^{+/-}$ et Braf^{V600E}; E4f1(Tyr)KO; Cdkn2a$^{+/-}$ après traitement au tamoxifène. **(E)** Observation macroscopique des souris Nrasf^{Q61K}; E4f1(Tyr)CTL; Cdkn2a$^{+/-}$ et Nrasf^{Q61K}; E4f1(Tyr)KO; Cdkn2a$^{+/-}$, 10 mois après traitement au tamoxifène.*

3. Régulation de MITF par E4F1 dans des lignées cellulaires de mélanomes humains

Mes travaux de thèse ont illustré un rôle nouveau d'E4F1 dans la régulation de MITF dans les mélanocytes. Compte tenu du potentiel rôle d'E4F1 dans le développement des mélanomes évoqué précédemment, j'ai alors cherché à évaluer la régulation de MITF par E4F1 dans des lignées cellulaires issues de mélanomes métastatiques humains et cultivées à court terme. Pour cela, les lignées MM074 et MM034 ont été transduites à l'aide de lentivirus codant des ShARNs dirigés contre *E4F1*. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence que la déplétion d'*E4F1* conduit à une diminution de l'expression protéique de MITF ainsi que de l'enzyme de la synthèse de mélanine Tyrosinase et du marqueur des mélanosomes GP100 (Figure 28A). Les analyses par RT-qPCR ont confirmé que cette régulation intervenait au niveau transcriptionnel et impactait également l'expression d'un gène codant pour une autre enzyme de la mélanogenèse, DCT (Figure 28B). Ces données démontrent alors que la régulation de l'expression transcriptionnelle de *MITF* par E4F1 ne se limite pas aux mélanocytes mais intervient également dans les cellules de mélanome.

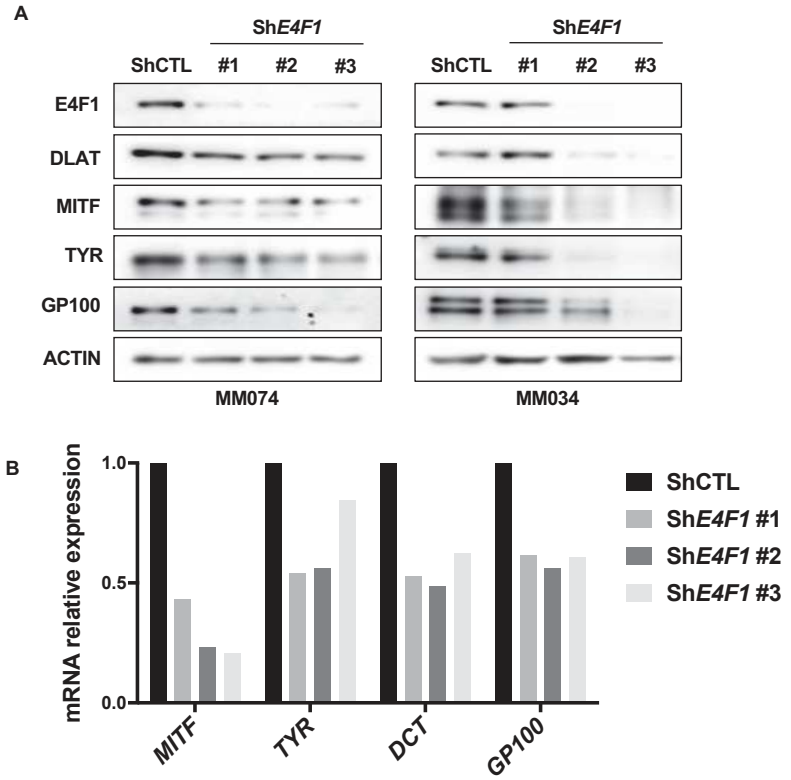


Figure 28 : Effets de la déplétion d'E4f1 sur l'expression de MITF et des enzymes de la mélanogenèse dans des lignées cellulaires de mélanome

***(A)** Analyse par Western-blot des niveaux protéiques de E4F1, DLAT, MITF, TYR, G100 et ACTINE (contrôle de charge) dans les cellules Melan-a ShCTL et ShE4F1, 14 jours après transduction. **(B)** Analyse par RT-qPCR de l'expression des ARNm MITF, TYR, DCT et GP100 dans les cellules Melan-a ShCTL et ShE4F1.*

4. Implication de la Pyruvate Déshydrogénase dans la régulation de MITF

Nos travaux ont démontré que le complexe Elongator utilise l'ac-CoA produit à partir du pyruvate par la Pyruvate Déshydrogénase (PDH) pour l'acétylation de ses ARNt cibles (Di Michele et al.). De plus, des données suggèrent une interaction des mitochondries avec les mélanosomes (Daniele et al., 2014) ainsi qu'une implication du métabolisme cellulaire dans les processus de mélanogenèse (Sultan et al., 2021). J'ai donc souhaité évaluer l'implication de la PDH dans la régulation de MITF et de la pigmentation médiée par E4F1. Dans ce but, la sous-unité E2 de la PDH, DLAT, a été déplétée par ShARN dans les mélanocytes Melan-a et dans la lignée cellulaire de mélanome MM034. Mes résultats préliminaires montrent une diminution de l'expression de MITF, Tyrosinase et GP100 à la fois au niveau protéique (Figure 29A-B) et transcriptionnel (Figure 29C). Ces données illustrent ainsi un rôle du métabolisme du pyruvate et de la PDH dans la régulation de MITF et de la mélanogenèse.

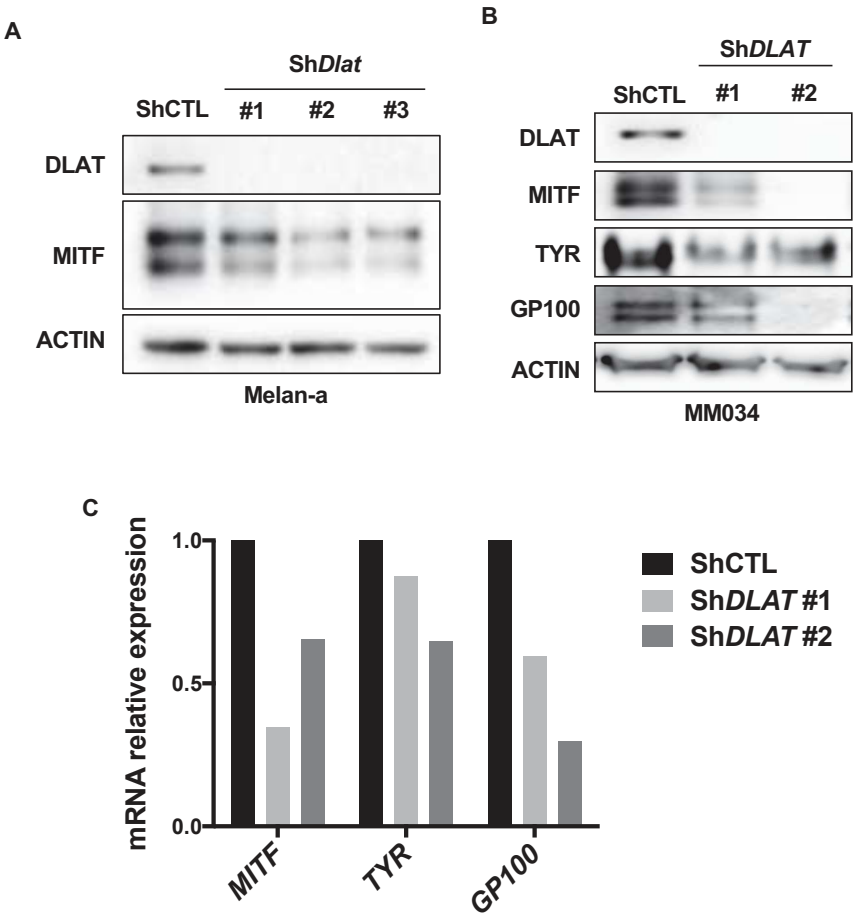


Figure 29 : Effets de la déplétion de DLAT sur l'expression de MITF et des enzymes de la mélanogenèse

***(A)** Analyse par Western-blot des niveaux protéiques de DLAT, MITF et ACTINE (contrôle de charge) dans les cellules Melan-a ShCTL et ShDlat, 10 jours après transduction. **(B)**. Analyse par Western-blot des niveaux protéiques de DLAT, MITF, TYR, G100 et ACTINE (contrôle de charge) dans les cellules MM034 ShCTL et ShDLAT, 14 jours après transduction. (C) Analyse par RT-qPCR de l'expression des ARNm MITF, TYR et GP100 dans les cellules MM034.*

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

De nombreux travaux, incluant ceux de notre laboratoire, ont mis en évidence qu'E4F1 est une protéine multifonctionnelle, agissant à la fois comme un facteur de transcription et une E3 ligase. Ainsi, E4F1 joue un rôle essentiel dans la régulation de la voie de signalisation p53 et est impliqué dans divers processus cellulaires tels que la prolifération, la survie, la réponse aux dommages à l'ADN ou encore le métabolisme du pyruvate et des lipides. Dans le but de caractériser les fonctions physiologiques d'E4F1 in vivo, mon laboratoire a développé plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées déficientes en *E4f1*. L'utilisation de ces modèles a tout d'abord permis de démontrer qu'*E4f1* est indispensable au développement embryonnaire, puisque l'absence d'*E4f1* conduit à une létalité embryonnaire au stade E5.5 (Le Cam et al., 2004). Afin d'étudier plus précisément les fonctions d'E4F1 dans les tissus adultes, mon équipe a alors généré des modèles murins KO conditionnels pour *E4f1* basés sur le système Cre-LoxP. Il a tout d'abord été mis en évidence qu'E4F1 joue un rôle essentiel dans l'homéostasie de la peau. En effet, l'inactivation d'*E4f1* dans l'organisme adulte entier (modèle RERT) conduit à de sévères défauts cutanés associés à une perte complète des cellules de l'épiderme (Lacroix et al., 2010). De manière intéressante, une caractérisation plus poussée de ce modèle murin a également révélé des défauts de pigmentation, se traduisant au niveau moléculaire par une diminution de l'expression du marqueur des mélanosomes PMEL17/GP100 dans l'épiderme. Ces résultats nous ont alors amené à évaluer le rôle d'E4F1 dans les cellules responsables de la production de mélanine, les mélanocytes. Mon projet de thèse a eu pour objectif de caractériser dans un premier temps les fonctions d'E4F1 dans le lignage mélanocytaire normal. Ces cellules étant également à l'origine du développement des mélanomes, un des cancers cutanés les plus mortels, mon projet a également visé à caractériser les fonctions d'E4F1 dans ce contexte pathologique.

En résumé, mes travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois un rôle d'E4F1 dans l'homéostasie des mélanocytes et la mélanogenèse, au travers de la régulation de MITF. Cette régulation fait notamment intervenir les fonctions d'E4F1 dans le contrôle de l'activité du complexe Elongator et de la fidélité de la traduction. Mes résultats préliminaires suggèrent également une implication du métabolisme du pyruvate dans la régulation de MITF. Enfin, les premières observations réalisées dans des modèles murins de mélanomes laissent supposer qu'E4F1 pourrait jouer un rôle dans le développement des mélanomes.

1. Rôle d'E4F1 dans le lignage mélanocytaire

1.1. Mélanocytes

Mes travaux, basés sur l'utilisation d'un modèle murin permettant l'inactivation spécifique d'*E4f1* dans les mélanocytes ont démontré que la perte d'*E4f1* conduit à des défauts de pigmentation du pelage et de la peau. Bien que des données de mon laboratoire démontrent que la perte d'*E4f1* conduit à la mort de plusieurs types cellulaires (Di Michele et al.; Hatchi et al., 2011b, 2011a; Rodier et al., 2015), le suivi de cette population rare $E4f1^{-/-}$ grâce à un gène rapporteur $Rosa^{mTmG}$ révèle que les défauts de pigmentation ne résultent pas d'un effet sur la viabilité des mélanocytes, suggérant davantage une altération de la mélanogenèse. De façon cohérente avec ces observations, j'ai mis en évidence que la déplétion d'*E4f1*, dans une lignée cellulaire de mélanocytes immortalisés, les Melan-a, provoque une diminution de l'expression du régulateur clé de l'homéostasie des mélanocytes, MITF, ainsi que de ses gènes cibles codant des enzymes de la mélanogenèse *Tyr*, *Tyrp1* et *Dct*.

De précédentes études ont identifié E4F1 comme un régulateur majeur de la voie p53, à la fois en modifiant les activités transcriptionnelles de p53 par ubiquitination (Le Cam et al., 2006) et en interagissant avec plusieurs régulateurs de la voie (Chagraoui et al., 2006b; Rizos et al., 2003). Le suppresseur de tumeur p53 est notamment connu pour jouer un rôle clé dans la pigmentation de la peau en réponse aux UV (Cui et al., 2007). Ces travaux m'ont conduit à évaluer la contribution de la voie p53 aux défauts de pigmentation des animaux déficients en *E4f1*. Mes données indiquent que ce phénotype n'est pas dépendant de p53. Néanmoins, l'ensemble de ces expériences ayant été réalisées en conditions physiologiques, il serait également intéressant d'évaluer l'implication d'E4F1 dans les processus de pigmentation en réponse aux rayonnements UV. Cette notion a toutefois été abordée dans des expériences in vivo dans lesquelles l'inactivation d'*E4f1* dans les mélanocytes a été réalisée dans des modèles murins portant des mutations $Braf^{V600E}$ ou $Nras^{Q61K}$ connu pour présenter un phénotype hyperpigmenté. De manière intéressante, la perte d'*E4f1* dans ces modèles conduit également à un blanchiment du pelage et de la peau, démontrant le rôle majeur d'E4F1 dans la régulation de la mélanogenèse en conditions physiologiques mais également dans des conditions d'hyperpigmentation.

Par ailleurs, la capacité des mélanocytes à synthétiser de la mélanine dépend également de leur état de différenciation. Le facteur de transcription MITF ainsi que les enzymes de la mélanogenèse sont exprimés de façon précoce au cours de la différenciation à partir des cellules de la crête neurale, dès le stade mélanoblaste (E10.5), et sont considérés comme des marqueurs des mélanocytes différenciés (Goding, 2000). Ces éléments m'ont donc amenée à me questionner sur l'état de différenciation des mélanocytes déficients en *E4f1*. Mes observations préliminaires n'ont pas décelé de différence d'expression du marqueur de différenciation SOX10 dans les mélanocytes entre les animaux *E4f1*(*Tyr*)CTL et *E4f1*(*Tyr*)KO. Néanmoins, une analyse de l'expression d'autres marqueurs de différenciation de la crête neurale, tels que PAX3, SLUG ou ZEB2 (Hou et al., 2000), permettrait de caractériser plus finement l'état de différenciation de ces mélanocytes et l'impact de la perte d'*E4f1* sur celui-ci.

1.2. Cellules souches mélanocytaires

Différentes études ont montré qu'E4F1 est impliqué dans la maintenance des cellules souches de plusieurs tissus. En effet, il a été mis en évidence qu'E4F1 est essentiel à la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, notamment au travers de sa régulation du facteur BMI1 (Chagraoui et al., 2006a; Grote et al., 2015). Dans la peau, mon laboratoire a démontré qu'E4F1 est indispensable au maintien des cellules souches de l'épiderme. Ainsi, l'inactivation d'*E4f1* conduit à la perte des cellules souches épidermiques, causée à la fois par des effets sur la voie de signalisation impliquant la protéine p53 mais également par des changements métaboliques liés à la perturbation de la PDH (Goguet-Rubio et al., 2016; Lacroix et al., 2010).

Dans le lignage mélanocytaire, de nombreux travaux ont montré que la perte des cellules souches mélanocytaires (McSCs) conduit à un blanchiment prématuré du poil (Harris et al., 2013; Moriyama et al., 2006; Nishimura et al., 2005; Schouwey et al., 2007; Tanimura et al., 2011). Au cours du cycle pileux, les mélanocytes matures sont éliminés en phase catagène et sont renouvelés au début de la phase anagène, par la différenciation des McSCs. Bien qu'il ait été montré que la recombinase *Tyr*CreER^{T2} utilisée dans mes travaux de thèse n'est pas active dans les cellules souches mélanocytaires (Yajima et al., 2006), la persistance partielle du blanchiment du pelage des souris E4f1(Tyr)KO plusieurs mois après la perte d'*E4f1*, m'a amenée à évaluer l'effet de la perte d'*E4f1* sur les cellules souches mélanocytaires.

De plus, les travaux précédents de mon équipe montrent que l'inactivation d'*E4f1* dans les kératinocytes basaux de l'épiderme affectent en partie de façon indirecte les cellules souches épidermiques, par un remodelage du microenvironnement impactant leur niche. J'ai donc supposé que des évènements similaires pourraient se produire dans mon modèle et impacter les McSCs. Pour évaluer cela, j'ai réalisé des expériences de dépilation sur le pelage blanc des souris *E4f1*(*Tyr*)KO, mécanisme connu pour induire l'entrée en anagène et le renouvellement du follicule pileux, provoquant alors la différenciation des McSCc en mélanocytes matures (Li and Hou, 2018; Silver and Chase, 1970). Ces expériences ont montré une repigmentation du pelage de ces souris lors de la repousse du poil, démontrant ainsi fonctionnellement que la perte d'*E4f1* n'affecte pas le maintien des McSCs ni leur capacité à se différencier en mélanocytes matures dans mon modèle. Le blanchiment persistant observé chez les souris *E4f1*(*Tyr*)KO peut alors s'expliquer par le caractère asynchrone des cycles pileux (Chase and Eaton, 1959; Plikus et al., 2008). Ainsi, une période d'un an n'est possiblement pas suffisante pour permettre le renouvellement complet du pelage. Toutefois, un marquage DCT associé à des expériences de rétention de BrdU permettant de visualiser les McSCs (Nishimura et al., 2002), permettraient de démontrer formellement que l'inactivation d'*E4f1* dans les mélanocytes n'affecte pas les cellules souches mélanocytaires.

1.3. Mise en place du lignage mélanocytaire

Le rôle d'E4F1 dans l'établissement du lignage mélanocytaire lors du développement embryonnaire n'a pas été adressé dans ce projet. Néanmoins, d'autres travaux du laboratoire, auxquels j'ai pris part, ont mis en évidence un rôle crucial d'E4F1 au cours de la mise en place du lignage neuronal. En effet, nous avons montré que l'inactivation d'*E4f1* dans le système nerveux central, à l'aide d'une recombinase Cre sous le contrôle du promoteur Nestin, provoque une diminution de la prolifération des progéniteurs neuronaux apicaux et intermédiaires, conduisant à de sévères anomalies structurelles du cerveau (Di Michele et al.). Les mélanocytes, tout comme ces progéniteurs neuronaux, dérivent de la crête neurale. De plus, MITF est essentiel à la survie des progéniteurs des mélanocytes, les mélanoblastes (Hornyak et al., 2001; Opdecamp et al., 1997). Il serait donc pertinent d'évaluer l'effet de l'inactivation d'*E4f1* sur l'établissement du lignage mélanocytaire en inactivant *E4f1* au cours du développement embryonnaire. Il a notamment été montré qu'une injection unique de tamoxifène chez les femelles gestantes à E10.5 permet l'activation de la recombinase *Tyr*CreER^{T2} dans les mélanoblastes (Yajima et al., 2006).

L'utilisation de recombinase Cre sous le contrôle des promoteurs *Dct* (Guyonneau et al., 2002) ou *Mitf* (Alizadeh et al., 2007) pourrait également être envisagée. Toutefois, ces deux recombinases restent moins spécifiques que la recombinase *Tyr*CreER^{T2} puisqu'elles montrent une activité dans le cerveau et les nerfs périphériques. Le rapporteur *mTmG* permettrait par la suite d'évaluer l'impact de la perte d'*E4f1* sur le développement des mélanoblastes chez l'embryon ainsi que ses conséquences sur les mélanocytes matures.

2. Mécanismes de régulation de MITF par E4F1

Comme évoqué précédemment, mes travaux ont démontré pour la première fois qu'E4F1 régule, de façon cellule autonome, l'expression transcriptionnelle d'un actueur majeur de l'homéostasie des mélanocytes, *Mitf*, de façon cellule autonome. Par conséquent, la perte d'*E4f1* conduit alors à une diminution de l'expression des enzymes de la synthèse de mélanine. Aussi, des marquages de MITF par immunohistochimie et RNAscope sur les échantillons de peau issus des souris *E4f1*(*Tyr*)CTL et *E4f1*(*Tyr*)KO sont en cours de mise au point dans notre laboratoire afin de confirmer que cette régulation intervient également in vivo. Mes données montrent que la régulation de MITF fait intervenir différentes fonctions d'E4F1 à la fois dans le contrôle de la traduction, du métabolisme des lipides et de la PDH.

2.1. Contrôle de la traduction et stress du réticulum

Parmi les mécanismes connus pour réguler l'expression de *MITF*, il a été mis en évidence que le facteur de transcription ATF4, induit en réponse à un stress du réticulum endoplasmique (RE), réprime l'expression de *MITF* (Falletta et al., 2017; Ferguson et al., 2017). Il est intéressant de noter que ce mécanisme fait intervenir une compétition entre ATF4 et le facteur de transcription CREB sur l'élément CRE du promoteur de *MITF*. Curieusement, les premières études menées sur E4F1 ont fait état d'une compétition entre E4F1 et les facteurs de la famille ATF pour la liaison de site CRE sur le promoteur du gène viral *E4* lors des infections à adénovirus de type V (Rooney et al., 1990). Ces données suggèrent donc qu'E4F1 pourrait également intervenir directement sur le promoteur de *Mitf*. Cependant, le motif de liaison à l'ADN d'E4F1 défini par Rodier *et al*., sur la base des analyses par ChIP-seq, diffère de celui précédemment décrit (Rodier et al., 2015) et n'a pas été identifié dans le promoteur de *Mitf*. De plus, la diminution du transcrit de *Mitf* apparait uniquement 10 jours après la transduction des Sh*E4f1* ce qui tend à suggérer un effet indirect d'E4F1 sur la régulation de l'expression de *Mitf*.

Récemment, il a été mis en évidence qu'une reprogrammation de la traduction dans des cellules de mélanome, notamment causée par une privation en acides aminés, conduit à l'induction d'ATF4 et à la répression de *MITF* (Falletta et al., 2017; Vivas-García et al., 2020). De façon intéressante, mon laboratoire a identifié *Elp3*, par ChIP-seq, comme étant une cible transcriptionnelle directe d'E4F1. *Elp3* code pour à la sous-unité catalytique du complexe Elongator, un complexe impliqué dans les modifications des ARNs de transfert (ARNt) nécessaires à la fidélité de la traduction.

Le KO d'*Elp3* chez la souris et le poisson zèbre a été associé à des défauts de traduction et à l'accumulation de protéines mal repliées, induisant alors un stress du réticulum endoplasmique (RE), une réponse de stress UPR (Unfolded-Protein Response), et ainsi, l'induction d'ATF4 (Laguesse et al., 2015; Rojas-Benítez and L. Allende, 2020). Cela aboutit, chez la souris, à des défauts de neurogenèse, des altérations des progéniteurs neuronaux intermédiaires et une microcéphalie (Laguesse et al., 2015). De manière intéressante, les animaux *E4f1* cKO dans le système nerveux central présentent également ces mêmes phénotypes précédemment cités. Ces animaux récapitulent également les défauts moléculaires observés chez les souris *Elp3* KO, à savoir des défauts de modifications des ARNt ainsi que l'induction d'un stress UPR et d'ATF4 (Di Michele et al.). Les analyses RNA-seq réalisées sur les mélanocytes Melan-a ont démontré que la déplétion d'*E4f1* provoque également une diminution de l'expression d'*Elp3* et l'induction de gènes associés à un stress UPR. Ainsi l'ensemble de ces résultats suggèrent que la régulation de MITF par E4F1 serait médiée en partie par ELP3. Cette hypothèse est particulièrement soutenue par mes données préliminaires montrant que la déplétion d'*Elp3* par ShRNA dans les Melan-a récapitule les effets de la perte d'*E4f1* sur l'expression transcriptionnelle de *Mitf* et des gènes codant pour les enzymes de la synthèse de mélanine.

L'implication du RE dans l'homéostasie des mélanocytes est illustrée par l'observation fréquente d'un stress du RE et d'une réponse UPR dans les mélanocytes des patients atteints de maladies pigmentaires. En effet, les mutations responsables de l'albinisme, une pathologie dans laquelle les mélanocytes sont incapables de produire de la mélanine, induisent des défauts de repliement et une accumulation de la protéine TYROSINASE dans le RE, induisant alors une réponse UPR (Chen et al., 2002; Toyofuku et al., 2001). De même, une dilatation du RE, suggérant une accumulation de protéines mal repliées, a été observée dans les mélanocytes des patients atteints de vitiligo, une maladie auto-immune complexe qui se caractérise par une absence ou un dysfonctionnement des mélanocytes (Boissy et al., 1991).

Par ailleurs, d'autres données suggèrent que la régulation de MITF par E4F1 au travers d'ELP3 pourrait également faire intervenir d'autres acteurs que le stress UPR. En effet, ELP3 favorise la traduction de DEK, un facteur transactivateur qui induit l'expression de LEF1 de façon dépendante de son site d'entrée interne des ribosomes (IRES), ce qui participe à la motilité et à l'invasivité des cellules de cancer du sein (Delaunay et al., 2016). LEF1 est également décrit comme un facteur de transcription activant l'expression de *MITF* dans les mélanocytes (Takeda et al., 2000). Il serait alors intéressant de vérifier si la traduction de DEK est altérée dans le profilage polysomique des Melan-a déficientes en *E4f1*. Cela laisserait ainsi supposer que la régulation de *Mitf* par ELP3 dans mon modèle pourrait également être médiée par LEF1.

De plus, les travaux de mon laboratoire ont conduit à l'identification, parmi les gènes cible d'E4F1, d'autres facteurs impliqués dans la régulation de la traduction. Cela inclut les gènes *Eif3d*, impliqué dans l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe d'un sous-groupe d'ARNm impliqué dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose ; *Eif4b*, nécessaire à la liaison de l'ARNm au ribosome et *Eef1g*, impliqué dans l'élongation et l'apport d'ARNt aminoacétylés au ribosome. Ainsi, la perte d'*E4f1* pourrait impacter de manière beaucoup plus globale l'initiation et l'élongation de la traduction, indépendamment de son effet sur le complexe Elongator et ainsi participer à une reprogrammation traductionnelle. Les expériences de profilage des polysomes et le séquençage des transcrits dans les fractions légères et lourdes, réalisées sur les cellules Melan-a devraient me permettre d'évaluer cet effet.

2.2. Métabolisme des lipides

MITF a récemment été décrit comme un activateur transcriptionnel de *Stearoyl CoA desaturase-1* (*SCD1*), un gène qui code pour une enzyme qui catalyse la transformation des acides gras saturés (SFA) en acides gras monoinsaturés (MUFA). Des altérations du niveau de MITF dans les cellules de mélanome perturbent la balance SFA/MUFA et la composition des membranes cellulaires. Ceci engendre alors un stress du RE qui favorise l'expression d'ATF4 et crée ainsi une boucle d'amplification réprimant *MITF*. Ces effets peuvent notamment être compensés par l'ajout d'oléate, un acide gras monoinsaturé, dans le milieu de culture, restaurant ainsi l'expression de *MITF* (Vivas-García et al., 2020).

Mon équipe a également lié E4F1 à la régulation transcriptionnelle de *SCD1* dans les adipocytes. Plus précisément, il a été montré qu'E4F1 est retrouvé, avec la protéine p53, au niveau du promoteur de *SCD1* et permet de lever la répression transcriptionnelle médiée par p53 (Lacroix et al.). Mes travaux ont également mis en évidence que la perte d'E4F1 réduit l'expression de *Scd1* dans les mélanocytes. De plus, l'expression de MITF peut être restaurée, en l'absence d'E4F1, par l'ajout d'oléate dans le milieu de culture. Toutefois, mes travaux démontrent que les phénotypes des souris *E4f1*(*Tyr*)KO ne sont pas dépendants de la protéine p53. Ainsi, cela suggère l'existence d'un autre mécanisme de régulation de *Scd1* par E4F1, qui pourrait être médié par MITF. Les travaux de mon équipe sur les adipocytes ont également montré qu'une complémentation en oléate dans l'alimentation des souris restaure en grande partie les défauts de synthèse des acides gras causés par l'inactivation d'*E4f1*. Des expériences similaires sont en cours sur les souris *E4f1*(*Tyr*)KO, dans le but de déterminer si une complémentation en MUFA permet de restaurer la pigmentation.

Par ailleurs, il n'est pas exclu que d'autres défauts du métabolisme des lipides puissent également contribuer à la perturbation des fonctions des mélanocytes *E4f1* cKO. En effet, nos travaux, en collaboration avec l'équipe du Dr Claude Sardet, indiquent qu'E4F1 régule la transcription des gènes *Taz*, *Crls1* et *Dnajc19*. Ces trois gènes sont impliqués dans la synthèse ou la maturation des cardiolipines, des phospholipides spécifiques à la membrane interne de la mitochondrie (Rodier et al., 2015). De manière intéressante, une distribution altérée des cardiolipines, conduisant à la production de ROS, a été observée dans les mitochondries des mélanocytes de patients atteints de vitiligo (Dell'Anna et al., 2007). Nous pouvons ainsi supposer qu'E4F1 pourrait également réguler la fonction normale des mélanocytes au travers de ses fonctions dans le métabolisme des cardiolipines.

2.3. Métabolisme du pyruvate

Une autre fonction d'E4F1, identifiée ces dernières années, consiste en la régulation de la pyruvate déshydrogénase (PDH). En effet, E4F1 régule la transcription des gènes codant des sous-unités (*Dlat*, *Dld*) et des régulateurs (*Pdp1r*, *Mpc1*, *Slc25a19*) de la PDH. Ainsi, l'inactivation d'*E4f1* in vivo conduit à une diminution de l'activité PDH et a une reprogrammation métabolique, redirigeant le flux glycolytique vers la production de lactate (Lacroix et al., 2016). De façon intéressante, une reprogrammation métabolique similaire, appelée effet Warburg, a lieu dans les cellules cancéreuses au cours de la progression tumorale et est corrélée à une diminution de l'expression de MITF. En effet, une faible expression de MITF a été associée à un métabolisme glycolytique ainsi qu'à des capacités invasives accrues et à une résistance thérapeutique (Rambow et al., 2019). De plus, différents stress métaboliques, tels que la privation en glucose ou en glutamine, sont connus pour induire la voie de signalisation de stress eIF1α-ATF4 et par conséquent réprimer *MITF* (Falletta et al., 2017; Ferguson et al., 2017; Vivas-García et al., 2020). Par ailleurs, une étude récente portant sur l'analyse des modifications métaboliques au cours de la mélanogenèse a révélé que ce processus s'accompagne d'une augmentation de la glycolyse et de la synthèse des acides gras, particulièrement médiée par l'induction de SREBP1(Sterol Regulatory Element Binding Protein1) et PDK1, un inhibiteur de la PDH (Sultan et al., 2021). L'ensemble de ces données suggèrent qu'E4F1 pourrait également moduler l'expression de MITF au travers de son rôle dans la régulation de la PDH.

Sur la base de ces éléments, j'ai donc souhaité évaluer l'impact de la déplétion de la sous-unité E2 de la PDH, *Dlat*, sur les gènes de la pigmentation. Mes résultats préliminaires, obtenus à la fois à partir des Melan-a et d'une lignée cellulaire de mélanome (lignée MM034), montrent que la déplétion de *Dlat* récapitule les effets de la perte d'*E4f1*. Plus précisément, la déplétion de *Dlat* affecte négativement l'expression transcriptionnelle de *Mitf* et de *Tyr*, suggérant ainsi un rôle du métabolisme du pyruvate dans les défauts de pigmentation causés par la perte d'*E4f1*.

En outre, la PDH permet la décarboxylation oxydative du pyruvate en Ac-CoA qui peut être utilisé, au-delà de son rôle dans le cycle de Krebs, comme cofacteur par de nombreuses enzymes pour l'acétylation des protéines et des ARNs (messagers, ribosomaux ou de transfert) pour réguler de nombreux processus cellulaires. La protéine MITF est notamment acétylée par les acétyltransférases P300/CBP, dont l'activité est dépendante de la présence d'Ac-CoA, utilisé comme co-facteur. L'acétylation de MITF sur la lysine Lys243 dans les cellules de mélanome diminue son affinité pour ses sites de liaison à l'ADN et favorise la tumorigénèse (Louphrasitthiphol et al., 2020). Ainsi, il est possible d'imaginer qu'une altération des niveaux d'Ac-CoA intracellulaires, causée par la diminution de l'activité PDH en réponse à la déplétion d'*E4f1*, puisse également modifier l'activité transcriptionnelle de *Mitf*. De plus, l'Ac-CoA est un co-facteur essentiel à l'activité du complexe Elongator (Abbassi et al., 2020). Mon laboratoire a d'ailleurs formellement mis en évidence, par des expériences de traçage isotopique au pyruvate ^{13}C marqué que le complexe Elongator utilise l'Ac-CoA formé à partir de la PDH pour la modification des ARNt (Di Michele et al.). Ces résultats soutiennent fortement l'idée qu'E4F1 coordonne la production d'Ac-CoA par la PDH et l'expression du complexe Elongator pour réguler la traduction. Nous pouvons alors supposer qu'un défaut de production d'Ac-CoA causé par une diminution de l'activité PDH dans les cellules déficientes en *E4f1* pourrait également altérer les mécanismes de traduction. Il serait donc intéressant d'évaluer la contribution de ce mécanisme dans la régulation de l'expression de MITF par E4F1 dans les mélanocytes.

Par ailleurs, d'autres études suggèrent que la mitochondrie pourrait être impliquée dans la mélanogenèse. En effet, une interaction entre la mitochondrie et les mélanosomes a été observée dans les mélanocytes par tomographie électronique, suggérant un rôle fonctionnel des mitochondries dans la biogénèse des mélanosomes et la pigmentation (Daniele et al., 2014). De plus, des défauts de pigmentation de la rétine, de la peau et des cheveux ont été observés chez des patients atteints de maladies métaboliques causées par des mutations de l'ADN mitochondrial, telles que le syndrome de Leigh ou le syndrome de Kearns et Sayre (Bodemer et al., 1999; Kakourou et al., 1999; Sonam et al., 2014). Il est important de souligner qu'E4F1 est un régulateur clé de la fonction mitochondriale (Rodier et al., 2015) et que la première mutation de *E4F1* chez l'Homme a été identifiée chez des patients atteints du syndrome de Leigh (Legati et al., 2016). L'ensemble de ces observations illustre un lien potentiel entre E4F1, le métabolisme mitochondrial et le processus de pigmentation dans les maladies humaines.

2.4. Interaction protéine-protéine

Parmi les modifications post-traductionnelles de MITF, son ubiquitination sur la lysine Lys201 par UBC9 conduit à sa dégradation par le protéasome (Xu, 2000). Au-delà de ses fonctions de facteur de transcription, E4F1 possède une activité E3 ligase permettant l'ubiquitination de ses cibles. La protéine p53 a été la première protéine cellulaire identifiée comme étant ubiquitinée par E4F1. Bien que l'ubiquitination de p53 conduise habituellement à sa dégradation par le protéasome ou sa relocalisation subcellulaire, l'ubiquitination par E4F1 module son activité transcriptionnelle (Le Cam et al., 2006). Il est ainsi possible d'imaginer qu'E4F1 pourrait ubiquitiner MITF et modifier son activité transcriptionnelle, comme dans le cas de p53.

De plus, la sumoylation de MITF par les enzymes UBC9 et PIAS3 altère sa capacité à se lier aux promoteurs de ses gènes cibles (Levy et al., 2002, 2003; Murakami and Arnheiter, 2005). Le domaine E3 ligase d'E4F1 présente une forte similarité avec deux régions IR1 et IR2 du domaine catalytique de la E3 sumo ligase RANBP2 (Pichler et al., 2004; Tatham et al., 2005). Cela suggère alors qu'E4F1 pourrait aussi agir comme E3 sumo ligase et réguler l'activité transcriptionnelle de MITF également par ce biais.

Bien que mes travaux aient permis de caractériser l'effet de la perte d'*E4f1* sur l'expression du messager de *Mitf*, son effet sur les modifications post-traductionnelles de la protéine n'a pas été évalué. Des expériences complémentaires, telles que des essais d'ubiquitination et de sumoylation, pourraient être réalisées pour déterminer si l'activité E3 ligase d'E4F1 participe à la régulation de MITF. MITF étant connu pour induire l'expression de son propre transcrit en association avec LEF1 (Saito et al., 2002), une altération de ses capacités transcriptionnelle pourrait également contribuer à la diminution de l'expression du messager *Mitf* observé dans les mélanocytes déplétés en *E4f1*.

3. Implication d'E4F1 dans l'initiation et la progression des mélanomes

Comme évoqué en introduction, aucune mutation récurrente d'*E4F1* n'a été à ce jour associée au développement tumoral. Néanmoins, plusieurs études ont mis en évidence des changements d'expression d'E4F1 dans différents cancers, avec un impact sur la survie globale variant selon le tissu concerné. Un niveau élevé d'E4F1 dans les cancers du sein à des stades avancés a été associé à un mauvais pronostic (Moison et al., 2021). Au contraire, une forte expression d'E4F1 dans les cancers du poumon non à petites cellules est corrélée à une augmentation de la survie globale (Shangguan et al., 2019). Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de préciser l'influence d'E4F1 dans le développement des cancers. Compte tenu des rôles importants de la régulation de MITF et du métabolisme, décrits précédemment, dans le développement des mélanomes, nous avons souhaité évaluer l'implication d'E4F1 dans ce processus. Pour cela, j'ai développé plusieurs modèles de souris génétiquement modifiés basés sur l'expression, spécifique aux mélanocytes, des oncogènes $Braf^{V600E}$ et $Nras^{Q61K}$, de façon inductible ou constitutive respectivement. L'expression de ces oncogènes dans les mélanocytes conduit dans un premier temps à l'apparition d'un nævus hyperpigmenté qui peut progresser par la suite vers le mélanome en cas d'inactivation du locus *Cdkn2a*.

3.1. Rôle d'E4F1 dans les *nævi*

Tout d'abord, mes travaux de thèse ont montré que l'inactivation d'*E4f1* conduit à un blanchiment du pelage et semble prévenir l'apparition de nævus causée par l'induction de l'oncogène $Braf^{V600E}$, sans pour autant affecter la survie des mélanocytes, maintenus dans le bulbe dans des proportions semblables à celles des animaux $Braf^{WT}$. De même, chez les animaux exprimant constitutivement $Nras^{Q61K}$ et présentant alors une hyperpigmentation de la peau et des poils dès la naissance, l'inactivation d'*E4f1* conduit également à des défauts de pigmentation de la peau et du pelage, bien que les mélanocytes soient toujours présents en grand nombre. Néanmoins, une caractérisation histologique précise de ces modèles murins est nécessaire afin d'identifier les mécanismes mis en jeu et notamment déterminer si l'inactivation d'*E4f1* empêche la prolifération des mélanocytes sous l'action des oncogènes $Braf^{V600E}$ et $Nras^{Q61K}$.

Dans ce but, des échantillons de peau ont été collectés à différents temps après l'inactivation d'*E4f1* (J+3, J+10 et J+30) et seront soumis à des immunomarquages dirigés contre KI67 pour la prolifération, Caspase-3 clivée pour l'apoptose et p-ERK pour l'activation de la voie MAPK par les oncogènes $Braf^{V600E}$ et $Nras^{Q61K}$. Si, comme supposé, l'inactivation d'*E4f1* impacte l'activation de la voie MAPK, une diminution de la phosphorylation de ERK et de l'expression du marqueur de prolifération KI67 sont attendues.

Curieusement, la caractérisation des effets moléculaires consécutifs à la déplétion d'*E4f1* sur les mélanocytes Melan-a a révélé que la perte d'*E4f1* conduit à une diminution non seulement de la phosphorylation mais également de l'expression des protéines ERK1/2 totales, sans pour autant affecter l'expression des transcrits (Figure 30). Ces résultats suggèrent que la perte d'*E4f1* pourrait interférer avec l'activation de la voie MAPK par les oncogènes $Braf^{V600E}$ et $Nras^{Q61K}$ en modulant les niveaux des protéines ERK1/2. L'activité des protéines ERK1/2 est connue pour être principalement régulée par des modifications post-traductionnelles et notamment par phosphorylation. Peu d'études font état d'une régulation impactant les niveaux totaux des protéines ERK1/2 que ce soit en modulant leur traduction ou leur stabilité. Toutefois, il a été montré que la déplétion de *Eif3i*, une sous-unité du complexe eIF3 d'initiation de la traduction, inhibe l'expression de ERK dans les cellules endothéliales. Ceci suggère alors que le complexe eIF3, comprenant également la cible d'E4F1, eIf3d, contrôle sélectivement la traduction de ERK dans ces cellules (Zhang et al., 2017). Compte-tenu du rôle d'E4F1 dans le contrôle de la traduction, nous pouvons supposer que les protéines ERK1/2 pourraient constituer de nouvelles cibles d'E4F1. L'analyse transcriptomique des fractions de polysomes permettra notamment d'évaluer la présence de *Erk1/2* parmi les transcrits différentiellement traduits dans les cellules Melan-a déficientes en *E4f1*.

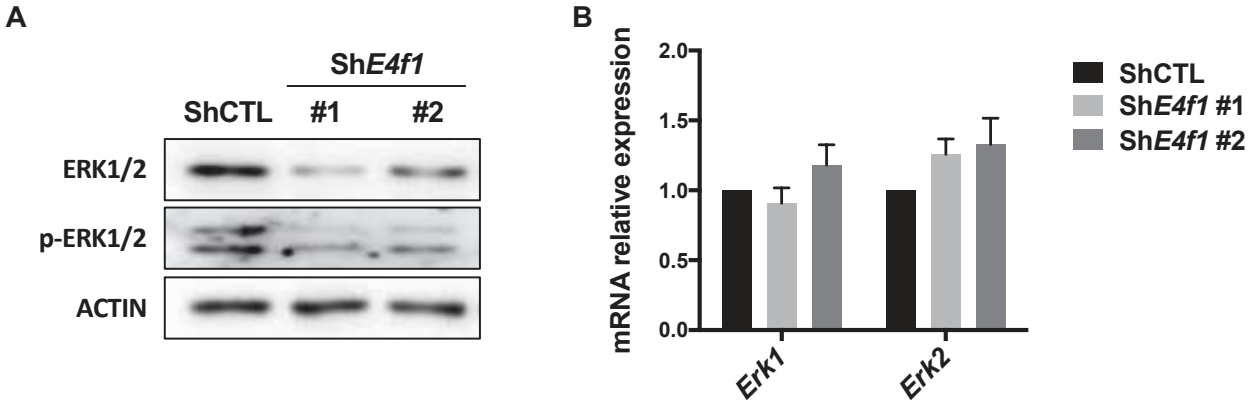


Figure 30 : Effet de la déplétion d'E4f1 sur l'expression de ERK dans les mélanocytes

*Analyse de l'expression de ERK par Western blot (**A**) et RT-qPCR (**B**) dans les cellules Melan-a ShCTL et ShE4f1.*

3.2. Rôle d'E4F1 dans le développement des mélanomes

Par la suite, afin d'étudier l'impact de l'inactivation d'*E4f1* dans un contexte tumoral, les souris $Braf^{V600E}$ et $Nras^{Q61K}$ ont été croisées avec des souris présentant une inactivation du locus *Cdkn2a* afin de générer des animaux $Braf^{V600E}$; $Cdkn2a^{+/-}$ et $Nras^{Q61K}$; $Cdkn2a^{+/-}$ capables de développer des mélanomes cutanés.

Mes résultats préliminaires suggèrent que l'inactivation d'*E4f1* dans un contexte $Braf^{V600E}$, $Cdkn2a^{+/-}$ pourrait retarder l'apparition des tumeurs. De plus, les souris $Braf^{V600E}$; *E4f1*(*Tyr)*KO ; $Cdkn2a^{+/-}$ développent principalement des tumeurs dans des zones non traitées au tamoxifène telles que les flancs, la tête ou le museau. Cela suppose que ces tumeurs pourraient dériver de cellules qui auraient échappé partiellement à la recombinaison et pourraient toujours exprimer E4F1. L'état de recombinaison des cellules composant ces tumeurs sera confirmé à l'aide d'un immunomarquage GFP grâce à la présence du rapporteur mTmG. Par ailleurs, l'inactivation d'*E4f1* chez les souris $Nras^{Q61K}$; $Cdkn2a^{+/-}$ semble également empêcher le développement d'un mélanome au niveau de la peau du dos et de la queue ainsi que l'apparition de métastases pulmonaires.

Bien qu'il soit nécessaire de compléter ces groupes expérimentaux avec davantage d'animaux et de réaliser une caractérisation histologique précise de ces modèles, ces résultats préliminaires laissent supposer qu'E4F1 pourrait jouer un rôle clé dans le développement des mélanomes et que son inactivation protègerait du développement tumoral. Cet effet pourrait notamment être médié par une altération des niveaux protéiques de ERK1/2 en absence d'E4F1, comme décrit in vitro dans les cellules Melan-a (Figure 30), ce qui limiterait l'activation de la voie MAPK en réponse aux oncogènes $Braf^{V600E}$ et $Nras^{Q61K}$. Des immunomarquages ERK sont en cours de réalisation sur les échantillons de peau issus de ces modèles afin d'évaluer l'impact de l'inactivation d'*E4f1* sur l'activation de la voie MAPK dans les mélanomes.

Par ailleurs, il a été démontré que l'expression de MITF est nécessaire à la prolifération et à la survie des mélanocytes lors des premières phases de développement des mélanomes (Carreira et al., 2006; Hoek and Goding, 2010). Ainsi, la diminution de son expression causée par la perte d'*E4f1* observée in vitro pourrait expliquer que l'inactivation d'*E4f1* protège de la formation des nævi et des mélanomes. Néanmoins, une faible expression de MITF à des stades tumoraux plus avancés a été associée à un phénotype plus agressif, une augmentation de l'invasion et une résistance aux thérapies. Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet de la perte d'*E4f1* sur des mélanomes établis.

Pour cela, j'ai entrepris d'inactiver *E4f1* une fois les tumeurs établies dans le modèle *Nras*^{Q61K}; *Cdkn2a*$^{+/-}$. Cependant, l'inactivation d'*E4f1* sera dépendante de l'activité de la recombinase TyrCreER^{T2} dans ces tumeurs. Afin de contourner cette limitation potentielle, il sera également possible de réaliser des xénogreffes en « syngénique » des tumeurs provenant de nos modèles *Braf*^{V600E}; *E4f1*$^{f/f}$; *Cdkn2a*$^{+/-}$ et *Nras*^{Q61K}; *E4f1*$^{f/f}$; *Cdkn2a*$^{+/-}$ dans des souris immunocompétentes provenant du même fond génétique. En parallèle, il est prévu de réaliser des greffes de tumeurs de patients (PDX) qui seront transduites à l'aide de Sh*E4F1* inductibles. Ces modèles permettront d'évaluer l'effet de la perte d'*E4f1* sur la progression tumorale, le développement de métastases et la réponse aux inhibiteurs de BRAF/MEK. Enfin, pour caractériser les changements moléculaires et métaboliques sous-jacents dans ces différentes tumeurs, des analyses en imagerie par cytométrie de masse basée sur la technologie CyTOF/Hyperion seront effectuées avec un panel d'anticorps spécifiques du métabolisme et des populations de cellules de mélanome développé par notre laboratoire.

Pour conclure, mes travaux de thèse ont permis d'identifier un nouveau rôle d'E4F1 dans l'homéostasie des mélanocytes et la mélanogenèse, au travers de la régulation du facteur MITF. Cette régulation fait intervenir plusieurs fonctions d'E4F1 incluant le contrôle de la traduction ainsi que le contrôle de la PDH et du métabolisme du pyruvate. Mes données préliminaires suggèrent également qu'E4F1 pourrait être essentiel aux premières étapes de développement des mélanomes.

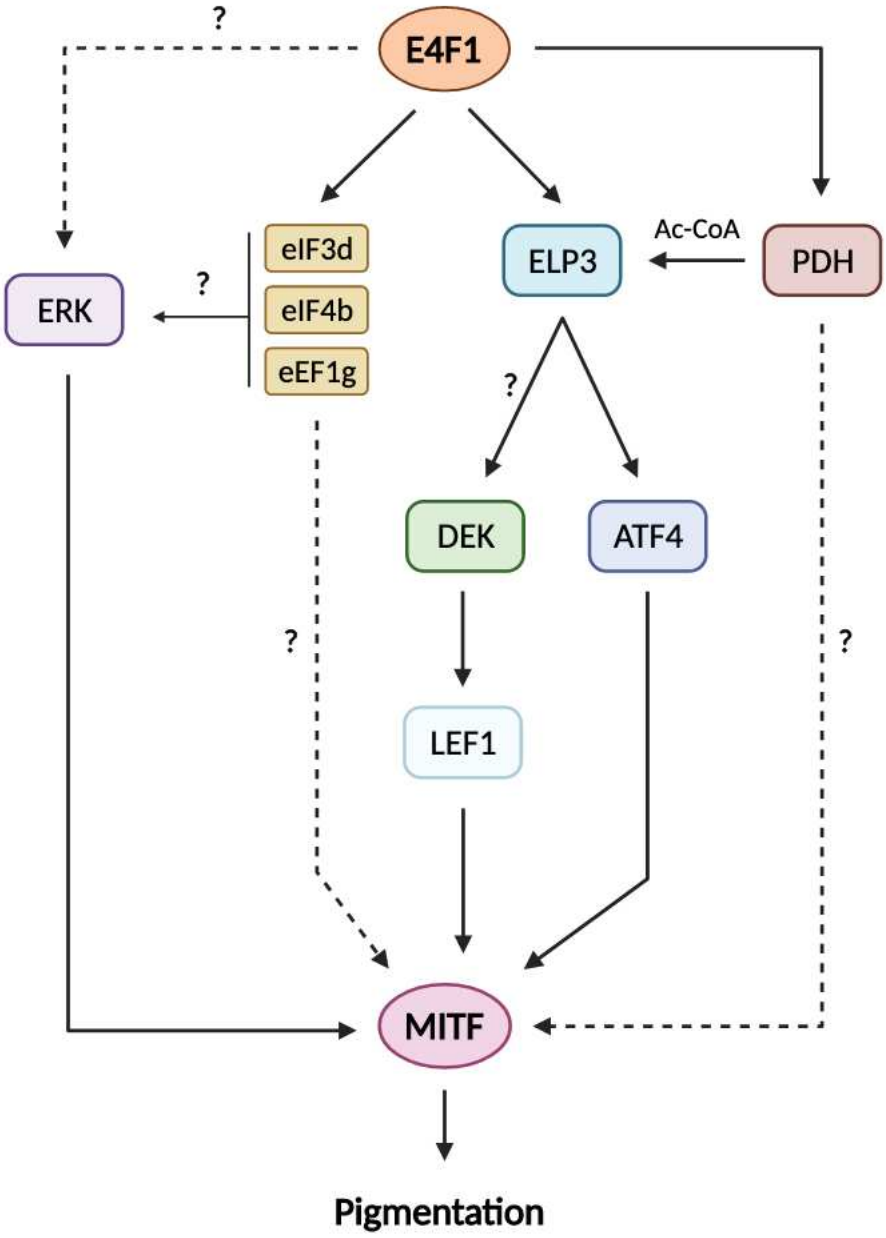


Figure 31 : Mécanismes de régulation de MITF par E4F1

BIBLIOGRAPHIE

Abbassi, N.-H., Biela, A., Glatt, S., and Lin, T.-Y. (2020). How Elongator Acetylates tRNA Bases. International Journal of Molecular Sciences *21*, 8209.

Ackermann, J., Frutschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A., and Beermann, F. (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. Cancer Res *65*, 4005–4011.

Adameyko, I., Lallemend, F., Aquino, J.B., Pereira, J.A., Topilko, P., Müller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., et al. (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. Cell *139*, 366–379.

Ahmed-Choudhury, J., Agathanggelou, A., Fenton, S.L., Ricketts, C., Clark, G.J., Maher, E.R., and Latif, F. (2005). Transcriptional Regulation of Cyclin A2 by RASSF1A through the Enhanced Binding of p120E4F to the Cyclin A2 Promoter. Cancer Res *65*, 2690–2697.

Aida, S., Sonobe, Y., Tanimura, H., Oikawa, N., Yuhki, M., Sakamoto, H., and Mizuno, T. (2017). MITF suppression improves the sensitivity of melanoma cells to a BRAF inhibitor. Cancer Letters *409*, 116–124.

Aksan, I., and Goding, C.R. (1998). Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. Mol Cell Biol *18*, 6930–6938.

Aktary, Z., McMahon, M., and Larue, L. (2017). Animal Models of Melanoma. In Melanoma, D.E. Fisher, and B.C. Bastian, eds. (New York, NY: Springer), pp. 1–31.

Albino, A.P., Le Strange, R., Oliff, A.I., Furth, M.E., and Old, L.J. (1984). Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? Nature *308*, 69–72.

Alizadeh, A., Fitch, K.R., Niswender, C.M., McKnight, G.S., and Barsh, G.S. (2007). ORIGINAL ARTICLE: Melanocyte-lineage expression of Cre recombinase using Mitf regulatory elements: Cre recombinase driven by Mitf promoter. Pigment Cell & Melanoma Research *21*, 63–69.

Aloia, A., Müllhaupt, D., Chabbert, C.D., Eberhart, T., Flückiger-Mangual, S., Vukolic, A., Eichhoff, O., Irmisch, A., Alexander, L.T., Scibona, E., et al. (2019). A Fatty Acid Oxidation-dependent Metabolic Shift Regulates the Adaptation of BRAF-mutated Melanoma to MAPK Inhibitors. Clin Cancer Res *25*, 6852–6867.

Alves, C.P., Yokoyama, S., Goedert, L., Pontes, C.L.S., Sousa, J.F., Fisher, D.E., and Espreafico, E.M. (2017). MYO5A Gene Is a Target of MITF in Melanocytes. J Invest Dermatol *137*, 985–989.

Amiel, J., Watkin, P.M., Tassabehji, M., Read, A.P., and Winter, R.M. (1998). Mutation of the MITF gene in albinism-deafness syndrome (Tietz syndrome). Clin Dysmorphol *7*, 17–20.

Anderson, S.L., Coli, R., Daly, I.W., Kichula, E.A., Rork, M.J., Volpi, S.A., Ekstein, J., and Rubin, B.Y. (2001). Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene. Am J Hum Genet *68*, 753–758.

Aoki, H., and Moro, O. (2002). Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R). Life Sci *71*, 2171–2179.

Aoki, Y., Saint-Germain, N., Gyda, M., Magner-Fink, E., Lee, Y.-H., Credidio, C., and Saint-Jeannet, J.-P. (2003). Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in Xenopus. Dev Biol *259*, 19–33.

Attié, T., Till, M., Pelet, A., Amiel, J., Edery, P., Boutrand, L., Munnich, A., and Lyonnet, S. (1995). Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. Human Molecular Genetics *4*, 2407–2409.

Aubin-Houzelstein, G., Djian-Zaouche, J., Bernex, F., Gadin, S., Delmas, V., Larue, L., and Panthier, J.-J. (2008). Melanoblasts' proper location and timed differentiation depend on Notch/RBP-J signaling in postnatal hair follicles. J Invest Dermatol *128*, 2686–2695.

Baenke, F., Chaneton, B., Smith, M., Van Den Broek, N., Hogan, K., Tang, H., Viros, A., Martin, M., Galbraith, L., Girotti, M.R., et al. (2016). Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. Mol Oncol *10*, 73–84.

Bahadoran, P., Aberdam, E., Mantoux, F., Buscà, R., Bille, K., Yalman, N., de Saint-Basile, G., Casaroli-Marano, R., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (2001). Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes. J Cell Biol *152*, 843–850.

Balch, C.M., Soong, S.J., Murad, T.M., Smith, J.W., Maddox, W.A., and Durant, J.R. (1983). A multifactorial analysis of melanoma. IV. Prognostic factors in 200 melanoma patients with distant metastases (stage III). J Clin Oncol *1*, 126–134.

Bang, A.G., Papalopulu, N., Kintner, C., and Goulding, M.D. (1997). Expression of Pax-3 is initiated in the early neural plate by posteriorizing signals produced by the organizer and by posterior non-axial mesoderm. Development *124*, 2075–2085.

Barthel, A., Okino, S.T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J.P., and Roth, R.A. (1999). Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. J Biol Chem *274*, 20281–20286.

Barton, D.E., Kwon, B.S., and Francke, U. (1988). Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14----q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. Genomics *3*, 17–24.

Bastian, B.C., LeBoit, P.E., Hamm, H., Bröcker, E.B., and Pinkel, D. (1998). Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. Cancer Res *58*, 2170–2175.

Baynash, A.G., Hosoda, K., Giaid, A., Richardson, J.A., Emoto, N., Hammer, R.E., and Yanagisawa, M. (1994). Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. Cell *79*, 1277–1285.

Béjar, J., Hong, Y., and Schartl, M. (2003). Mitf expression is sufficient to direct differentiation of medaka blastula derived stem cells to melanocytes. Development *130*, 6545–6553.

Bell, R.E., and Levy, C. (2011). The three M's: melanoma, microphthalmia-associated transcription factor and microRNA. Pigment Cell Melanoma Res *24*, 1088–1106.

Bentley, N.J., Eisen, T., and Goding, C.R. (1994). Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. Mol Cell Biol *14*, 7996–8006.

Berson, J.F., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M.S. (2001). Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. Mol Biol Cell *12*, 3451–3464.

Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T.J., Bille, K., Fisher, D.E., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998). Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. J Cell Biol *142*, 827–835.

Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de Lichy, M., Bille, K., Dessen, P., d'Hayer, B., Mohamdi, H., Remenieras, A., et al. (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. Nature *480*, 94–98.

Bharti, K., Liu, W., Csermely, T., Bertuzzi, S., and Arnheiter, H. (2008). Alternative promoter use in eye development: complex role and regulation of the transcription factor MITF. Development *135*, 1169–1178.

Bischitz, P.G., and Snell, R.S. (1959). A study of the melanocytes and melanin in the skin of the male guinea-pig. J Anat *93*, 233–245.

Blake, J.A., and Ziman, M.R. (2005). Pax3 transcripts in melanoblast development. Development, Growth & Differentiation *47*, 627–635.

Bliss, J.M., Ford, D., Swerdlow, A.J., Armstrong, B.K., Cristofolini, M., Elwood, J.M., Green, A., Holly, E.A., Mack, T., Mackie, R.M., et al. (1995). Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: Systematic overview of 10 case-control studies. International Journal of Cancer *62*, 367–376.

Bodemer, C., Rötig, A., Rustin, P., Cormier, V., Niaudet, P., Saudubray, J.M., Rabier, D., Munnich, A., and de Prost, Y. (1999). Hair and skin disorders as signs of mitochondrial disease. Pediatrics *103*, 428–433.

Boissy, R.E., Liu, Y.Y., Medrano, E.E., and Nordlund, J.J. (1991). Structural aberration of the rough endoplasmic reticulum and melanosome compartmentalization in long-term cultures of melanocytes from vitiligo patients. J Invest Dermatol *97*, 395–404.

Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D.E., Lemort, N., Sock, E., Le Caignec, C., Wegner, M., and Goossens, M. (2000). Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. Hum Mol Genet *9*, 1907–1917.

Bondurand, N., Dastot-Le Moal, F., Stanchina, L., Collot, N., Baral, V., Marlin, S., Attie-Bitach, T., Giurgea, I., Skopinski, L., Reardon, W., et al. (2007). Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. Am J Hum Genet *81*, 1169–1185.

Bossche, K.V.D., Naeyaert, J.-M., and Lambert, J. (2006). The Quest for the Mechanism of Melanin Transfer. Traffic *7*, 769–778.

Botchkareva, N.V., Khlgatian, M., Longley, B.J., Botchkarev, V.A., and Gilchrest, B.A. (2001). SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. FASEB J *15*, 645–658.

Boussemart, L., Malka-Mahieu, H., Girault, I., Allard, D., Hemmingsson, O., Tomasic, G., Thomas, M., Basmadjian, C., Ribeiro, N., Thuaud, F., et al. (2014). eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. Nature *513*, 105–109.

Brilliant, M.H. (2001). The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. Pigment Cell Res *14*, 86–93.

Brito, F.C., and Kos, L. (2008). Timeline and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart. Pigment Cell & Melanoma Research *21*, 464–470.

Britsch, S., Goerich, D.E., Riethmacher, D., Peirano, R.I., Rossner, M., Nave, K.-A., Birchmeier, C., and Wegner, M. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. Genes Dev *15*, 66–78.

Bruggeman, S.W.M., Valk-Lingbeek, M.E., van der Stoop, P.P.M., Jacobs, J.J.L., Kieboom, K., Tanger, E., Hulsman, D., Leung, C., Arsenijevic, Y., Marino, S., et al. (2005). Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. Genes Dev *19*, 1438–1443.

Brummer, C., Faerber, S., Bruss, C., Blank, C., Lacroix, R., Haferkamp, S., Herr, W., Kreutz, M., and Renner, K. (2019). Metabolic targeting synergizes with MAPK inhibition and delays drug resistance in melanoma. Cancer Letters *442*, 453–463.

Buscà, R., Berra, E., Gaggioli, C., Khaled, M., Bille, K., Marchetti, B., Thyss, R., Fitsialos, G., Larribère, L., Bertolotto, C., et al. (2005). Hypoxia-inducible factor 1{alpha} is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. J Cell Biol *170*, 49–59.

Bush, W.D., and Simon, J.D. (2007). Quantification of Ca(2+) binding to melanin supports the hypothesis that melanosomes serve a functional role in regulating calcium homeostasis. Pigment Cell Res *20*, 134–139.

Cable, J., Jackson, I.J., and Steel, K.P. (1995). Mutations at the W locus affect survival of neural crest-derived melanocytes in the mouse. Mech Dev *50*, 139–150.

Cao, R., Tsukada, Y.-I., and Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. Mol Cell *20*, 845–854.

Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., et al. (2013). A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. Cancer Cell *24*, 466–480.

Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S.A., Galibert, M.-D., Denat, L., Larue, L., and Goding, C.R. (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. Nature *433*, 764–769.

Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K.S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C.R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. Genes Dev *20*, 3426–3439.

Cerezo, M., Guemiri, R., Druillennec, S., Girault, I., Malka-Mahieu, H., Shen, S., Allard, D., Martineau, S., Welsch, C., Agoussi, S., et al. (2018). Translational control of tumor immune escape via the eIF4F–STAT1–PD-L1 axis in melanoma. Nat Med *24*, 1877–1886.

Chae, Y.C., Vaira, V., Caino, M.C., Tang, H.-Y., Seo, J.H., Kossenkov, A.V., Ottobrini, L., Martelli, C., Lucignani, G., Bertolini, I., et al. (2016). MITOCHONDRIAL Akt REGULATION OF HYPOXIC TUMOR REPROGRAMMING. Cancer Cell *30*, 257–272.

Chagraoui, J., Niessen, S.L., Lessard, J., Girard, S., Coulombe, P., Sauvageau, M., Meloche, S., and Sauvageau, G. (2006a). E4F1: a novel candidate factor for mediating BMI1 function in primitive hematopoietic cells. Genes Dev *20*, 2110–2120.

Chagraoui, J., Niessen, S.L., Lessard, J., Girard, S., Coulombe, P., Sauvageau, M., Meloche, S., and Sauvageau, G. (2006b). E4F1: a novel candidate factor for mediating BMI1 function in primitive hematopoietic cells. Genes Dev. *20*, 2110–2120.

Chakraborty, A.K., Funasaka, Y., Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J., Pawelek, J.M., and Ichihashi, M. (1996). Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. Biochim Biophys Acta *1313*, 130–138.

Cham, C.M., Driessens, G., O'Keefe, J.P., and Gajewski, T.F. (2008). Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8+ T cells. Eur J Immunol *38*, 2438–2450.

Chang, C.-Y., Pasolli, H.A., Giannopoulou, E.G., Guasch, G., Gronostajski, R.M., Elemento, O., and Fuchs, E. (2013). NFIB is a governor of epithelial–melanocyte stem cell behaviour in a shared niche. Nature *495*, 98–102.

Chase, H.B., and Eaton, G.J. (1959). The growth of hair follicles in waves. Ann N Y Acad Sci *83*, 365–368.

Cheli, Y., Giuliano, S., Guiliano, S., Botton, T., Rocchi, S., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2011). Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. Oncogene *30*, 2307–2318.

Chen, K., Manga, P., and Orlow, S.J. (2002). Pink-eyed dilution protein controls the processing of tyrosinase. Mol Biol Cell *13*, 1953–1964.

Chiaverini, C., Beuret, L., Flori, E., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Bahadoran, P., Ortonne, J.-P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2008). Microphthalmia-associated transcription factor regulates RAB27A gene expression and controls melanosome transport. J Biol Chem *283*, 12635–12642.

Chin, L., Pomerantz, J., Polsky, D., Jacobson, M., Cohen, C., Cordon-Cardo, C., Horner, J.W., and DePinho, R.A. (1997). Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. Genes Dev. *11*, 2822–2834.

Chintamaneni, C.D., Ramsay, M., Colman, M.-A., Fox, M.F., Pickard, R.T., and Kwon, B.S. (1991). Mapping the human CAS2 gene, the homologue of the mouse brown (b) locus, to human Chromosome 9p22-pter. Biochemical and Biophysical Research Communications *178*, 227–235.

Chou, W.C., Takeo, M., Rabbani, P., Hu, H., Lee, W., Chung, Y.R., Carucci, J., Overbeek, P., and Ito, M. (2013). Direct migration of follicular melanocyte stem cells to the epidermis after wounding or UVB irradiation is dependent on Mc1r signaling. Nat Med *19*, 924–929.

Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Epstein, M.N., Greene, M.H., and Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. Human Pathology *15*, 1147–1165.

Close, P., Gillard, M., Ladang, A., Jiang, Z., Papuga, J., Hawkes, N., Nguyen, L., Chapelle, J.-P., Bouillenne, F., Svejstrup, J., et al. (2012). DERP6 (ELP5) and C3ORF75 (ELP6) Regulate Tumorigenicity and Migration of Melanoma Cells as Subunits of Elongator. J Biol Chem *287*, 32535–32545.

Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J.H., Shoji, M., Sexton, D.G., Cotsonis, G., Cerimele, F., Govindarajan, B., Macaron, N., and Arbiser, J.L. (2002). Mitogen-actived protein kinase activation is an early event in melanoma progression. Clin Cancer Res *8*, 3728–3733.

Colegio, O.R., Chu, N.-Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C.E., Eisenbarth, S.C., Phillips, G.M., et al. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature *513*, 559–563.

Colombo, R., Boggio, R., Seiser, C., Draetta, G.F., and Chiocca, S. (2002). The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1. EMBO Rep *3*, 1062–1068.

Colombo, R., Draetta, G.F., and Chiocca, S. (2003). Modulation of p120E4F transcriptional activity by the Gam1 adenoviral early protein. Oncogene *22*, 2541–2547.

Corazao-Rozas, P., Guerreschi, P., Jendoubi, M., André, F., Jonneaux, A., Scalbert, C., Garçon, G., Malet-Martino, M., Balayssac, S., Rocchi, S., et al. (2013). Mitochondrial oxidative stress is the achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. Oncotarget *4*, 1986–1998.

Corcoran, R.B., Dias-Santagata, D., Bergethon, K., Iafrate, A.J., Settleman, J., and Engelman, J.A. (2010). BRAF gene amplification can promote acquired resistance to MEK inhibitors in cancer cells harboring the BRAF V600E mutation. Sci Signal *3*, ra84.

Costin, G.-E., and Hearing, V.J. (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. FASEB J *21*, 976–994.

Cristiano, L. (2020). EEF1G (Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

Cronin, J.C., Wunderlich, J., Loftus, S.K., Prickett, T.D., Wei, X., Ridd, K., Vemula, S., Burrell, A.S., Agrawal, N.S., Lin, J.C., et al. (2009). Frequent mutations in the MITF pathway in melanoma. Pigment Cell & Melanoma Research *22*, 435–444.

Cui, J., Shen, L.Y., and Wang, G.C. (1991). Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo. J Invest Dermatol *97*, 410–416.

Cui, R., Widlund, H.R., Feige, E., Lin, J.Y., Wilensky, D.L., Igras, V.E., D'Orazio, J., Fung, C.Y., Schanbacher, C.F., Granter, S.R., et al. (2007). Central Role of p53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation. Cell *128*, 853–864.

Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T.C., and Farese, R.V. (2013). Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. Cell Metab *18*, 153–161.

Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.-H., Aiba, S., Bröcker, E.-B., LeBoit, P.E., et al. (2009). Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma.

Dadras, S.S., Lange-Asschenfeldt, B., Velasco, P., Nguyen, L., Vora, A., Muzikansky, A., Jahnke, K., Hauschild, A., Hirakawa, S., Mihm, M.C., et al. (2005). Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. Mod Pathol *18*, 1232–1242.

Dai, Y., Cros, M.-P., Pontoizeau, C., Elena-Hermann, B., Bonn, G.K., and Hainaut, P. (2014). Downregulation of transcription factor E4F1 in hepatocarcinoma cells: HBV-dependent effects on autophagy, proliferation and metabolism. Carcinogenesis *35*, 635–650.

Daniele, T., Hurbain, I., Vago, R., Casari, G., Raposo, G., Tacchetti, C., and Schiaffino, M.V. (2014). Mitochondria and melanosomes establish physical contacts modulated by Mfn2 and involved in organelle biogenesis. Curr Biol *24*, 393–403.

Dankort, D., Curley, D.P., Cartlidge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky, W.E., You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M., and Bosenberg, M. (2009). BRafV600E cooperates with Pten silencing to elicit metastatic melanoma. Nat Genet *41*, 544–552.

Davies, M.A. (2012). The Role of the PI3K-AKT Pathway in Melanoma. The Cancer Journal *18*, 142–147.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature *417*, 949–954.

Delaunay, S., Rapino, F., Tharun, L., Zhou, Z., Heukamp, L., Termathe, M., Shostak, K., Klevernic, I., Florin, A., Desmecht, H., et al. (2016). Elp3 links tRNA modification to IRES-dependent translation of LEF1 to sustain metastasis in breast cancer. Journal of Experimental Medicine *213*, 2503–2523.

Dell'Angelica, E.C., Shotelersuk, V., Aguilar, R.C., Gahl, W.A., and Bonifacino, J.S. (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. Mol Cell *3*, 11–21.

Dell'Anna, M.L., Ottaviani, M., Albanesi, V., Vidolin, A.P., Leone, G., Ferraro, C., Cossarizza, A., Rossi, L., and Picardo, M. (2007). Membrane lipid alterations as a possible basis for melanocyte degeneration in vitiligo. J Invest Dermatol *127*, 1226–1233.

Denecker, G., Vandamme, N., Akay, O., Koludrovic, D., Taminau, J., Lemeire, K., Gheldof, A., De Craene, B., Van Gele, M., Brochez, L., et al. (2014). Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. Cell Death Differ *21*, 1250–1261.

Dewaele, M., Tabaglio, T., Willekens, K., Bezzi, M., Teo, S.X., Low, D.H.P., Koh, C.M., Rambow, F., Fiers, M., Rogiers, A., et al. (2016). Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. J Clin Invest *126*, 68–84.

Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., Dias, S. da R., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. Cancer Cell *15*, 294–303.

Di Michele, M., Laguesse, S., Attina, A., Mathieu, H., Rousseau, M., Jahanault-Tagliani, C., Rodier, G., De Blasio, C., Guegan, J., Wendling, O., et al. E4f1 coordinates pyruvate metabolism and the activity of the Elongator complex to ensure protein translation fidelity during neuronal development. In Preparation.

Dorsky, R.I., Moon, R.T., and Raible, D.W. (1998). Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. Nature *396*, 370–373.

Douarin, N.L., LeDouarin, N.M., and Kalcheim, C. (1999). The Neural Crest (Cambridge University Press).

Du, J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W.E., Nishimura, E.K., Golub, T.R., and Fisher, D.E. (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. Cancer Cell *6*, 565–576.

Dunn, K.J., Williams, B.O., Li, Y., and Pavan, W.J. (2000). Neural crest-directed gene transfer demonstrates Wnt1 role in melanocyte expansion and differentiation during mouse development. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 10050–10055.

Dupin, E., and Le Douarin, N.M. (2003). Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. Oncogene *22*, 3016–3023.

Dutton, K.A., Pauliny, A., Lopes, S.S., Elworthy, S., Carney, T.J., Rauch, J., Geisler, R., Haffter, P., and Kelsh, R.N. (2001). Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. Development *128*, 4113–4125.

Dynek, J.N., Chan, S.M., Liu, J., Zha, J., Fairbrother, W.J., and Vucic, D. (2008). Microphthalmia-associated transcription factor is a critical transcriptional regulator of melanoma inhibitor of apoptosis in melanomas. Cancer Res *68*, 3124–3132.

Edery, P., Attié, T., Amiel, J., Pelet, A., Eng, C., Hofstra, R.M., Martelli, H., Bidaud, C., Munnich, A., and Lyonnet, S. (1996). Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). Nat Genet *12*, 442–444.

Eller, M.S., Ostrom, K., and Gilchrest, B.A. (1996). DNA damage enhances melanogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 1087–1092.

Elworthy, S., Lister, J.A., Carney, T.J., Raible, D.W., and Kelsh, R.N. (2003). Transcriptional regulation of mitfa accounts for the sox10 requirement in zebrafish melanophore development. Development *130*, 2809–2818.

Emery, C.M., Vijayendran, K.G., Zipser, M.C., Sawyer, A.M., Niu, L., Kim, J.J., Hatton, C., Chopra, R., Oberholzer, P.A., Karpova, M.B., et al. (2009). MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 20411–20416.

Erickson, C.A., Duong, T.D., and Tosney, K.W. (1992). Descriptive and experimental analysis of the dispersion of neural crest cells along the dorsolateral path and their entry into ectoderm in the chick embryo. Dev Biol *151*, 251–272.

Fagiani, E., Giardina, G., Luzi, L., Cesaroni, M., Quarto, M., Capra, M., Germano, G., Bono, M., Capillo, M., Pelicci, P., et al. (2007). RaLP, a New Member of the Src Homology and Collagen Family, Regulates Cell Migration and Tumor Growth of Metastatic Melanomas. Cancer Res *67*, 3064–3073.

Faigle, W., Raposo, G., Tenza, D., Pinet, V., Vogt, A.B., Kropshofer, H., Fischer, A., de Saint-Basile, G., and Amigorena, S. (1998). Deficient peptide loading and MHC class II endosomal sorting in a human genetic immunodeficiency disease: the Chediak-Higashi syndrome. J Cell Biol *141*, 1121–1134.

Fain, P.R., Gowan, K., LaBerge, G.S., Alkhateeb, A., Stetler, G.L., Talbert, J., Bennett, D.C., and Spritz, R.A. (2003). A Genomewide Screen for Generalized Vitiligo: Confirmation of AIS1 on Chromosome 1p31 and Evidence for Additional Susceptibility Loci. The American Journal of Human Genetics *72*, 1560–1564.

Fajas, L., Paul, C., Zugasti, O., Le Cam, L., Polanowska, J., Fabbrizio, E., Medema, R., Vignais, M.-L., and Sardet, C. (2000). pRB binds to and modulates the transrepressing activity of the E1A-regulated transcription factor p120E4F. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 7738–7743.

Fajas, L., Paul, C., Vié, A., Estrach, S., Medema, R., Blanchard, J.M., Sardet, C., and Vignais, M.-L. (2001). Cyclin A Is a Mediator of p120E4F-Dependent Cell Cycle Arrest in G1. Mol Cell Biol *21*, 2956–2966.

Falabella, R. (2009). Vitiligo and the melanocyte reservoir. Indian J Dermatol *54*, 313–318.

Falletta, P., Sanchez-del-Campo, L., Chauhan, J., Effern, M., Kenyon, A., Kershaw, C.J., Siddaway, R., Lisle, R., Freter, R., Daniels, M.J., et al. (2017). Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. Genes Dev *31*, 18–33.

Farmer, G., Bargonetti, J., Zhu, H., Friedman, P., Prywes, R., and Prives, C. (1992). Wild-type p53 activates transcription in vitro. Nature *358*, 83–86.

Fecher, L.A., Amaravadi, R.K., and Flaherty, K.T. (2008). The MAPK pathway in melanoma. Curr Opin Oncol *20*, 183–189.

Fenton, S.L., Dallol, A., Agathanggelou, A., Hesson, L., Ahmed-Choudhury, J., Baksh, S., Sardet, C., Dammann, R., Minna, J.D., Downward, J., et al. (2004). Identification of the E1A-Regulated Transcription Factor p120E4F as an Interacting Partner of the RASSF1A Candidate Tumor Suppressor Gene. Cancer Res *64*, 102–107.

Ferguson, J., Smith, M., Zudaire, I., Wellbrock, C., and Arozarena, I. (2017). Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. Oncotarget *8*, 32946–32959.

Fernandes, E.R., and Rooney, R.J. (1997). The adenovirus E1A-regulated transcription factor E4F is generated from the human homolog of nuclear factor phiAP3. Mol Cell Biol *17*, 1890–1903.

Fernandes, E.R., Zhang, J.Y., and Rooney, R.J. (1998). Adenovirus E1A-Regulated Transcription Factor p120E4F Inhibits Cell Growth and Induces the Stabilization of the cdk Inhibitor p21WAF1. Mol Cell Biol *18*, 459–467.

Fields, S., and Jang, S.K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. Science *249*, 1046–1049.

Fitzpatrick, T.B. (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. Arch Dermatol *124*, 869–871.

Fitzpatrick, T.B., and Breathnach, A.S. (1963). [THE EPIDERMAL MELANIN UNIT SYSTEM]. Dermatol Wochenschr *147*, 481–489.

Fitzpatrick, T.B., Szabo, G., Seiji, M., and Quevedo, W.C. (1979). Biology of the melanin pigmentary system. Dermatology in General Medicine 131.

Flaherty, K.T., Infante, J.R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R.F., Sosman, J., Hamid, O., Schuchter, L., Cebon, J., Ibrahim, N., et al. (2012). Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. N Engl J Med *367*, 1694–1703.

Fleischman, R.A., Saltman, D.L., Stastny, V., and Zneimer, S. (1991). Deletion of the c-kit protooncogene in the human developmental defect piebald trait. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 10885–10889.

Fognani, C., Della Valle, G., and Babiss, L.E. (1993). Repression of adenovirus E1A enhancer activity by a novel zinc finger-containing DNA-binding protein related to the GLI-Kruppel protein. EMBO J *12*, 4985–4992.

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

Galibert, M.D., Yavuzer, U., Dexter, T.J., and Goding, C.R. (1999). Pax3 and regulation of the melanocyte-specific tyrosinase-related protein-1 promoter. J Biol Chem *274*, 26894–26900.

Galibert, M.-D., Carreira, S., and Goding, C.R. (2001). The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. EMBO J *20*, 5022–5031.

Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Picconi, O., Boyle, P., and Melchi, C.F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. European Journal of Cancer *41*, 45–60.

Garandeau, D., Mrad, M., Levade, T., Perrotta, C., Andrieu-Abadie, N., and Diab-Assaf, M. (2015). Dysregulation of Sphingolipid Metabolism in Melanoma: Roles in Pigmentation, Cell Survival and Tumor Progression. In Bioactive Sphingolipids in Cancer Biology and Therapy, Y.A. Hannun, C. Luberto, C. Mao, and L.M. Obeid, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 123–139.

Garandeau, D., Noujarède, J., Leclerc, J., Imbert, C., Garcia, V., Bats, M.-L., Rambow, F., Gilhodes, J., Filleron, T., Meyer, N., et al. (2019). Targeting the Sphingosine 1-Phosphate Axis Exerts Potent Antitumor Activity in BRAFi-Resistant Melanomas. Mol Cancer Ther *18*, 289–300.

Garraway, L.A., Widlund, H.R., Rubin, M.A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhim, R., Milner, D.A., Granter, S.R., Du, J., et al. (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. Nature *436*, 117–122.

Gembarska, A., Luciani, F., Fedele, C., Russell, E.A., Dewaele, M., Villar, S., Zwolinska, A., Haupt, S., de Lange, J., Yip, D., et al. (2012). MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. Nat Med *18*, 1239–1247.

Gershenwald, J.E., Scolyer, R.A., Hess, K.R., Sondak, V.K., Long, G.V., Ross, M.I., Lazar, A.J., Faries, M.B., Kirkwood, J.M., McArthur, G.A., et al. (2017). Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. CA Cancer J Clin *67*, 472–492.

Giebel, L.B., and Spritz, R.A. (1991). Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 8696–8699.

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

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

Goel, V., Ibrahim, N., Jiang, G., Singhal, M., Fee, S., Flotte, T., Westmoreland, S., Haluska, F., Hinds, P., and Haluska, F. (2009). Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. Oncogene *28*, 2289–2298.

Goel, V.K., Lazar, A.J.F., Warneke, C.L., Redston, M.S., and Haluska, F.G. (2006). Examination of Mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in Primary Cutaneous Melanoma. Journal of Investigative Dermatology *126*, 154–160.

Goguet-Rubio, P., Seyran, B., Gayte, L., Bernex, F., Sutter, A., Delpech, H., Linares, L.K., Riscal, R., Repond, C., Rodier, G., et al. (2016). E4F1-mediated control of pyruvate dehydrogenase activity is essential for skin homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A *113*, 11004–11009.

Goldgeier, M.H., Klein, L.E., Klein-Angerer, S., Moellmann, G., and Nordlund, J.J. (1984). The Distribution of Melanocytes in the Leptomeninges of the Human Brain. Journal of Investigative Dermatology *82*, 235–238.

Goodall, J., Carreira, S., Denat, L., Kobi, D., Davidson, I., Nuciforo, P., Sturm, R.A., Larue, L., and Goding, C.R. (2008). Brn-2 Represses Microphthalmia-Associated Transcription Factor Expression and Marks a Distinct Subpopulation of Microphthalmia-Associated Transcription Factor–Negative Melanoma Cells. Cancer Res *68*, 7788–7794.

Griswold, M.D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Semin Cell Dev Biol *9*, 411–416.

Grote, D., Moison, C., Duhamel, S., Chagraoui, J., Girard, S., Yang, J., Mayotte, N., Coulombe, Y., Masson, J.-Y., Brown, G.W., et al. (2015). E4F1 Is a Master Regulator of CHK1-Mediated Functions. Cell Reports *11*, 210–219.

Guldberg, P., thor Straten, P., Birck, A., Ahrenkiel, V., Kirkin, A.F., and Zeuthen, J. (1997). Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. Cancer Res *57*, 3660–3663.

Guyonneau, L., Rossier, A., Richard, C., Hummler, E., and Beermann, F. (2002). Expression of Cre Recombinase in Pigment Cells. Pigment Cell Research *15*, 305–309.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell *144*, 646–674.

Hao, L., Ha, J.R., Kuzel, P., Garcia, E., and Persad, S. (2012). Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. Br J Dermatol *166*, 1184–1197.

Haq, R., Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G.C., Frederick, D.T., Hurley, A.D., Nellore, A., Kung, A.L., et al. (2013). Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1α and MITF. Cancer Cell *23*, 302–315.

Hari, L., Brault, V., Kléber, M., Lee, H.-Y., Ille, F., Leimeroth, R., Paratore, C., Suter, U., Kemler, R., and Sommer, L. (2002). Lineage-specific requirements of β-catenin in neural crest development. J Cell Biol *159*, 867–880.

Harrell, M.I., Iritani, B.M., and Ruddell, A. (2007). Tumor-Induced Sentinel Lymph Node Lymphangiogenesis and Increased Lymph Flow Precede Melanoma Metastasis. Am J Pathol *170*, 774–786.

Harris, M.L., Buac, K., Shakhova, O., Hakami, R.M., Wegner, M., Sommer, L., and Pavan, W.J. (2013). A Dual Role for SOX10 in the Maintenance of the Postnatal Melanocyte Lineage and the Differentiation of Melanocyte Stem Cell Progenitors. PLOS Genetics *9*, e1003644.

Hatchi, E., Rodier, G., Sardet, C., and Le Cam, L. (2011a). E4F1 dysfunction results in autophagic cell death in myeloid leukemic cells. Autophagy *7*, 1566–1567.

Hatchi, E., Rodier, G., Lacroix, M., Caramel, J., Kirsh, O., Jacquet, C., Schrepfer, E., Lagarrigue, S., Linares, L.K., Lledo, G., et al. (2011b). E4F1 deficiency results in oxidative stress–mediated cell death of leukemic cells. J Exp Med *208*, 1403–1417.

Hayward, N.K., Wilmott, J.S., Waddell, N., Johansson, P.A., Field, M.A., Nones, K., Patch, A.-M., Kakavand, H., Alexandrov, L.B., Burke, H., et al. (2017). Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. Nature *545*, 175–180.

Hemesath, T.J., Steingrímsson, E., McGill, G., Hansen, M.J., Vaught, J., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Fisher, D.E. (1994). microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. Genes Dev *8*, 2770–2780.

Hemesath, T.J., Price, E.R., Takemoto, C., Badalian, T., and Fisher, D.E. (1998). MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. Nature *391*, 298–301.

Hensley, C.T., Wasti, A.T., and DeBerardinis, R.J. (2013). Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. J Clin Invest *123*, 3678–3684.

Hertwig, P. (1942). Neue Mutationen und Koppelungsgruppen bei der Hausmaus. Z.Vererbungslehre *80*, 220–246.

Hoashi, T., Watabe, H., Muller, J., Yamaguchi, Y., Vieira, W.D., and Hearing, V.J. (2005). MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. J Biol Chem *280*, 14006–14016.

Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., Steingrímsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. Cell *74*, 395–404.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. New England Journal of Medicine *363*, 711–723.

Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.-P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., et al. (2012). A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. Cell *150*, 251–263.

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

Hoek, K.S., Schlegel, N.C., Brafford, P., Sucker, A., Ugurel, S., Kumar, R., Weber, B.L., Nathanson, K.L., Phillips, D.J., Herlyn, M., et al. (2006). Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. Pigment Cell Research *19*, 290–302.

Hoek, K.S., Eichhoff, O.M., Schlegel, N.C., Döbbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., and Dummer, R. (2008). In vivo Switching of Human Melanoma Cells between Proliferative and Invasive States. Cancer Res *68*, 650–656.

Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Muijen, G.N.P. van, and Ruiter, D.J. (2000). Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. J Invest Dermatol *115*, 337–344.

Holness, M.J., and Sugden, M.C. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. Biochem Soc Trans *31*, 1143–1151.

Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P.S., Fischer, C., Sucker, A., Gast, A., Kadel, S., Moll, I., Nagore, E., Hemminki, K., et al. (2013). TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. Science *339*, 959–961.

Hornyak, T.J., Hayes, D.J., Chiu, L.-Y., and Ziff, E.B. (2001). Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for Pax-3 and Mitf. Mechanisms of Development *101*, 47–59.

Hosoda, K., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Baynash, A.G., Cheung, J.C., Giaid, A., and Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. Cell *79*, 1267–1276.

Hoth, C.F., Milunsky, A., Lipsky, N., Sheffer, R., Clarren, S.K., and Baldwin, C.T. (1993). Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I). Am J Hum Genet *52*, 455–462.

Hou, L., Panthier, J.J., and Arnheiter, H. (2000). Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF. Development *127*, 5379–5389.

Hou, L., Arnheiter, H., and Pavan, W.J. (2006). Interspecies difference in the regulation of melanocyte development by SOX10 and MITF. PNAS *103*, 9081–9085.

Huang, B., Johansson, M.J.O., and Byström, A.S. (2005). An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. RNA *11*, 424–436.

Huang, F.W., Hodis, E., Xu, M.J., Kryukov, G.V., Chin, L., and Garraway, L.A. (2013). Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. Science *339*, 957–959.

Huber, W.E., Price, E.R., Widlund, H.R., Du, J., Davis, I.J., Wegner, M., and Fisher, D.E. (2003). A tissue-restricted cAMP transcriptional response: SOX10 modulates alpha-melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. J Biol Chem *278*, 45224–45230.

Hughes, A.E., Newton, V.E., Liu, X.Z., and Read, A.P. (1994). A gene for Waardenburg Syndrome type 2 maps close to the human homologue of the microphthalmia gene at chromosome 3p12–p14.1. Nat Genet *7*, 509–512.

Hughes, M.J., Lingrel, J.B., Krakowsky, J.M., and Anderson, K.P. (1993). A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus. J Biol Chem *268*, 20687–20690.

Hugo, W., Shi, H., Sun, L., Piva, M., Song, C., Kong, X., Moriceau, G., Hong, A., Dahlman, K.B., Johnson, D.B., et al. (2015). Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. Cell *162*, 1271–1285.

Ikeya, M., Lee, S.M., Johnson, J.E., McMahon, A.P., and Takada, S. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. Nature *389*, 966–970.

Imbert, C., Montfort, A., Fraisse, M., Marcheteau, E., Gilhodes, J., Martin, E., Bertrand, F., Marcellin, M., Burlet-Schiltz, O., Peredo, A.G. de, et al. (2020). Resistance of melanoma to immune checkpoint inhibitors is overcome by targeting the sphingosine kinase-1. Nat Commun *11*, 437.

Incerti, B., Cortese, K., Pizzigoni, A., Surace, E.M., Varani, S., Coppola, M., Jeffery, G., Seeliger, M., Jaissle, G., Bennett, D.C., et al. (2000). Oa1 knock-out: new insights on the pathogenesis of ocular albinism type 1. Hum Mol Genet *9*, 2781–2788.

Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nat Rev Mol Cell Biol *11*, 113–127.

Jacquemin, P., Lannoy, V.J., O'Sullivan, J., Read, A., Lemaigre, F.P., and Rousseau, G.G. (2001). The transcription factor onecut-2 controls the microphthalmia-associated transcription factor gene. Biochem Biophys Res Commun *285*, 1200–1205.

Javelaud, D., Alexaki, V.-I., Pierrat, M.-J., Hoek, K.S., Dennler, S., Van Kempen, L., Bertolotto, C., Ballotti, R., Saule, S., Delmas, V., et al. (2011). GLI2 and M-MITF transcription factors control exclusive gene expression programs and inversely regulate invasion in human melanoma cells. Pigment Cell Melanoma Res *24*, 932–943.

Jiao, Z., Mollaaghababa, R., Pavan, W.J., Antonellis, A., Green, E.D., and Hornyak, T.J. (2004). Direct interaction of Sox10 with the promoter of murine Dopachrome Tautomerase (Dct) and synergistic activation of Dct expression with Mitf. Pigment Cell Res *17*, 352–362.

Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L.A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., et al. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. Nature *468*, 968–972.

Kakourou, T., Garoufi, A., Nicolaidou, P., Polyxeni, N., Dafni, E., Tsamouri, M., Papadimitriou, A., Karpathios, T., Talia, K., Anastasia, G., et al. (1999). Kearns Sayre syndrome initially presenting as hypomelanosis of Ito. Arch Dis Child *81*, 280–281.

Kamb, A., Shattuck-Eidens, D., Eeles, R., Liu, Q., Gruis, N.A., Ding, W., Hussey, C., Tran, T., Miki, Y., and Weaver-Feldhaus, J. (1994). Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. Nat Genet *8*, 23–26.

Kaplon, J., Zheng, L., Meissl, K., Chaneton, B., Selivanov, V.A., Mackay, G., van der Burg, S.H., Verdegaal, E.M.E., Cascante, M., Shlomi, T., et al. (2013). A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. Nature *498*, 109–112.

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R.W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res *51*, 6304–6311.

Kemper, K., de Goeje, P.L., Peeper, D.S., and van Amerongen, R. (2014). Phenotype switching: tumor cell plasticity as a resistance mechanism and target for therapy. Cancer Res *74*, 5937–5941.

Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab *3*, 177–185.

Kim, J.-H., Lane, W.S., and Reinberg, D. (2002). Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 1241–1246.

Kippenberger, S., Bernd, A., Bereiter-Hahn, J., Ramirez-Bosca, A., and Kaufmann, R. (1998). The mechanism of melanocyte dendrite formation: the impact of differentiating keratinocytes. Pigment Cell Res *11*, 34–37.

Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D.C., and Hearing, V.J. (1998). Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). J Biol Chem *273*, 31801–31805.

Kolaj-Robin, O., and Séraphin, B. (2017). Chapter Four - Structures and Activities of the Elongator Complex and Its Cofactors. In The Enzymes, G.F. Chanfreau, ed. (Academic Press), pp. 117–149.

Kondo, T., and Hearing, V.J. (2011). Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. Expert Rev Dermatol *6*, 97–108.

Kovesdi, I., Reichel, R., and Nevins, J.R. (1987). Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. Proc Natl Acad Sci U S A *84*, 2180–2184.

Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B.H., Evans, P., Bacchiocchi, A., McCusker, J.P., Cheng, E., Davis, M.J., Goh, G., Choi, M., et al. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. Nat Genet *44*, 1006–1014.

Krauthammer, M., Kong, Y., Bacchiocchi, A., Evans, P., Pornputtapong, N., Wu, C., McCusker, J.P., Ma, S., Cheng, E., Straub, R., et al. (2015). Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. Nat Genet *47*, 996–1002.

Kumano, K., Masuda, S., Sata, M., Saito, T., Lee, S., Sakata-Yanagimoto, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Natsugari, H., Kurokawa, M., et al. (2008). Both Notch1 and Notch2 contribute to the regulation of melanocyte homeostasis. Pigment Cell & Melanoma Research *21*, 70–78.

Kumar, S.M., Yu, H., Edwards, R., Chen, L., Kazianis, S., Brafford, P., Acs, G., Herlyn, M., and Xu, X. (2007). Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in melanoma. Cancer Res *67*, 3177–3184.

Kunz, M. (2013). MicroRNAs in melanoma biology. Adv Exp Med Biol *774*, 103–120.

LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (1998). Induction and patterning of the neural crest, a stem cell-like precursor population. J Neurobiol *36*, 175–189.

Lacroix, M., Caramel, J., Goguet-Rubio, P., Linares, L.K., Estrach, S., Hatchi, E., Rodier, G., Lledo, G., de Bettignies, C., Thépot, A., et al. (2010). Transcription factor E4F1 is essential for epidermal stem cell maintenance and skin homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 21076–21081.

Lacroix, M., Rodier, G., Kirsh, O., Houles, T., Delpech, H., Seyran, B., Gayte, L., Casas, F., Pessemesse, L., Heuillet, M., et al. (2016). E4F1 controls a transcriptional program essential for pyruvate dehydrogenase activity. Proc Natl Acad Sci U S A *113*, 10998–11003.

Lacroix, M., Linares, L.K., Rueda-Rincon, N., Bloch, K., Di Michele, M., De Blasio, C., Fau, C., Gayte, L., Blanchet, E., Mairal, A., et al. The multifunctional protein E4F1 links p53 to lipid metabolism in adipocytes. In Press.

Laguesse, S., Creppe, C., Nedialkova, D.D., Prévot, P.-P., Borgs, L., Huysseune, S., Franco, B., Duysens, G., Krusy, N., Lee, G., et al. (2015). A Dynamic Unfolded Protein Response Contributes to the Control of Cortical Neurogenesis. Dev Cell *35*, 553–567.

Land, S.C., and Tee, A.R. (2007). Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. J Biol Chem *282*, 20534–20543.

Lang, D., Lu, M.M., Huang, L., Engleka, K.A., Zhang, M., Chu, E.Y., Lipner, S., Skoultchi, A., Millar, S.E., and Epstein, J.A. (2005). Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. Nature *433*, 884–887.

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.-J., Rutkowski, P., Lao, C.D., Cowey, C.L., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., et al. (2019). Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. New England Journal of Medicine *381*, 1535–1546.

Larribere, L., Hilmi, C., Khaled, M., Gaggioli, C., Bille, K., Auberger, P., Ortonne, J.P., Ballotti, R., and Bertolotto, C. (2005). The cleavage of microphthalmia-associated transcription factor, MITF, by caspases plays an essential role in melanocyte and melanoma cell apoptosis. Genes Dev *19*, 1980–1985.

Le Cam, L., Lacroix, M., Ciemerych, M.A., Sardet, C., and Sicinski, P. (2004). The E4F Protein Is Required for Mitotic Progression during Embryonic Cell Cycles. Mol Cell Biol *24*, 6467–6475.

Le Cam, L., Linares, L.K., Paul, C., Julien, E., Lacroix, M., Hatchi, E., Triboulet, R., Bossis, G., Shmueli, A., Rodriguez, M.S., et al. (2006). E4F1 Is an Atypical Ubiquitin Ligase that Modulates p53 Effector Functions Independently of Degradation. Cell *127*, 775–788.

Leclerc, J., Garandeau, D., Pandiani, C., Gaudel, C., Bille, K., Nottet, N., Garcia, V., Colosetti, P., Pagnotta, S., Bahadoran, P., et al. (2019). Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells. Oncogene *38*, 1282–1295.

Lee, K.A., and Green, M.R. (1987). A cellular transcription factor E4F1 interacts with an E1a-inducible enhancer and mediates constitutive enhancer function in vitro. EMBO J *6*, 1345–1353.

Lee, A.S.Y., Kranzusch, P.J., Doudna, J.A., and Cate, J.H.D. (2016). eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation. Nature *536*, 96–99.

Lee, H.-O., Levorse, J.M., and Shin, M.K. (2003). The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors. Dev Biol *259*, 162–175.

Lee, M., Goodall, J., Verastegui, C., Ballotti, R., and Goding, C.R. (2000). Direct regulation of the Microphthalmia promoter by Sox10 links Waardenburg-Shah syndrome (WS4)-associated hypopigmentation and deafness to WS2. J Biol Chem *275*, 37978–37983.

Legati, A., Reyes, A., Nasca, A., Invernizzi, F., Lamantea, E., Tiranti, V., Garavaglia, B., Lamperti, C., Ardissone, A., Moroni, I., et al. (2016). New genes and pathomechanisms in mitochondrial disorders unraveled by NGS technologies. Biochim Biophys Acta *1857*, 1326–1335.

Legha, S.S. (1989). Current therapy for malignant melanoma. Semin Oncol *16*, 34–44.

Levy, C., Nechushtan, H., and Razin, E. (2002). A new role for the STAT3 inhibitor, PIAS3: a repressor of microphthalmia transcription factor. J Biol Chem *277*, 1962–1966.

Levy, C., Sonnenblick, A., and Razin, E. (2003). Role Played by Microphthalmia Transcription Factor Phosphorylation and Its Zip Domain in Its Transcriptional Inhibition by PIAS3. Mol Cell Biol *23*, 9073–9080.

Levy, C., Khaled, M., Robinson, K.C., Veguilla, R.A., Chen, P.-H., Yokoyama, S., Makino, E., Lu, J., Larue, L., Beermann, F., et al. (2010). Lineage-Specific Transcriptional Regulation of DICER by MITF in Melanocytes. Cell *141*, 994–1005.

Li, H., and Hou, L. (2018). Regulation of melanocyte stem cell behavior by the niche microenvironment. Pigment Cell & Melanoma Research *31*, 556–569.

Li, L., Fukunaga-Kalabis, M., Yu, H., Xu, X., Kong, J., Lee, J.T., and Herlyn, M. (2010). Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. J Cell Sci *123*, 853–860.

Li, W., Zhang, Q., Oiso, N., Novak, E.K., Gautam, R., O'Brien, E.P., Tinsley, C.L., Blake, D.J., Spritz, R.A., Copeland, N.G., et al. (2003). Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). Nat Genet *35*, 84–89.

Lin, T.-Y., Abbassi, N.E.H., Zakrzewski, K., Chramiec-Głąbik, A., Jemioła-Rzemińska, M., Różycki, J., and Glatt, S. (2019). The Elongator subunit Elp3 is a non-canonical tRNA acetyltransferase. Nat Commun *10*, 625.

Lister, J.A., Robertson, C.P., Lepage, T., Johnson, S.L., and Raible, D.W. (1999). nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. Development *126*, 3757–3767.

Liu, F., Fu, Y., and Meyskens, F.L. (2009a). MiTF Regulates Cellular Response to Reactive Oxygen Species through Transcriptional Regulation of APE-1/Ref-1. Journal of Investigative Dermatology *129*, 422–431.

Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. Mol Cell Biol *19*, 1202–1209.

Liu, Y., Ye, F., Li, Q., Tamiya, S., Darling, D.S., Kaplan, H.J., and Dean, D.C. (2009b). Zeb1 represses Mitf and regulates pigment synthesis, cell proliferation, and epithelial morphology. Invest Ophthalmol Vis Sci *50*, 5080–5088.

Loh, C.-Y., Chai, J.Y., Tang, T.F., Wong, W.F., Sethi, G., Shanmugam, M.K., Chong, P.P., and Looi, C.Y. (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. Cells *8*, 1118.

Long, G.V., Eroglu, Z., Infante, J., Patel, S., Daud, A., Johnson, D.B., Gonzalez, R., Kefford, R., Hamid, O., Schuchter, L., et al. (2018). Long-Term Outcomes in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Who Received Dabrafenib Combined With Trametinib. J Clin Oncol *36*, 667–673.

Louphrasitthiphol, P., Siddaway, R., Loffreda, A., Pogenberg, V., Friedrichsen, H., Schepsky, A., Zeng, Z., Lu, M., Strub, T., Freter, R., et al. (2020). Tuning Transcription Factor Availability through Acetylation-Mediated Genomic Redistribution. Mol Cell *79*, 472-487.e10.

Luciani, F., Champeval, D., Herbette, A., Denat, L., Aylaj, B., Martinozzi, S., Ballotti, R., Kemler, R., Goding, C.R., De Vuyst, F., et al. (2011). Biological and mathematical modeling of melanocyte development. Development *138*, 3943–3954.

Ludwig, A., Rehberg, S., and Wegner, M. (2004). Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the Sox10 and Mitf transcription factors. FEBS Lett *556*, 236–244.

Lui, P., Cashin, R., Machado, M., Hemels, M., Corey-Lisle, P.K., and Einarson, T.R. (2007). Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials. Cancer Treat Rev *33*, 665–680.

Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D.J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J. (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. Nature *375*, 503–506.

Lunt, S.Y., and Vander Heiden, M.G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. Annu Rev Cell Dev Biol *27*, 441–464.

Mackenzie, M.A., Jordan, S.A., Budd, P.S., and Jackson, I.J. (1997). Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. Dev Biol *192*, 99–107.

Maertens, O., Johnson, B., Hollstein, P., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., Messiaen, L., Bronson, R.T., McMahon, M., Granter, S., Flaherty, K., et al. (2013). Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. Cancer Discov *3*, 338–349.

Martina, J.A., Moriyama, K., and Bonifacino, J.S. (2003). BLOC-3, a protein complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome gene products HPS1 and HPS4. J Biol Chem *278*, 29376–29384.

Martins, F., Sofiya, L., Sykiotis, G.P., Lamine, F., Maillard, M., Fraga, M., Shabafrouz, K., Ribi, C., Cairoli, A., Guex-Crosier, Y., et al. (2019). Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. Nat Rev Clin Oncol *16*, 563–580.

McGill, G.G., Horstmann, M., Widlund, H.R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E.K., Lin, Y.-L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H.-F., et al. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. Cell *109*, 707–718.

Ménasché, G., Ho, C.H., Sanal, O., Feldmann, J., Tezcan, I., Ersoy, F., Houdusse, A., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2003). Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). J Clin Invest *112*, 450–456.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature *436*, 720–724.

Moison, C., Chagraoui, J., Caron, M.-C., Gagné, J.-P., Coulombe, Y., Poirier, G.G., Masson, J.-Y., and Sauvageau, G. (2021). Zinc finger protein E4F1 cooperates with PARP-1 and BRG1 to promote DNA double-strand break repair. PNAS *118*.

de la Monte, S.M., Moore, G.W., and Hutchins, G.M. (1983). Patterned distribution of metastases from malignant melanoma in humans. Cancer Res *43*, 3427–3433.

Moriyama, M., Osawa, M., Mak, S.-S., Ohtsuka, T., Yamamoto, N., Han, H., Delmas, V., Kageyama, R., Beermann, F., Larue, L., et al. (2006). Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. J Cell Biol *173*, 333–339.

Müller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., Kong, X., Possik, P.A., Cornelissen-Steijger, P.D.M., Foppen, M.H.G., et al. (2014). Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. Nat Commun *5*, 5712.

Murakami, H., and Arnheiter, H. (2005). Sumoylation modulates transcriptional activity of MITF in a promoter-specific manner. Pigment Cell Res *18*, 265–277.

Murakami, T., Maki, W., Cardones, A.R., Fang, H., Tun Kyi, A., Nestle, F.O., and Hwang, S.T. (2002). Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. Cancer Res *62*, 7328–7334.

Murisier, F., Guichard, S., and Beermann, F. (2006). A conserved transcriptional enhancer that specifies Tyrp1 expression to melanocytes. Dev Biol *298*, 644–655.

Murisier, F., Guichard, S., and Beermann, F. (2007). The tyrosinase enhancer is activated by Sox10 and Mitf in mouse melanocytes. Pigment Cell Res *20*, 173–184.

Muthusamy, V., Hobbs, C., Nogueira, C., Cordon-Cardo, C., McKee, P.H., Chin, L., and Bosenberg, M.W. (2006). Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. Genes Chromosomes Cancer *45*, 447–454.

Nagasawa, I., Kunimasa, K., Tsukahara, S., and Tomida, A. (2017). BRAF-mutated cells activate GCN2-mediated integrated stress response as a cytoprotective mechanism in response to vemurafenib. Biochem Biophys Res Commun *482*, 1491–1497.

Nagasawa, I., Koido, M., Tani, Y., Tsukahara, S., Kunimasa, K., and Tomida, A. (2020). Disrupting ATF4 Expression Mechanisms Provides an Effective Strategy for BRAF-Targeted Melanoma Therapy. IScience *23*, 101028.

Najjar, Y.G., Menk, A.V., Sander, C., Rao, U., Karunamurthy, A., Bhatia, R., Zhai, S., Kirkwood, J.M., and Delgoffe, G.M. (2019). Tumor cell oxidative metabolism as a barrier to PD-1 blockade immunotherapy in melanoma. JCI Insight *4*, 124989.

Nasi, A., Fekete, T., Krishnamurthy, A., Snowden, S., Rajnavölgyi, E., Catrina, A.I., Wheelock, C.E., Vivar, N., and Rethi, B. (2013). Dendritic cell reprogramming by endogenously produced lactic acid. J Immunol *191*, 3090–3099.

Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.-K., Attar, N., Sazegar, H., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. Nature *468*, 973–977.

Nevins, J.R., Raychaudhuri, P., Yee, A.S., Rooney, R.J., Kovesdi, I., and Reichel, R. (1988). Transactivation by the adenovirus E1A gene. Biochem. Cell Biol. *66*, 578–583.

Newton, J.M., Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Gardner, J.M., Davisson, M.T., King, R.A., and Brilliant, M.H. (2001). Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (uw) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. Am J Hum Genet *69*, 981–988.

Nishikawa, S.-I., and Osawa, M. (2007). Generating quiescent stem cells. Pigment Cell Research *20*, 263–270.

Nishikawa-Torikai, S., Osawa, M., and Nishikawa, S.-I. (2011). Functional characterization of melanocyte stem cells in hair follicles. J Invest Dermatol *131*, 2358–2367.

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

Nishimura, E.K., Jordan, S.A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I.J., Barrandon, Y., Miyachi, Y., and Nishikawa, S.-I. (2002). Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. Nature *416*, 854–860.

Nishimura, E.K., Granter, S.R., and Fisher, D.E. (2005). Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. Science *307*, 720–724.

Nishimura, E.K., Suzuki, M., Igras, V., Du, J., Lonning, S., Miyachi, Y., Roes, J., Beermann, F., and Fisher, D.E. (2010). Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. Cell Stem Cell *6*, 130–140.

Nissan, M.H., Pratilas, C.A., Jones, A.M., Ramirez, R., Won, H., Liu, C., Tiwari, S., Kong, L., Hanrahan, A.J., Yao, Z., et al. (2014). Loss of NF1 in Cutaneous Melanoma Is Associated with RAS Activation and MEK Dependence. Cancer Res *74*, 2340–2350.

Nobukuni, Y., Watanabe, A., Takeda, K., Skarka, H., and Tachibana, M. (1996). Analyses of loss-of-function mutations of the MITF gene suggest that haploinsufficiency is a cause of Waardenburg syndrome type 2A. Am J Hum Genet *59*, 76–83.

Oetting, W.S., and King, R.A. (1999). Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. Hum Mutat *13*, 99–115.

Ogretmen, B., and Hannun, Y.A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. Nat Rev Cancer *4*, 604–616.

Oguro, H., Iwama, A., Morita, Y., Kamijo, T., van Lohuizen, M., and Nakauchi, H. (2006). Differential impact of Ink4a and Arf on hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment in Bmi1-deficient mice. J Exp Med *203*, 2247–2253.

Ohanna, M., Cerezo, M., Nottet, N., Bille, K., Didier, R., Beranger, G., Mograbi, B., Rocchi, S., Yvan-Charvet, L., Ballotti, R., et al. (2018). Pivotal role of NAMPT in the switch of melanoma cells toward an invasive and drug-resistant phenotype. Genes Dev *32*, 448–461.

Okada, Y., Yamagata, K., Hong, K., Wakayama, T., and Zhang, Y. (2010). A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. Nature *463*, 554–558.

Okamoto, N., Aoto, T., Uhara, H., Yamazaki, S., Akutsu, H., Umezawa, A., Nakauchi, H., Miyachi, Y., Saida, T., and Nishimura, E.K. (2014). A melanocyte--melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. Pigment Cell Melanoma Res *27*, 1039–1050.

Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M.T., Hodgkinson, C.A., Pavan, W.J., and Arnheiter, H. (1997). Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. Development *124*, 2377–2386.

Orlow, S.J. (1995). Melanosomes Are Specialized Members of the Lysosomal Lineage of Organelles. Journal of Investigative Dermatology *105*, 3–7.

Orth, J.M., Gunsalus, G.L., and Lamperti, A.A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. Endocrinology *122*, 787–794.

Ortonne, J., and Benedetto, J. (1981). Mélanocytes épidermiques et mélanocytes folliculaires. Ann Genet Sel Anim *13*, 17–26.

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

Padua, R.A., Barrass, N.C., and Currie, G.A. (1985). Activation of N-ras in a human melanoma cell line. Mol Cell Biol *5*, 582–585.

Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., and Gorman, A.M. (2016). The integrated stress response. EMBO Reports *17*, 1374–1395.

Pampena, R., Kyrgidis, A., Lallas, A., Moscarella, E., Argenziano, G., and Longo, C. (2017). A meta-analysis of nevus-associated melanoma: Prevalence and practical implications. Journal of the American Academy of Dermatology *77*, 938-945.e4.

Park, I., Qian, D., Kiel, M., Becker, M.W., Pihalja, M., Weissman, I.L., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. Nature *423*, 302–305.

Parmenter, T.J., Kleinschmidt, M., Kinross, K.M., Bond, S.T., Li, J., Kaadige, M.R., Rao, A., Sheppard, K.E., Hugo, W., Pupo, G.M., et al. (2014). Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. Cancer Discov *4*, 423–433.

Patel, M.S., and Korotchkina, L.G. (2003). The biochemistry of the pyruvate dehydrogenase complex*. Biochemistry and Molecular Biology Education *31*, 5–15.

Patel, K.P., O'Brien, T.W., Subramony, S.H., Shuster, J., and Stacpoole, P.W. (2012). The Spectrum of Pyruvate Dehydrogenase Complex Deficiency: Clinical, Biochemical and Genetic Features in 371 Patients. Mol Genet Metab *105*, 34–43.

Patel, M.S., Nemeria, N.S., Furey, W., and Jordan, F. (2014). The Pyruvate Dehydrogenase Complexes: Structure-based Function and Regulation. J Biol Chem *289*, 16615–16623.

Pathria, G., Lee, J.S., Hasnis, E., Tandoc, K., Scott, D.A., Verma, S., Feng, Y., Larue, L., Sahu, A.D., Topisirovic, I., et al. (2019). Translational Reprogramming Marks Adaptation to Asparagine Restriction in Cancer. Nat Cell Biol *21*, 1590–1603.

Patton, E.E., Mueller, K.L., Adams, D.J., Anandasabapathy, N., Aplin, A.E., Bertolotto, C., Bosenberg, M., Ceol, C.J., Burd, C.E., Chi, P., et al. (2021). Melanoma models for the next generation of therapies. Cancer Cell *39*, 610–631.

Pérez-Guijarro, E., Karras, P., Cifdaloz, M., Martínez-Herranz, R., Cañón, E., Graña, O., Horcajada-Reales, C., Alonso-Curbelo, D., Calvo, T.G., Gómez-López, G., et al. (2016). Lineage-specific roles of the cytoplasmic polyadenylation factor CPEB4 in the regulation of melanoma drivers. Nat Commun *7*, 13418.

Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T.K., and Melchior, F. (2004). The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. Nat Struct Mol Biol *11*, 984–991.

Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. Biochim Biophys Acta *1695*, 55–72.

Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Goerich, D.E., Préhu, M.O., Puliti, A., Herbarth, B., Hermans-Borgmeyer, I., Legius, E., Matthijs, G., et al. (1998). SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. Nat Genet *18*, 171–173.

Pingault, V., Bondurand, N., Lemort, N., Sancandi, M., Ceccherini, I., Hugot, J.P., Jouk, P.S., and Goossens, M. (2001). A heterozygous endothelin 3 mutation in Waardenburg-Hirschsprung disease: is there a dosage effect of EDN3/EDNRB gene mutations on neurocristopathy phenotypes? J Med Genet *38*, 205–209.

Plikus, M.V., Mayer, J.A., de la Cruz, D., Baker, R.E., Maini, P.K., Maxson, R., and Chuong, C.-M. (2008). Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. Nature *451*, 340–344.

Polsky, D., Bastian, B.C., Hazan, C., Melzer, K., Pack, J., Houghton, A., Busam, K., Cordon-Cardo, C., and Osman, I. (2001). HDM2 Protein Overexpression, but not Gene Amplification, is Related to Tumorigenesis of Cutaneous Melanoma. Cancer Res *61*, 7642–7646.

Potterf, S.B., Mollaaghababa, R., Hou, L., Southard-Smith, E.M., Hornyak, T.J., Arnheiter, H., and Pavan, W.J. (2001). Analysis of SOX10 function in neural crest-derived melanocyte development: SOX10-dependent transcriptional control of dopachrome tautomerase. Dev Biol *237*, 245–257.

Poulikakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., et al. (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). Nature *480*, 387–390.

Price, E.R., Ding, H.F., Badalian, T., Bhattacharya, S., Takemoto, C., Yao, T.P., Hemesath, T.J., and Fisher, D.E. (1998). Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. J Biol Chem *273*, 17983–17986.

Quevedo, W.C., Fitzpatrick, T.B., Szabo, G., and Jimbow, K. (1987). Biology of melanocytes. Dermatology in General Medicine 224–251.

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

Rambow, F., Rogiers, A., Marin-Bejar, O., Aibar, S., Femel, J., Dewaele, M., Karras, P., Brown, D., Chang, Y.H., Debiec-Rychter, M., et al. (2018). Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. Cell *174*, 843-855.e19.

Rambow, F., Marine, J.-C., and Goding, C.R. (2019). Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. Genes Dev *33*, 1295–1318.

Rao, C., Su, Z., Li, H., Ma, X., Zheng, X., Liu, Y., Lu, F., Qu, J., and Hou, L. (2016). Microphthalmia-associated transcription factor regulates skin melanoblast migration by repressing the melanoma cell adhesion molecule. Exp Dermatol *25*, 74–76.

Rapino, F., Delaunay, S., Zhou, Z., Chariot, A., and Close, P. (2017). tRNA Modification: Is Cancer Having a Wobble? Trends in Cancer *3*, 249–252.

Rapino, F., Delaunay, S., Rambow, F., Zhou, Z., Tharun, L., De Tullio, P., Sin, O., Shostak, K., Schmitz, S., Piepers, J., et al. (2018). Codon-specific translation reprogramming promotes resistance to targeted therapy. Nature *558*, 605–609.

Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D.M., Berson, J.F., and Marks, M.S. (2001). Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. J Cell Biol *152*, 809–824.

Raposo, G., Marks, M.S., and Cutler, D.F. (2007). Lysosome-Related Organelles: Driving post-Golgi compartments into specialisation. Curr Opin Cell Biol *19*, 394–401.

Raychaudhuri, P., Rooney, R., and Nevins, J.R. (1987). Identification of an E1A-inducible cellular factor that interacts with regulatory sequences within the adenovirus E4 promoter. EMBO J *6*, 4073–4081.

Riley, P.A. (1997). Melanin. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology *29*, 1235–1239.

Rizos, H., Diefenbach, E., Badhwar, P., Woodruff, S., Becker, T.M., Rooney, R.J., and Kefford, R.F. (2003). Association of p14ARF with the p120E4F transcriptional repressor enhances cell cycle inhibition. J. Biol. Chem. *278*, 4981–4989.

Rizos, H., Woodruff, S., and Kefford, R.F. (2005). p14ARF Interacts with the SUMO-Conjugating Enzyme Ubc9 and Promotes the Sumoylation of Its Binding Partners. Cell Cycle *4*, 590–596.

Robert, C., Grob, J.J., Stroyakovskiy, D., Karaszewska, B., Hauschild, A., Levchenko, E., Chiarion Sileni, V., Schachter, J., Garbe, C., Bondarenko, I., et al. (2019). Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. New England Journal of Medicine *381*, 626–636.

Robinson, S.J., and Healy, E. (2002). Human melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants alter melanoma cell growth and adhesion to extracellular matrix. Oncogene *21*, 8037–8046.

Rodier, G., Kirsh, O., Baraibar, M., Houlès, T., Lacroix, M., Delpech, H., Hatchi, E., Arnould, S., Severac, D., Dubois, E., et al. (2015). The Transcription Factor E4F1 Coordinates CHK1-Dependent Checkpoint and Mitochondrial Functions. Cell Reports *11*, 220–233.

Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E.C., Zabierowski, S.E., Brafford, P.A., Vultur, A., Basu, D., Gimotty, P., Vogt, T., and Herlyn, M. (2010). A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. Cell *141*, 583–594.

Rojas-Benítez, D., and L. Allende, M. (2020). Elongator Subunit 3 (Elp3) Is Required for Zebrafish Trunk Development. International Journal of Molecular Sciences *21*, 925.

Rooney, R.J., Raychaudhuri, P., and Nevins, J.R. (1990). E4F and ATF, two transcription factors that recognize the same site, can be distinguished both physically and functionally: a role for E4F in E1A trans activation. Mol Cell Biol *10*, 5138–5149.

Rousseau, K., Kauser, S., Pritchard, L.E., Warhurst, A., Oliver, R.L., Slominski, A., Wei, E.T., Thody, A.J., Tobin, D.J., and White, A. (2007). Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. FASEB J *21*, 1844–1856.

Rusfianti, M., and Wirohadidjodjo, Y.W. (2006). Dermatosurgical techniques for repigmentation of vitiligo. Int J Dermatol *45*, 411–417.

Rzepka, Z., Buszman, E., Beberok, A., and Wrześniok, D. (2016). From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis. Postepy Hig Med Dosw (Online) *70*, 695–708.

Saccone, S., Sandy, P., Meroni, G., Gostissa, M., Della Valle, G., and Del Sal, G. (1998). Assignment of the E1A-regulated transcription factor E4F gene (E4F1) to human chromosome band 16p13.3 by in situ hybridization and somatic cell hybrids. Cytogenet Cell Genet *82*, 99–100.

Saito, H., Yasumoto, K.-I., Takeda, K., Takahashi, K., Fukuzaki, A., Orikasa, S., and Shibahara, S. (2002). Melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform activates its own gene promoter through physical interaction with lymphoid-enhancing factor 1. J Biol Chem *277*, 28787–28794.

Salti, G.I., Manougian, T., Farolan, M., Shilkaitis, A., Majumdar, D., and Das Gupta, T.K. (2000). Micropthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. Cancer Res *60*, 5012–5016.

Sánchez-Martín, M., Pérez-Losada, J., Rodríguez-García, A., González-Sánchez, B., Korf, B.R., Kuster, W., Moss, C., Spritz, R.A., and Sánchez-García, I. (2003). Deletion of the SLUG (SNAI2) gene results in human piebaldism. American Journal of Medical Genetics Part A *122A*, 125–132.

Sandy, P., Gostissa, M., Fogal, V., De Cecco, L., Szalay, K., Rooney, R.J., Schneider, C., and Del Sal, G. (2000). p53 is involved in the p120E4F-mediated growth arrest. Oncogene *19*, 188–199.

Sato, S., Roberts, K., Gambino, G., Cook, A., Kouzarides, T., and Goding, C.R. (1997). CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. Oncogene *14*, 3083–3092.

Schallreuter, K.U., Kothari, S., Hasse, S., Kauser, S., Lindsey, N.J., Gibbons, N.C.J., Hibberts, N., and Wood, J.M. (2003). In situ and in vitro evidence for DCoH/HNF-1 alpha transcription of tyrosinase in human skin melanocytes. Biochem Biophys Res Commun *301*, 610–616.

Schallreuter, K.U., Kothari, S., Chavan, B., and Spencer, J.D. (2008). Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. Experimental Dermatology *17*, 395–404.

Schouwey, K., Delmas, V., Larue, L., Zimber-Strobl, U., Strobl, L.J., Radtke, F., and Beermann, F. (2007). Notch1 and Notch2 receptors influence progressive hair graying in a dose-dependent manner. Dev Dyn *236*, 282–289.

Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Henglein, B., and Jansen-Dürr, P. (1994). Activation of the E2F transcription factor by cyclin D1 is blocked by p16INK4, the product of the putative tumor suppressor gene MTS1. Oncogene *9*, 3475–3482.

Selzer, E., Wacheck, V., Lucas, T., Heere-Ress, E., Wu, M., Weilbaecher, K.N., Schlegel, W., Valent, P., Wrba, F., Pehamberger, H., et al. (2002). The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. Cancer Res *62*, 2098–2103.

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

Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature *366*, 704–707.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. Cell *88*, 593–602.

Shaffer, S.M., Dunagin, M.C., Torborg, S.R., Torre, E.A., Emert, B., Krepler, C., Beqiri, M., Sproesser, K., Brafford, P.A., Xiao, M., et al. (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. Nature *546*, 431–435.

Shah, D.J., and Dronca, R.S. (2014). Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma. Mayo Clinic Proceedings *89*, 504–519.

Shahbazian, D., Parsyan, A., Petroulakis, E., Topisirovic, I., Martineau, Y., Gibbs, B.F., Svitkin, Y., and Sonenberg, N. (2010). Control of Cell Survival and Proliferation by Mammalian Eukaryotic Initiation Factor 4B. Mol Cell Biol *30*, 1478–1485.

Shangguan, W.-J., Liu, H.-T., Que, Z.-J., Qian, F.-F., Liu, L.-S., and Tian, J.-H. (2019). TOB1-AS1 suppresses non-small cell lung cancer cell migration and invasion through a ceRNA network. Exp Ther Med *18*, 4249–4258.

Shen, S., Faouzi, S., Bastide, A., Martineau, S., Malka-Mahieu, H., Fu, Y., Sun, X., Mateus, C., Routier, E., Roy, S., et al. (2019). An epitranscriptomic mechanism underlies selective mRNA translation remodelling in melanoma persister cells. Nat Commun *10*, 5713.

Shen, S., Faouzi, S., Souquere, S., Roy, S., Routier, E., Libenciuc, C., André, F., Pierron, G., Scoazec, J.-Y., and Robert, C. (2020). Melanoma Persister Cells Are Tolerant to BRAF/MEK Inhibitors via ACOX1-Mediated Fatty Acid Oxidation. Cell Reports *33*.

Sherr, C.J., and Weber, J.D. (2000). The ARF/p53 pathway. Curr Opin Genet Dev *10*, 94–99.

Shi, H., Hugo, W., Kong, X., Hong, A., Koya, R.C., Moriceau, G., Chodon, T., Guo, R., Johnson, D.B., Dahlman, K.B., et al. (2014). Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. Cancer Discov *4*, 80–93.

Shin, M.K., Levorse, J.M., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1999). The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. Nature *402*, 496–501.

Silver, A.F., and Chase, H.B. (1970). DNA synthesis in the adult hair germ during dormancy (telogen) and activation (early anagen). Developmental Biology.

Silvers, W.K. (1979). The coat colors of mice. A model for mammalian gene action and interaction. Springer-Verlag.

Simpson, C.L., Lemmens, R., Miskiewicz, K., Broom, W.J., Hansen, V.K., van Vught, P.W.J., Landers, J.E., Sapp, P., Van Den Bosch, L., Knight, J., et al. (2009). Variants of the elongator protein 3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration. Hum Mol Genet *18*, 472–481.

Skobe, M., Hamberg, L.M., Hawighorst, T., Schirner, M., Wolf, G.L., Alitalo, K., and Detmar, M. (2001). Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. Am J Pathol *159*, 893–903.

Smit, N.P., Vink, A.A., Kolb, R.M., Steenwinkel, M.J., van den Berg, P.T., van Nieuwpoort, F., Roza, L., and Pavel, S. (2001). Melanin offers protection against induction of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts by UVB in cultured human melanocytes. Photochem Photobiol *74*, 424–430.

Smith, S.D., Kelley, P.M., Kenyon, J.B., and Hoover, D. (2000). Tietz syndrome (hypopigmentation/deafness) caused by mutation of MITF. J Med Genet *37*, 446–448.

Sonam, K., Khan, N.A., Bindu, P.S., Taly, A.B., Gayathri, N., Bharath, M.M.S., Govindaraju, C., Arvinda, H.R., Nagappa, M., Sinha, S., et al. (2014). Clinical and magnetic resonance imaging findings in patients with Leigh syndrome and SURF1 mutations. Brain and Development *36*, 807–812.

Southard-Smith, E.M., Kos, L., and Pavan, W.J. (1998). Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. Nat Genet *18*, 60–64.

Spritz, R.A., Gowan, K., Bennett, D.C., and Fain, P.R. (2004). Novel vitiligo susceptibility loci on chromosomes 7 (AIS2) and 8 (AIS3), confirmation of SLEV1 on chromosome 17, and their roles in an autoimmune diathesis. Am J Hum Genet *74*, 188–191.

Stahl, J.M., Cheung, M., Sharma, A., Trivedi, N.R., Shanmugam, S., and Robertson, G.P. (2003). Loss of PTEN Promotes Tumor Development in Malignant Melanoma. Cancer Res *63*, 2881–2890.

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

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

Stenn, K.S., and Paus, R. (2001). Controls of Hair Follicle Cycling. Physiological Reviews *81*, 449–494.

Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuriyama, S., and Mayor, R. (2009). Differential requirements of BMP and Wnt signalling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. Development *136*, 771–779.

Stolz, W., Schmoeckel, C., Landthaler, M., and Braun-Falco, O. (1989). Association of early malignant melanoma with nevocytic nevi. Cancer *63*, 550–555.

Straume, O., Smeds, J., Kumar, R., Hemminki, K., and Akslen, L.A. (2002). Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. Am J Pathol *161*, 229–237.

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

Sullivan, R.J., and Flaherty, K.T. (2013). Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. Eur J Cancer *49*, 1297–1304.

Sultan, F., Basu, R., Murthy, D., Kochar, M., Attri, K.S., Aggrawal, A., Kumari, P., Dnyane, P., Singh, A., Gadgil, C., et al. (2021). Temporal resolution of melanogenesis determine fatty acid metabolism as key skin pigment regulator.

Suzuki, T., Li, W., Zhang, Q., Novak, E.K., Sviderskaya, E.V., Wilson, A., Bennett, D.C., Roe, B.A., Swank, R.T., and Spritz, R.A. (2001). The gene mutated in cocoa mice, carrying a defect of organelle biogenesis, is a homologue of the human Hermansky-Pudlak syndrome-3 gene. Genomics *78*, 30–37.

Tachibana, M. (1999). Sound Needs Sound Melanocytes to Be Heard. Pigment Cell Research *12*, 344–354.

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

Tada, A., Pereira, E., Beitner-Johnson, D., Kavanagh, R., and Abdel-Malek, Z.A. (2002). Mitogen- and ultraviolet-B-induced signaling pathways in normal human melanocytes. J Invest Dermatol *118*, 316–322.

Takeda, K., Yasumoto, K., Takada, R., Takada, S., Watanabe, K., Udono, T., Saito, H., Takahashi, K., and Shibahara, S. (2000). Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. J Biol Chem *275*, 14013–14016.

Takeda, K., Yasumoto, K. ichi, Kawaguchi, N., Udono, T., Watanabe, K. ichi, Saito, H., Takahashi, K., Noda, M., and Shibahara, S. (2002). Mitf-D, a newly identified isoform, expressed in the retinal pigment epithelium and monocyte-lineage cells affected by Mitf mutations. Biochim Biophys Acta *1574*, 15–23.

Talebi, A., Dehairs, J., Rambow, F., Rogiers, A., Nittner, D., Derua, R., Vanderhoydonc, F., Duarte, J.A.G., Bosisio, F., Van den Eynde, K., et al. (2018). Sustained SREBP-1-dependent lipogenesis as a key mediator of resistance to BRAF-targeted therapy. Nat Commun *9*, 2500.

Tan, Q., Li, J., Peng, J., Liu, Z., Liu, J., Zhang, H., Yuan, Q., Pan, Z., and Liu, L. (2019). E4F1 silencing inhibits the cell growth through cell-cycle arrest in malignant transformed cells induced by hydroquinone. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology *33*, e22269.

Tanimura, S., Tadokoro, Y., Inomata, K., Binh, N.T., Nishie, W., Yamazaki, S., Nakauchi, H., Tanaka, Y., McMillan, J.R., Sawamura, D., et al. (2011). Hair Follicle Stem Cells Provide a Functional Niche for Melanocyte Stem Cells. Cell Stem Cell *8*, 177–187.

Tassabehji, M., Read, A.P., Newton, V.E., Patton, M., Gruss, P., Harris, R., and Strachan, T. (1993). Mutations in the PAX3 gene causing Waardenburg syndrome type 1 and type 2. Nat Genet *3*, 26–30.

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

Tatham, M.H., Kim, S., Jaffray, E., Song, J., Chen, Y., and Hay, R.T. (2005). Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection. Nat Struct Mol Biol *12*, 67–74.

Tessari, M.A., Gostissa, M., Altamura, S., Sgarra, R., Rustighi, A., Salvagno, C., Caretti, G., Imbriano, C., Mantovani, R., Del Sal, G., et al. (2003). Transcriptional Activation of the Cyclin A Gene by the Architectural Transcription Factor HMGA2. Mol Cell Biol *23*, 9104–9116.

Thomas, A.J., and Erickson, C.A. (2009). FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. Development *136*, 1849–1858.

Topalian, S.L., Sznol, M., McDermott, D.F., Kluger, H.M., Carvajal, R.D., Sharfman, W.H., Brahmer, J.R., Lawrence, D.P., Atkins, M.B., Powderly, J.D., et al. (2014). Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. J Clin Oncol *32*, 1020–1030.

Toyofuku, K., Wada, I., Valencia, J.C., Kushimoto, T., Ferrans, V.J., and Hearing, V.J. (2001). Oculocutaneous albinism types 1 and 3 are ER retention diseases: mutation of tyrosinase or Tyrp1 can affect the processing of both mutant and wild-type proteins. FASEB J *15*, 2149–2161.

Tsao, H., Zhang, X., Benoit, E., and Haluska, F.G. (1998). Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. Oncogene *16*, 3397–3402.

Tsao, H., Atkins, M.B., and Sober, A.J. (2004). Management of Cutaneous Melanoma. N Engl J Med *351*, 998–1012.

Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K.M., Lay, J., Wong, D.J.L., Atefi, M., Shirazi, R., Wang, X., et al. (2018). Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. Cancer Cell *33*, 890-904.e5.

Valk-Lingbeek, M.E., Bruggeman, S.W.M., and van Lohuizen, M. (2004). Stem cells and cancer; the polycomb connection. Cell *118*, 409–418.

Vashisht Gopal, Y.N., Gammon, S., Prasad, R., Knighton, B., Pisaneschi, F., Roszik, J., Feng, N., Johnson, S., Pramanik, S., Sudderth, J., et al. (2019). A novel mitochondrial inhibitor blocks MAPK pathway and overcomes MAPK inhibitor–resistance in melanoma. Clin Cancer Res *25*, 6429–6442.

Verastegui, C., Bille, K., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (2000). Regulation of the microphthalmia-associated transcription factor gene by the Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10. J Biol Chem *275*, 30757–30760.

Verfaillie, A., Imrichova, H., Atak, Z.K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., Christiaens, V., Svetlichnyy, D., Luciani, F., Van den Mooter, L., et al. (2015). Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. Nat Commun *6*, 6683.

Vetrini, F., Auricchio, A., Du, J., Angeletti, B., Fisher, D.E., Ballabio, A., and Marigo, V. (2004). The microphthalmia transcription factor (Mitf) controls expression of the ocular albinism type 1 gene: link between melanin synthesis and melanosome biogenesis. Mol Cell Biol *24*, 6550–6559.

Vido, M.J., Le, K., Hartsough, E.J., and Aplin, A.E. (2018). BRAF Splice Variant Resistance to RAF Inhibitor Requires Enhanced MEK Association. Cell Rep *25*, 1501-1510.e3.

Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., et al. (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. Cancer Cell *18*, 683–695.

Vivas-García, Y., Falletta, P., Liebing, J., Louphrasitthiphol, P., Feng, Y., Chauhan, J., Scott, D.A., Glodde, N., Chocarro-Calvo, A., Bonham, S., et al. (2020). Lineage-Restricted Regulation of SCD and Fatty Acid Saturation by MITF Controls Melanoma Phenotypic Plasticity. Molecular Cell *77*, 120-137.e9.

Wagle, N., Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., Macconaill, L.E., Hahn, W.C., et al. (2011). Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. J Clin Oncol *29*, 3085–3096.

Wang, C., Zhao, L., Su, Q., Fan, X., Wang, Y., Gao, S., Wang, H., Chen, H., Chan, C.B., and Liu, Z. (2016). Phosphorylation of MITF by AKT affects its downstream targets and causes TP53-dependent cell senescence. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology *80*, 132–142.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. Science *123*, 309–314.

Watanabe, A., Takeda, K., Ploplis, B., and Tachibana, M. (1998). Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. Nat Genet *18*, 283–286.

Watt, A.J., Kotsis, S.V., and Chung, K.C. (2004). Risk of melanoma arising in large congenital melanocytic nevi: a systematic review. Plast Reconstr Surg *113*, 1968–1974.

Weatherhead, S.C., Haniffa, M., and Lawrence, C.M. (2007). Melanomas arising from naevi and de novo melanomas ? does origin matter? Br J Dermatol *156*, 72–76.

Wehrle-Haller, B., and Weston, J.A. (1995). Soluble and cell-bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. Development *121*, 731–742.

Wellbrock, C., and Marais, R. (2005). Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. J Cell Biol *170*, 703–708.

Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., and Marais, R. (2008). Oncogenic BRAF Regulates Melanoma Proliferation through the Lineage Specific Factor MITF. PLoS One *3*, e2734.

Welsh, S.J., and Corrie, P.G. (2015). Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma. Ther Adv Med Oncol *7*, 122–136.

Weston, J.A. (1991). Sequential segregation and fate of developmentally restricted intermediate cell populations in the neural crest lineage. Curr Top Dev Biol *25*, 133–153.

Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Price, E.R., Cui, J., Lessnick, S.L., Wu, M., He, X., and Fisher, D.E. (2002). β-Catenin–induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. J Cell Biol *158*, 1079–1087.

Wiley, H.E., Gonzalez, E.B., Maki, W., Wu, M.T., and Hwang, S.T. (2001). Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. J Natl Cancer Inst *93*, 1638–1643.

Winkler, G.S., Kristjuhan, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2002). Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 3517–3522.

Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.-A., Reed, K., et al. (2013). Safety and clinical activity of combined PD-1 (nivolumab) and CTLA-4 (ipilimumab) blockade in advanced melanoma patients. N Engl J Med *369*, 122–133.

Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J.-J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P.F., et al. (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. New England Journal of Medicine *377*, 1345–1356.

Wu, H., and Park, H.-Y. (2003). Protein kinase C-β-mediated complex formation between tyrosinase and TRP-1. Biochemical and Biophysical Research Communications *311*, 948–953.

Wu, X., and Hammer, J.A. (2014). Melanosome transfer: It is best to give and receive. Curr Opin Cell Biol *0*, 1–7.

Wu, H., Goel, V., and Haluska, F.G. (2003). PTEN signaling pathways in melanoma. Oncogene *22*, 3113–3122.

Wu, M., Hemesath, T.J., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Price, E.R., Fisher, D.Z., and Fisher, D.E. (2000). c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. Genes Dev *14*, 301–312.

Wu, S., Yan, M., Ge, R., and Cheng, C.Y. (2020). Crosstalk between Sertoli and Germ Cells in Male Fertility. Trends Mol Med *26*, 215–231.

Wu, X., Bowers, B., Rao, K., Wei, Q., and Hammer JA, null (1998). Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. J Cell Biol *143*, 1899–1918.

Xu, W., Gong, L., Haddad, M.M., Bischof, O., Campisi, J., Yeh, E.T.H., and Medrano, E.E. (2000). Regulation of Microphthalmia-Associated Transcription Factor MITF Protein Levels by Association with the Ubiquitin-Conjugating Enzyme hUBC9. Experimental Cell Research *255*, 135–143.

Yajima, I., and Larue, L. (2008). The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. Pigment Cell & Melanoma Research *21*, 471–476.

Yajima, I., Belloir, E., Bourgeois, Y., Kumasaka, M., Delmas, V., and Larue, L. (2006). Spatiotemporal gene control by the Cre-ERT2 system in melanocytes. Genesis *44*, 34–43.

Yan, R.-G., Yang, Q.-L., and Yang, Q.-E. (2020). E4 Transcription Factor 1 (E4F1) Regulates Sertoli Cell Proliferation and Fertility in Mice. Animals (Basel) *10*, 1691.

Yasumoto, K., Takeda, K., Saito, H., Watanabe, K., Takahashi, K., and Shibahara, S. (2002). Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. EMBO J *21*, 2703–2714.

Yoshida, H., Kunisada, T., Kusakabe, M., Nishikawa, S., and Nishikawa, S.I. (1996). Distinct stages of melanocyte differentiation revealed by anlaysis of nonuniform pigmentation patterns. Development *122*, 1207–1214.

Zhang, Q., Zhao, B., Li, W., Oiso, N., Novak, E.K., Rusiniak, M.E., Gautam, R., Chintala, S., O'Brien, E.P., Zhang, Y., et al. (2003). Ru2 and Ru encode mouse orthologs of the genes mutated in human Hermansky-Pudlak syndrome types 5 and 6. Nat Genet *33*, 145–153.

Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W.G. (1998). ARF Promotes MDM2 Degradation and Stabilizes p53: ARF-INK4a Locus Deletion Impairs Both the Rb and p53 Tumor Suppression Pathways. Cell *92*, 725–734.

Zhang, Y., Wang, P., Zhang, Q., Yao, X., Zhao, L., Liu, Y., Liu, X., Tao, R., Yu, C., Li, Y., et al. (2017). eIF3i activity is critical for endothelial cells in tumor induced angiogenesis through regulating VEGFR and ERK translation. Oncotarget *8*, 19968–19979.

Zhao, X., Fiske, B., Kawakami, A., Li, J., and Fisher, D.E. (2011). Regulation of MITF stability by the USP13 deubiquitinase. Nat Commun *2*, 414.

Zhu, A., Lee, D., and Shim, H. (2011). Metabolic positron emission tomography imaging in cancer detection and therapy response. Semin Oncol *38*, 55–69.

Zhuang, L., Lee, C.S., Scolyer, R.A., McCarthy, S.W., Palmer, A.A., Zhang, X.D., Thompson, J.F., Bron, L.P., and Hersey, P. (2005). Activation of the extracellular signal regulated kinase (ERK) pathway in human melanoma. J Clin Pathol *58*, 1163–1169.

Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Walker, G.J., Hayward, N., and Dracopoli, N.C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. Nat Genet *12*, 97–99.